



UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

INSERM U930 équipe « neurogénétique et neurométabolomique »

THÈSE

présentée par :

Audrey DANGOUMAU

soutenue le : 15 octobre 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la Santé

Etude de la voie de la SUMOylation dans la Sclérose Latérale Amyotrophique associée à des mutations de SOD1

THÈSE dirigée par :
Mr VOUREC'H Patrick

MCU-PH, Université François – Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :
Mr LUMBROSO Serge
Mr MARTIN Stéphane

PU-PH, Université de Montpellier
CR CNRS, IPMC de Valbonne

JURY :
Mr ANDRES Christian
Mr CORCIA Philippe
Mr FERNAGUT Pierre-Olivier
Mr LUMBROSO Serge
Mr MARTIN Stéphane
Mr VOUREC'H Patrick

PU-PH, Université François – Rabelais de Tours
PU-PH, Université François – Rabelais de Tours
CR CNRS, Université de Bordeaux
PU-PH, Université de Montpellier
CR CNRS, IPMC de Valbonne
MCU-PH, Université François – Rabelais de Tours

REMERCIEMENTS

Ils me font l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse :

Le **Professeur Serge LUMBROSO**, Chef de service du Laboratoire de Biochimie du CHU de Nîmes.

Le **Docteur Stéphane MARTIN**, Chargé de recherche à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7275 à Valbonne.

Ils me font l'honneur d'être examinateurs de cette thèse :

Le **Professeur Christian ANDRES**, Chef de service du Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du CHRU Bretonneau de Tours et Directeur de l'équipe « Neurogénétique et Neurométabolomique » de l'INSERM U930, Université François Rabelais de Tours.

Le Professeur **Philippe CORCIA**, Neurologue spécialiste de la Sclérose Latérale Amyotrophique au sein du CHRU Bretonneau de Tours.

Le **docteur Pierre-Olivier FERNAGUT**, Chargé de Recherche à l'Université de Bordeaux.

Le **docteur Patrick VOURC'H**, Maître de Conférence des Universités au sein l'équipe « Neurogénétique et Neurométabolomique » de l'INSERM U930, Université François Rabelais de Tours.

Merci au **Professeur Denis GUILLOTEAU**, Directeur de l'unité INSERM U930, pour m'avoir accueillie au sein de son unité.

Merci au **Professeur Christian ANDRES**, de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Vous

Merci au **Docteur Patrick VOURC'H**,

Merci au **Docteur Hélène BLASCO**, tu as toujours été là pour m'encourager et me conforter dans mes choix.

Merci au **Docteur Frédéric LAUMONNIER**, pour nos échanges formateurs. Tu as toujours été de bons conseils aussi bien aux niveaux des manip que de mes choix personnels.

Merci au **Docteur Emmanuel GYAN**, mes premiers pas de recherche furent réalisés à tes côtés. Tu m'a transmits ta passion de la recherche, ses quelques mois à tes cotés furent très enrichissants et tu m'as permis de rencontrer Patrick.

Merci aux filles, au **docteur Sylviane MAROILLAT**, à **Rose-Anne THEPAULT** et à **Cathy ANTAR**, vous êtes un élément clé du laboratoire. Vous avez toujours été là pour m'écouter, m'encourager et parfois me remonter le moral et bien-sur aussi pour nos partis de fous rires.

Merci aux **Docteurs Patrick EMOND, Sylvie MAVEL** et **Lydie NADAL**, pour votre bonne humeur au sein du laboratoire mais si vous êtes pour moi des extraterrestres

Un grand merci à **Charlotte VEYRAT-DUREBEX** et **Cinzia BOCCA**. Nous formons le trio de choc du laboratoire. Comment vous remerciez ? Vous avez toujours été présentes pour moi dans les bons moments comme dans les moments de doute. Je n'oublierais jamais tous les moments passés ensemble à refaire le monde et toutes nos séances potins.

Merci à **Amélie PAPON, Servane ALLIROL, Hélène CUBEROS, Binta DIEME, Blandine MADJI-HOUNOUM**. Depuis mon arrivée, notre bureau n'a fait que s'aggrandir avec vos arrivées, merci à vous toutes pour toutes nos parties de franches rigolades. Merci à **Francois WURMSER**, le seul mec parmi toutes ses filles, pour nos discussions parfois animées dans la salle de pause.

Un grand merci à « mes » stagiaires, vous avez contribuez à l'élaboration de ces résultats. Une pensée particluière à **la petite Audrey, Roxane et Paul**.

Merci à vous, mes amis, **Anne-Laurine PETIT-SANDROLINI**, **Clémence GROLLEAU**, **Gaëlle DUSCHESNE** et **Grégory PETIT**, vous m’avez toujours soutenue et vous m’avez offert des moments de détente sans lesquels j’aurais eu du mal à avancer. Une passion commune nous a réunis à jamais.

Merci au **Docteur Daniel COLLETTA**, depuis toute petite, tu as essayé de me transmettre le virus de la biologie, je crois que tu y es arrivé !

Je dédie cette thèse :

A mes parents, vous êtes formidables, ne changez pas.

A mes frères que j’aime de tout mon cœur.

Au meilleur des maris, Grégoire, t’avoir à mes cotés est la meilleur des choses qui me soit arrivé.

RESUME

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative des motoneurones impliquant des facteurs environnementaux et génétiques. Notre étude porte sur l'étude des relations entre la voie de la SUMOylation post-traductionnelle des protéines et les effets du stress oxydant et de mutants *SOD1*.

Nous montrons tout d'abord que 2 nouveaux mutants, $SOD1^{V31A}$ et $SOD1^{E121G}$ identifiés chez des patients SLA à évolution lente, entraîne la formation d'agrégats cellulaires Ub/SUMO-positifs dans la lignée motoneuronale NSC-34. L'implication des voies de l'Ub/SUMO dans la formation des agrégats était suggérée. Nous montrons 1) que les NSC-34 exposées à un stress oxydant et exprimant *SOD1* mutée présentent une modification d'expression de plusieurs gènes des voies de l'Ub/SUMO ; 2) que l'expression de *SOD1* mutée réduit le pool de protéine SUMO1 libre dans les cellules motoneuronales, possible conséquence d'une séquestration dans les agrégats ; 3) qu'inhiber la SUMOylation de *SOD1* mutée réduit la quantité de cellules avec agrégats.

Nos résultats indiquent que la voie de SUMO pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans la SLA.

Mots clés : SLA, motoneurones, *SOD1*, agrégats, SUMO, ubiquitine

RESUME EN ANGLAIS

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease of motor neurons involving a combination of environmental and genetic factors. Our work focuses on the relationship between the SUMOylation pathway and the effects of oxidative stress and SOD1 mutants.

We first show that 2 new mutants, SOD1^{V31A} and SOD1^{E121G} identified in ALS patients with a slowly progressive disease, induce the formation of Ub/SUMO-positive aggregates in motor neuronal cells NSC-34. The implication of the Ub/SUMO pathways has been proposed in the formation of aggregates in ALS. We show 1) modification of expression of several genes of the Ub/SUMO pathways in NSC-34 exposed to oxidative stress and expressing various mutated SOD1 proteins; 2) that the expression of mutants SOD1 reduces free-SUMO1 concentration in motor neuronal cells, perhaps by a sequestration in aggregates; 3) that the inhibition of SUMOylation of various mutants SOD1 reduces the amount of cells with aggregates.

Our results support further studies on the SUMO pathway that may lead to new therapeutic targets in ALS.

Keywords: ALS, motor neuron, SOD1, aggregates, SUMO, Ubiquitin

REMERCIEMENTS.....	1
RESUME	4
RESUME EN ANGLAIS	5
LISTE DES TABLEAUX.....	11
LISTE DES FIGURES.....	12
LISTE DES ANNEXES	13
LISTE DES ABREVIATIONS	14
GENERALITES	16
I. La Sclérose Latérale Amyotrophique	16
I.1. Historique.....	16
I.2. Clinique	16
I.3. Epidémiologie.....	18
I.4. Caractéristiques histopathologiques et liquides biologiques	20
I.4.1. Tissu nerveux	20
I.4.2. Liquides biologiques.....	21
I.5. Génétiques.....	22
I.5.1. SOD1.....	23
I.5.2. TARDBP.....	25
I.5.3. FUS	26
I.5.4. C9ORF72.....	27
I.5.5. Autres gènes	28
I.6. Mécanismes physiopathologiques	30
I.6.1. Stress oxydatif.....	30
I.6.2. Excitotoxicité.....	31
I.6.3. Inflammation	33
I.6.4. Hypoxie.....	35
I.7. Mécanismes de mort neuronale.....	35
I.7.1. Altération du métabolisme de l'ARN.....	35

I.7.2.	Altération du transport axonal.....	36
I.7.3.	Dysfonctionnement mitochondrial.....	38
I.7.4.	Autophagie	39
I.7.5.	Agrégation des protéines.....	39
II.	Les voies de l'Ubiquitine et des Ubiquitines-like	42
II.1.	La voie de l'Ubiquitine.....	42
II.1.1.	Le cycle	42
II.1.2.	Les enzymes.....	44
II.1.2.1.	<i>Les enzymes d'activation E1</i>	<i>44</i>
II.1.2.2.	<i>Les enzymes de conjugaison E2</i>	<i>44</i>
II.1.2.3.	<i>Les enzymes de liaison E3</i>	<i>46</i>
II.1.2.4.	<i>Les enzymes de désubiquitinylation</i>	<i>47</i>
II.1.3.	Interactions de l'Ubiquitine avec les protéines	47
II.1.3.1.	<i>Fonctions associées à l'Ubiquitinylation des protéines.....</i>	<i>47</i>
II.1.3.2.	<i>Fonctions associées à l'interaction non-covalente de l'Ubiquitine avec les protéines</i>	<i>49</i>
II.1.4.	Voie de l'ubiquitine et la SLA	51
II.1.4.1.	<i>SOD1</i>	<i>52</i>
II.1.4.2.	<i>TDP-43</i>	<i>53</i>
II.1.4.3.	<i>FUS</i>	<i>53</i>
II.1.4.4.	<i>VCP</i>	<i>54</i>
II.1.4.5.	<i>UBQLN2</i>	<i>54</i>
II.2.	La voie de la SUMOylation.....	54
II.2.1.	Les différents isoformes de SUMO	55
II.2.2.	Le cycle	56
II.2.3.	Les enzymes.....	57
II.2.3.1.	<i>Le complexe enzymatique d'activation E1</i>	<i>57</i>
II.2.3.2.	<i>L'enzyme de conjugaison E2.....</i>	<i>58</i>

II.2.3.3.	<i>Les enzymes de liaison E3</i>	58
II.2.3.4.	<i>Les SENPs</i>	59
II.2.4.	Les sites de SUMOylation des protéines	61
II.2.4.1.	<i>Les sites consensus de SUMOylation</i>	61
II.2.4.2.	<i>Les sites non consensus de SUMOylation</i>	63
II.2.5.	Fonctions biologiques de la SUMOylation	63
II.2.5.1.	<i>Conséquences moléculaires</i>	63
II.2.5.2.	<i>Rôle dans la régulation de la transcription</i>	64
II.2.5.3.	<i>Rôle dans l'intégrité du génome</i>	65
II.2.5.4.	<i>Rôle dans le ciblage sub-cellulaire</i>	65
II.2.6.	Régulation de la SUMOylation	66
II.2.7.	Voie de la SUMOylation et la SLA	67
III.	Modèles d'études in vitro	77
III.1.	Modèles cellulaires	77
III.2.	Modèles animaux	78
	OBJECTIFS	80
	MATERIELS ET METHODES	81
I.	Biologie moléculaire	81
I.1.	Production des plasmides	81
I.1.1.	Extraction des ARN totaux	81
I.1.2.	Traitement à la Dnase I et transcription inverse	82
I.1.3.	Réaction de polymérisation en chaine, PCR	82
I.1.4.	Mutagenèse dirigée	83
I.1.5.	Clonage	84
I.1.6.	Séquençage	85
I.2.	Microarray	86
I.2.1.	Extraction et purification des ARN	86
I.2.2.	Préparation à l'hybridation sur puce Agilent	86

I.2.2.1.	Synthèse de l'ADNc	86
I.2.2.2.	Synthèse de l'ARNc marqué à la Cyanine 3.....	87
I.2.2.3.	Hybridation sur puce 8x60k et lavages.....	87
I.2.3.	Bioinformatique.....	88
I.3.	RT-QPCR.....	88
II.	Biologie cellulaire	89
II.1.	Culture NSC34.....	89
II.1.1.	Culture.....	89
II.1.2.	Transfection	90
II.1.3.	Traitement au peroxyde d'hydrogène, au MG132	90
II.2.	Culture primaire de motoneurones	90
II.2.1.	Dissection des embryons	90
II.2.2.	Culture.....	91
II.2.3.	Transfection	92
II.3.	Test de viabilité et de mortalité	92
II.3.1.	Test de viabilité	92
II.3.2.	Test de mortalité	92
II.4.	Immunocytochimie	93
II.5.	Comptage des agrégats.....	94
II.6.	Quantification de l'intensité de fluorescence par cytomètre de flux.....	94
II.7.	Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM)	94
II.8.	Western blot.....	95
II.8.1.	Lyse des cellules	95
II.8.2.	Dosage des protéines.....	95
II.8.3.	Western Blot	95
III.	Bio-informatique	96
III.1.	Identification des sites de SUMOylation	96
III.2.	Logiciel des conséquences de mutation.....	97
III.3.	Modélisation des protéines.....	97
IV.	Statistiques.....	97

IV.1.	Test de Mann-Withney.....	97
IV.2.	Test de Kruskal & Wallis.....	97
RESULTATS		98
I. Caractérisation de nouvelles mutations du gène SOD1		98
I.1.	Mutations identifiées dans le gène SOD1dans la SLA.....	98
I.2.	Nouvelles mutations identifiées	100
I.2.1.	V31A	100
I.2.2.	E121G	106
II. Etude de l'effet combiné du stress oxydant et de la mutation de SOD1 sur les voies Ub/SUMO		114
III. Rôle de la SUMOylation dans la SLA associée à des mutations du gène <i>SOD1</i>		140
DISCUSSION-CONCLUSION		165
BIBLIOGRAPHIE		177
COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES, FINANCEMENTS .		212
ANNEXES		214

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères révisés d’Airlie House, 1998

Tableau 2 : facteurs de risques exogènes de la Sclérose Latérale Amyotrophique

Tableau 3 : Gènes impliqués dans la SLA.

Tableau 4 : Inventaire et caractéristiques des différentes UBDs interagissant avec l’Ubiquitine

Tableau 5: Séquence des amorces utilisées pour les PCR

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour la qPCR.

Tableau 7: Anticorps utilisés pour les immunocytochimies

Tableau 8: Anticorps utilisées pour le western-blot

Table 9 : Composition moléculaire des agrégats présents dans les motoneurons de patients SLA

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure cristallographique du dimère de la SOD1 humaine

Figure 2 : Vue d'ensemble des mécanismes de dégénérescence des motoneurones dans la SLA

Figure 3 : La voie de l'ubiquitine

Figure 4 : Schéma de la structure tridimensionnelle du domaine UBC des enzymes de conjugaison E2

Figure 5 : Les différentes topologies d'ubiquitylation.

Figure 6 : Position des lysines sur la molécule d'Ubiquitine pouvant se lier à des protéines cibles

Figure 7 : Structure et alignement de l'Ubiquitine, SUMO1, SUMO2 et SUMO3

Figure 8 : La voie de la SUMOylation

Figure 9 : Structure primaire des SENPs

Figure 10 : Conséquences moléculaires des interactions covalentes et non covalentes de SUMO avec les substrats.

Figure 11 : Technique de mutagenèse dirigée

Figure 12 : Carte du plasmide pcDNATM 6.2/C-EmGFP/TOPO

Figure 13: Les différentes étapes de la dissection d'un embryon de rat à E14

Figure 14 : Représentation de la structure secondaire de la protéine SOD1 montrant la localisation des mutations associées à la SLA

Figure 15: Stratégie développée pour l'étude de nouvelle mutation de gène lié à la SLA.

Figure 16: Motoneurones en culture depuis 24h (A) et 8 jours (B).

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Hexanucleotide repeats (GGGGCC)_n containing genes resembling C9ORF72 and expressed in the central nervous system are frequent in the Human genome. Vourc'h P. et al.

Annexe 2: Advances in cellular models to explore the pathophysiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Veyrat-Durebex C. et al.

Annexe 3: Association of a paraneoplastic motor neuron disease with anti-Ri antibodies and a novel SOD1 I18del mutation. Diard-Detoeuf C. et al.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AMP : Adénosine Mono-Phosphate
AMPA : Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique
AR : Androgen Receptor
ARN : Acide Ribonucléique
ATM : Ataxie Télangiectasie Mutée
ATP: Adénosine tri-phosphate
BDNF: Brain-Derived Neutrophic Factor
BET: Bromure d'éthidium
BSA: Bovine Serum Albumin
CCK-8: Cell Counting Kit-8
ChAT: Choline acetyltransferase
CHIP: C-terminus of Hsc70 Interacting Protein
CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor
CTE: COOH terminus of EAAT2
DFT: Démence fronto-temporal
DMEM: Dulbecco's Modified Eagles Medium
dNTP: désoxyNucléotide TriPhosphate
DTT: DiThioThrétol
DUBs : DeUBiquitinase
E1 : Enzyme d'activation
E2 : Enzyme de conjugaison
E3 : Enzyme de liaison
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique
ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation
FMN : Fédération Mondiale de Neurologie
GDNF: Glial cell-Derived Neutrophic Factor
GFP: Green Fluorescent Protein
GR: Glucocorticoid Receptor
GWAS: Genome Wide Association Study
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution
HECT: Homologous to E6-associated protein C-terminus
HCSM: Hydrophobic Cluster SUMO Motif
ICM: Inverted Consensus Motif
kDa: Kilo Dalton
LB: Lysogeny Broth
LCR: Liquide CéphaloRachidien
MG132: carbobenzoxo-Leu-Leu-leucinal
MNC: Motoneurones Centraux
MNP : Motoneurones Périphériques
NDSM: Negatively charged amino-acid Dependent SUMO Motif

NES: Signal d'exportation nucléaire
 NF: NeuroFilament
 NLS: Nuclear Localization Signal
 NMDA: N-Methyl-D-Aspartate
 NO: Nitric Oxide (monoxyde d'azote)
 NTP: Nucléotides Tri-Phosphates
 PBS: Phosphate Buffered Saline
 PCR: Polymerase Reaction Chain
 PDB: Protein Data Bank
 PDSM: Phosphorylation Dependent SUMO Motif
 PH: Pleckstrin Homology
 PR: Progesterone Receptor
 pSuM: phosphorylated SuMOylation Motif
 PVDF: Polyvinylidène difluoride
 qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction
 RE: Réticulum Endoplasmique
 RING: Really Interesting New Gene
 RIPA: Radio ImmunoPrecipitation Assay
 RMN: Résonnance Magnétique Nucléaire
 ROS: Reactive Oxygen Species
 RRM: RNA Recognition Motif
 RT: Reverse Transcription
 SENP: Sentrin Protease
 SETX: Senataxin
 SIM: SUMO Interacting Motif
 SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
 SLAf : Sclérose Latérale Amyotrophique familiale
 SLAs : Sclérose Latérale Amyotrophique sporadique
 SNP : Single Nucleotide Polymorphism
 SNC: Système Nerveux Central
 SUMO: Small Ubiquitin-related MOdifier
 SVF: Serum Veau Foetal
 TBE: Tris Borate EDTA
 TBST: Tris Buffered Saline Tween
 TGX: Tris Glycine extented
 Ub: Ubiquitine
 UBA: UBiquitin Associated domain
 UBD: Ubiquitin Binding Domains
 Ubl: Ubiquitine-like
 UPS: Ubiquitin Proteasome System
 UV: Ultra-Violet

GENERALITES

GENERALITES

I. La Sclérose Latérale Amyotrophique

I.1. Historique

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) connue également sous le nom de maladie de Charcot ou maladie de Lou Gehrig est une maladie neurodégénérative chronique caractérisée par la dégénérescence des motoneurones corticaux (motoneurones supérieurs) et des motoneurones bulbaires et spinaux (motoneurones inférieurs).

Elle fut étudiée pour la première fois par le neurologue Guillaume Duchenne de Boulogne dans les années 1850, qui pensait que la maladie n'était que musculaire. La première démonstration d'une atteinte de la moelle épinière est faite en 1853 par le médecin Jean Cruveilhier au cours d'une autopsie, montrant une atrophie des racines antérieures. En 1874, le neurologue Jean-Martin Charcot, établit avec précision les caractéristiques cliniques et pathologiques de la SLA.

Le terme "Amyotrophique" se réfère à l'atrophie des fibres musculaires induite par la dégénérescence des neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière qui conduit à l'affaiblissement musculaire et à l'apparition de fasciculations. « Sclérose Latérale » se réfère au « durcissement » des tractus corticospinaux résultant de la dégénérescence des motoneurones et de leur remplacement par des cellules gliales (Rowland and Shneider, 2001).

I.2. Clinique

Le diagnostic de la SLA repose sur la coexistence de signes cliniques d'atteinte des motoneurones bulbaires et spinaux (motoneurones inférieurs, innervant directement les muscles) et des motoneurones corticaux (motoneurones supérieurs, connectés aux précédents), et sans signe d'atteinte des autres systèmes notamment sensitif, cérébelleux, extra pyramidal et cognitif. En fonction de la région d'atteinte initiale, on distingue deux formes de SLA, la forme spinale et la forme bulbaire.

La forme spinale est due à la dégénérescence des motoneurones situés dans la moelle épinière. Elle est caractérisée par une atteinte de la motricité des membres supérieurs ou inférieurs, accompagnée par des fasciculations (contractions musculaires involontaires), des

crampes et d'une sensation de raideur (ou ankylose) dans les articulations et les membres. Tous les membres finissent par être atteints, mais de façon asymétrique. Environ les deux tiers des patients atteints de SLA présentent une forme spinale de la maladie. La forme bulbaire correspond à la dégénérescence des motoneurons du tronc cérébral conduisant à des troubles de la parole et/ou de la déglutition. Ces deux formes cliniques peuvent se succéder ou se développer simultanément.

La maladie progresse toujours vers une forme complète, caractérisée par l'atteinte des muscles des quatre membres, de la langue, du pharynx, du larynx et des muscles respiratoires. Elle conduit à une paralysie totale et à la mort due à un échec respiratoire et ce après 2 à 3 ans pour la forme bulbaire et 3 à 5 ans en moyenne pour la forme spinale.

La SLA a longtemps été considérée comme une atteinte exclusive du système moteur. Toutefois, l'existence de troubles cognitifs chez 30 à 50% des patients suggère que les anomalies dépassent le système. Ces troubles cognitifs se caractérisent par une atteinte des fonctions exécutives telles que les troubles de la flexibilité mentale, de la mémoire de travail, les troubles attentionnels et la réduction de la fluence verbale (Murphy et al., 2007). 15 à 20% des patients SLA ayant des troubles cognitifs répondraient aux critères de démence fronto-temporale (DFT). Des troubles du comportement tels que une apathie, une irritabilité et une désinhibition ont été également observés en association avec des troubles cognitifs ou de façon isolée chez 63% des patients (Grossman et al., 2007).

Par conséquent, on peut distinguer 3 catégories de patients de SLA : les patients ayant une atteinte motrice pure, ceux ayant en plus des troubles cognitifs décelables et ceux ayant à la fois une SLA et une DFT. Ceci indique que les spectres cliniques de la SLA et de la DFT semblent se chevaucher. Les critères diagnostiques de la SLA ont été établis par la Fédération Mondiale de Neurologie (FMN) (critères El Escorial, 1994; critères révisés Airlie House, 2000) (Brooks et al., 2000). Ces critères permettent d'établir un diagnostic avec des degrés variables de certitude. La SLA est alors classée en : cliniquement définitive, cliniquement probable et cliniquement possible (Tableau 1). Par contre, ces critères s'avèrent peu sensibles à l'usage, surtout au début de la maladie, pouvant retarder le diagnostic. Ils excluent aussi certaines formes cliniques et n'aident pas au diagnostic différentiel. D'autres analyses, notamment électrophysiologiques sont à présent considérées essentielles pour établir le diagnostic.

Diagnostic de SLA

SLA cliniquement définitive:

signes d'atteinte des MNC et MNP: région bulbaire et 2 régions spinales ou 3 régions spinales

SLA cliniquement probable:

signes d'atteinte des MNC et MNP dans au moins 2 régions avec des signes d'atteintes du NMC rostral par rapport aux signes périphériques

SLA cliniquement possible:

Signes d'atteinte des MNP et MNC dans une seule région après exclusion des autres causes par neuroimagerie, électrophysiologie, investigations biologiques

Ou

Signes d'atteinte des MNC dans 2 régions ou plus après exclusion des autres causes par neuroimagerie, électrophysiologie, investigations biologiques

Ou

Signes d'atteinte des MNP rostral par rapport aux signes d'atteinte des MNC avec absence de preuves électrophysiologique d'atteinte des MNP dans d'autres régions et après exclusion des autres causes par neuroimagerie, électrophysiologie, investigations biologiques

Tableau 1 : Critères révisés d'Airlie House, 1998 (Brooks et al. ; 2000)

I.3. Epidémiologie

L'incidence de la SLA sporadique est évaluée à 1,89 pour 100 000 individus par année en Europe et en Amérique du Nord. Quant à la prévalence moyenne, elle est estimée à 5,2 pour 100 000 individus dans les pays occidentaux (Chiò, 2000). Bien que cette fréquence soit relativement uniforme dans les pays occidentaux, des foyers de fréquence plus élevée existent à l'ouest du pacifique : l'île de Guam, certaines îles de Micronésie et la péninsule de Kii, au Japon (Gajdusek and Salazar, 1982; Garruto et al., 1985). En l'absence de facteurs génétiques identifiés dans ces populations particulièrement touchées, des hypothèses incriminant des facteurs de risque environnementaux ont été avancées tels qu'une concentration anormalement élevée d'aluminium dans le sol ainsi que la consommation de *Cycas Circinalis*, plante contenant du cycade, un composé neurotoxique (Duncan et al., 1989; Gajdusek and Salazar, 1982; Garruto et al., 1985; Spencer, 1987).

Le risque de développer une SLA sporadique est de 1 à 2 par 1000 individus (Chancellor et al., 1993, Traynor et al., 1999, Johnston et al., 2006). L'âge moyen d'apparition de la forme sporadique de la SLA varie de 55 à 64 ans et seulement 5% des cas développent la

maladie avant l'âge de 30 ans (Haverkamp et al., 1995). La moyenne de survie de la SLA est de 1 à 5 ans (Cleveland and Rothstein, 2001). Globalement, une plus forte prévalence existe chez les hommes (ratio H:F est 1,5:1) (McCombe and Henderson, 2010). Les dernières revues de la littérature qui se sont intéressées à l'épidémiologie de la SLA sont concordantes sur une implication de facteurs de risque exogènes dans la SLA sporadique. Aucune association entre un facteur de risque environnemental et la SLA n'a pu être démontrée de manière convaincante et reproductible à ce jour. La discordance entre les résultats observés dans diverses études peut être expliquée en grande partie par des biais méthodologiques. Les résultats des travaux les plus récents suggèrent ainsi des interactions entre des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques en intégrant l'âge, le moment et la durée d'exposition à ces facteurs de risques exogènes (Tableau 2).

Facteurs de risque exogènes

Exposition aux métaux lourds:

Plomb

Mercure

Cuivre

Sélénium

Aluminium

Cadmium

Exposition aux pesticides/herbicides

Exposition aux solvants

Facteurs traumatiques

Electrocution

Modes de vie

Tarvail agricole

Activité physique

Activités militaires

Consommation de tabac

Consommation d'alcool

Habitudes alimentaires :

Régime pauvre en fibres

Régime pauvre en Acides gras polyinsaturés

Prise de glutamate

Régime pauvre en vitamine E

Régime pauvre en vitamine C

Tableau 2 : Facteurs de risques exogènes de la Sclérose Latérale Amyotrophique (d'après Gil et al.; 2007)

Il aura nécessité plus de 80 ans après la description princeps de la SLA par le Dr Charcot pour que le concept de formes familiales de SLA (SLAf) soit reconnu, grâce aux

travaux de Mulder et Kurland en 1955 (Kurland and Mulder, 1955). 10 à 20 % des cas de SLA sont familiales (Camu et al., 1999). La transmission de ces formes familiales de SLA se fait souvent sur le mode autosomalique dominant et avec une forte pénétrance. Des cas de transmission autosomale récessive ont été décrits (Gros-Louis et al., 2006). La SLAf atteint également les hommes et les femmes, apparaît en moyenne 10 ans plus tôt que la forme sporadique et présente une durée de survie souvent plus courte (Veltema et al., 1990).

I.4. Caractéristiques histopathologiques et liquides biologiques

I.4.1. Tissu nerveux

L'analyse autopsique des premiers cas de SLA décrits a permis de confirmer l'atteinte quasi exclusive des neurones moteurs en mettant en évidence une perte neuronale. La découverte par exemple, d'inclusions intraneuronales caractéristiques a ouvert des voies dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques conduisant à la mort neuronale. Une des difficultés d'interprétation des lésions anatomopathologiques réside dans le fait que les autopsies concernent des patients en stade avancé ou terminal de la maladie et il est difficile d'établir clairement la chronologie des anomalies observées (Kato, 2008).

Les formes sporadiques et familiales de SLA ont des anomalies anatomopathologiques similaires. Cependant, la nature des inclusions permet de distinguer deux types anatomopathologiques de formes familiales. Dans le premier cas les anomalies observées sont identiques à celles présentes dans les formes sporadiques, dans l'autre des inclusions spécifiques sont présentes et les cordons postérieurs sont atteints.

La plupart des motoneurones restants comportent des modifications structurales macroscopiques et microscopiques. Ils deviennent basophiles et atrophiques, aspects qui peuvent témoigner de phase apoptotique (Martin, 1999). Plus fréquent, l'aspect d'achromasie qui correspond à une pauvreté ou une absence des corps de Nissl (agrégats de réticulum endoplasmique granuleux) s'en rapproche.

Les anomalies microscopiques sont des inclusions intracellulaires. Les inclusions positives pour l'Ubiquitine sont les plus fréquentes. Elles constituent un marqueur de SLA sporadique (Ince et al., 1998, 2003; Piao et al., 2003). Le terme d'inclusion positifs pour l'Ubiquitine regroupe divers éléments allant d'un simple réseau de filaments jusqu'à des formes sphériques plus compactes de 5 à 25 µm de diamètre (Ince et al., 1998; Leigh et al.,

1991). Parmi ces inclusions Ubiquitine positives, le type « skein-like » (en écheveau) est le plus fréquent et peut s'étendre aux dendrites (Leigh et al., 1991).

Les corps de Bunina sont des inclusions cytoplasmiques plus petites (1-5 µm de diamètre), éosinophiles et présents dans environ 70% des formes familiales et sporadiques. Moins fréquentes que les inclusions Ubiquitine positives, ces corps de Bunina restent des éléments spécifiques (Leigh et al., 1991; Piao et al., 2003). Les marquages immunohistochimiques révèlent la présence de deux protéines dans ces corps: la cystatine C et la transferrine (Okamoto et al., 2008). Ils ne sont habituellement pas révélés par les anticorps dirigés contre l'Ubiquitine et les neurofilaments (Leigh et al., 1991) et sont TDP-43 négatifs (Okamoto et al., 2008). Les corps de Bunina semblent être plus fréquents et plus gros chez des patients présentant une SLA avec démence (Okamoto, 2008). Ils sont présents dans les formes familiales non liées à une mutation du gène SOD1 (Kato, 2008).

Une fragmentation de l'appareil de Golgi a été mise en évidence chez quelques patients (Fujita and Okamoto, 2005; Gonatas et al., 1992). Il précède l'apparition des signes cliniques chez la souris transgénique SOD1 (Fujita and Okamoto, 2005).

L'accumulation de neurofilaments est responsable d'un gonflement axonal proximal (Sasaki and Maruyama, 1994). Cet aspect est spécifique et précoce (Hirano, 1996). D'autre part, des agrégats d'hyaline (agrégats tissulaires vitreux) ont été observés dans les formes familiales liées aux mutations du gène *SOD1* comme I113T (Kato, 2008; Rouleau et al., 1996; Shaw et al., 1997). Ces inclusions sont plus grandes que celles d'Ubiquitine positives. Elles sont révélées par les anticorps dirigés contre les chaînes lourde et intermédiaire des neurofilaments et correspondent ainsi à une accumulation de neurofilaments.

I.4.2. Liquides biologiques

De nombreuses anomalies biologiques ont été décrites dans le sang ou le liquide céphalorachidien (LCR) de patients SLA. Plusieurs études ont montré la présence d'anomalies concernant des voies physiopathologiques variées comme le stress oxydant (augmentation du 4-hydroxyl-2,3-nonanal par exemple), certains facteurs trophiques (augmentation du TGFβ1), l'excitotoxicité (augmentation du glutamate), ou encore l'inflammation (augmentation de MCP-1). Ces anomalies biologiques ne peuvent être considérées comme des marqueurs sensibles et spécifiques de la maladie.

La métabolomique est une nouvelle méthode émergente, capable de détecter sans a priori de nombreux métabolites (= petites molécules de masse inférieure à 100 kDa). Cette approche offre l'avantage de fournir un profil métabolique global d'une matrice biologique donnée (sang, LCR). Ainsi les études métabolomiques peuvent aider à la découverte de nouveaux biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques, ou encore ouvrir des perspectives de nouvelles voies physiopathologiques. Plusieurs études par RMN (Résonnance magnétique nucléaire) et spectrométrie de masse à haute résolution ont montré que la signature métabolique du LCR des patients SLA pouvait être distinguée de celle des contrôles (Blasco et al., 2010, 2013; Kumar et al., 2010). L'analyse quantitative par spectrométrie de masse a révélé des concentrations en acétate significativement plus faibles ($p = 0,0002$) chez des patients atteints de SLA par rapport aux témoins et la concentration d'acétone ($p = 0,015$), de pyruvate ($p = 0,002$) et d'ascorbate ($p = 0,003$) était plus élevée dans le groupe de la SLA (Blasco et al., 2010).

I.5. Génétiques

De nombreux travaux ont montré une contribution importante de la génétique dans l'étiologie de la SLA. Les études de jumeaux montrent que l'héritabilité de la SLA sporadique est d'environ 0,61, et qu'il existe une augmentation du risque de la SLA si des proches sont atteints de SLA sporadiques (Al-Chalabi et al., 2010). Des facteurs causaux de SLA ont été identifiés à ce jour chez environ 10% des cas de SLA. Deux facteurs se conjuguent pour rendre difficile l'identification des gènes de la SLA. Tout d'abord, la SLA est une maladie de la vie tardive, et bien que la prévalence de la SLA soit de 1 sur 300 (Johnston 2006), le pronostic est très mauvais et la prévalence est par conséquent faible. En conséquence, le recueil d'un grand nombre d'échantillons d'ADN pour des études d'associations de liaisons nécessite une longue période ou la collaboration de plusieurs centres.

Dans certains cas, la SLA et la Démence FrontoTemporale (DFT) sont des manifestations du même processus sous-jacent, de sorte que certains individus ont une SLA, certains ont une DFT et d'autres ont les deux en même temps (Gunnarsson, 1991). Ce chevauchement est plus prononcé pour certains gènes comme *FUS* et *TARDBP* que pour d'autres (Mackenzie et al., 2010). Par conséquent, cela a affecté l'étude des gènes car les individus atteints de DFT ont été exclus des études génétiques. Plus récemment, la connaissance de ce chevauchement a permis l'identification de nouveaux gènes et d'améliorer la puissance statistique de trouver des gènes de la pathologie.

Avant l'ère du séquençage haut débit il existait deux grandes stratégies pour identifier les gènes d'une maladie, les études de liaison et les études d'association. Dans l'étude de liaison, un test statistique est effectué dans une famille afin de déterminer si une variation génétique se produit chez la personne touchée plus souvent que prévu par hasard. Si tel est le cas, on parle de liaison. Dans les études d'association, la fréquence d'une variation génétique est comparée, entre un groupe d'individus affectés et non apparentés, et un groupe de contrôles non apparentés. Si la fréquence diffère entre les deux groupes, alors l'association est identifiée entre la maladie et la variation génétique.

Ces deux stratégies ont permis depuis 1993, date de l'identification du premier gène de la SLA, *SOD1*, d'associer une vingtaine de gènes à la SLA (Al-Chalabi et al., 2012). Des études GWAS (genome-wide association study) ont permis d'associer les loci 21q et 9p21 à la SLA, ce qui a permis d'identifier les gènes *SOD1* (1993) et *C9ORF72* (2011) respectivement. Parmi ces gènes, seulement quatre sont considéré de façon unanime comme des facteurs génétiques pathogènes majeurs causaux de la SLA (*SOD1*, *TARDBP*, *FUS* et *C9ORF72*), responsables d'un peu plus de 5% des formes sporadiques et de plus de deux tiers des formes familiales. Quatre autres gènes sont potentiellement causaux, *VCP*, *OPTN*, *UBQLN2* et *VAPB*. Viennent ensuite les gènes de susceptibilité, des gènes portant des variations (Nombre de copies, allèles,...) plus fréquemment retrouvés dans la SLA que dans la population générale. La présence de ces variants augmente le risque de développer la maladie, comme *SMN1*, *VEGF*, ... (Corcia et al., 2002; Lambrechts et al., 2003).

I.5.1. SOD1

C'est en 1991 que le premier gène à être associé à la SLA fut cartographié au niveau du chromosome 21q (Siddique et al., 1989). Deux ans plus tard, la même équipe clona ce gène et l'identifia : il s'agit du gène *SOD1* codant la superoxide dismutase cytosolique porteur d'ions cuivre et zinc (SOD1) (Rosen et al., 1993a). Cette enzyme, de 153 acides aminés, joue un rôle dans la détoxification cellulaire. Depuis les travaux initiaux de Rosen et Siddique, plus de 150 mutations du gène *SOD1* ont été identifiées dans la SLA ((Andersen et al., 2003); www.alsod.org). On estime qu'elles constituent environ 20% des cas de SLA (Rosen et al., 1993a). La majorité de ces mutations sont des mutations faux-sens, mais des délétions et insertions ont également été rapportées. Si la plupart des SLA dues à une mutation de *SOD1* est transmise de façon autosomique dominante, la mutation *SOD1*^{D90A} peut néanmoins présenter une transmission soit récessive soit dominante, en fonction certainement du fond

génétique et/ou de facteurs environnementaux (Al-Chalabi et al., 1998). Il est à noter qu'il existe une corrélation génotype-phénotype pour un certain nombre de mutations. À titre d'exemple, les patients portant la mutation A4V, la plus commune en Amérique du Nord, présentent un phénotype commun avec une progression rapide et un décès survenant après 1-2 ans de l'apparition des premiers symptômes (Cudkowicz and Brown, 1996; Cudkowicz et al., 1997). A l'opposé, les mutations G37R, G41D sont associés à des formes d'évolution lente.

Le gène *SOD1* comporte 5 exons et 4 introns. Il est situé en région chromosomique 21q22.1 où il s'étend sur 11 kb. SOD1 humaine est un homodimère de 32 kDa composé de deux sous-unités. L'enzyme SOD1 est une métalloenzyme antioxydante qui se trouve dans le cytosol, le noyau, les peroxysomes et l'espace intermembranaire mitochondrial des cellules eucaryotes. Elle est particulièrement abondante au niveau du cytosol et représente 1% de ses protéines totales (Valentine et al., 2005). Elle comporte un pont disulfure ainsi qu'un site catalytique contenant un atome de cuivre et un autre de zinc (Figure 1).

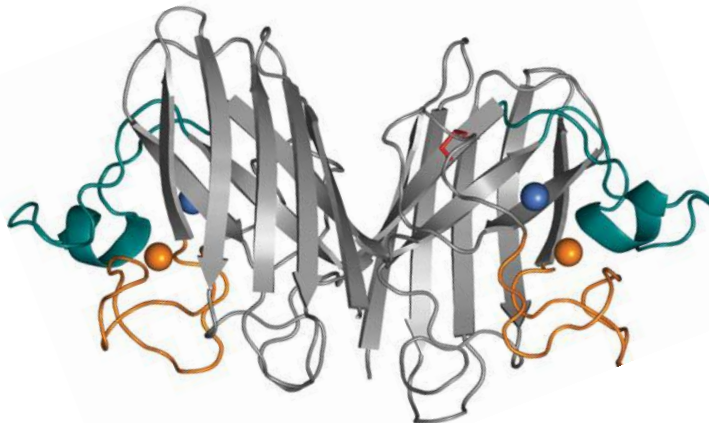


Figure 1 : Structure cristallographique du dimère de la SOD1 humaine. Le cuivre et le zinc sont représentés respectivement par les sphères bleues et oranges. La boucle zinc est en orange et la boucle cuivre est en bleu. Ces deux boucles englobent la région de liaison aux métaux. Le pont disulfure sous-unitaire est représenté en rouge. Les flèches argentées représentent les feuillets bêta antiparallèles qui sont au nombre de huit dans chaque sous-unité et forment une structure caractéristique cylindrique appelée « bêta-baril ». Le dimère est retenu par des interactions hydrophobes et non covalentes qui confèrent une grande stabilité à la SOD1 (Valentine et al., 2005)

Le site de liaison au zinc pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de la structure de SOD1 et la modulation de l'activité catalytique du site de liaison au cuivre. Ce dernier est responsable de l'activité enzymatique de SOD1 qui catalyse la conversion des anions superoxydes (O_2^-) en dioxygène (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Figure 1). SOD1 est donc une enzyme clé dans le métabolisme de l'oxygène. Elle protège l'organisme, avec la

glutathion peroxydase et la catalase, contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive oxygen species) comme $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et le radical hydroxyle OH^{\cdot} .

Les mutations du gène *SOD1* identifiées dans la SLA semblent affecter la stabilité de la protéine SOD1 et/ou induisent un changement dans son repliement (structure tertiaire ou conformation). L'introduction de gène *SOD1* humain portant certaines mutations chez des souris transgéniques provoque l'apparition de symptômes cliniques très similaires à ceux rencontrés chez des patients SLAf. Plusieurs résultats d'études supportent l'hypothèse que les mutations associées à la SLAf provoquent un gain de fonction de la SOD1 mutée qui serait toxique plutôt qu'une perte de fonction. Ceci est supporté par le fait que le KO-SOD1 est associée à un développement et une vie normal des souris.

Malgré plus de 20 ans de recherche intensive sur l'étude de SOD1 mutée dans la SLA, une image claire de son rôle moléculaire dans la physiopathologie de la SLA n'existe pas encore. Sa fonction physiologique principale est de protéger les cellules contre les dommages oxydatifs en métabolisant les radicaux superoxydes (Gurney et al., 1994; Niwa et al., 2007), mais a été impliquée également dans l'excitotoxicité, le dysfonctionnement mitochondrial, le stress oxydatif, axonopathie, et le trafic endosomique (Bosco et al., 2010; Crow et al., 1997; Higgins et al., 2002; Ligon et al., 2005; Spreux-Varoquaux et al., 2002; Wiedau-Pazos et al., 1996).

I.5.2. TARDBP

La mise en évidence de mutations dans le gène *TARDBP* a suivi par l'existence d'inclusions Ubiquitines positives marquées par des anticorps anti-TDP-43 dans le cytoplasme de motoneurons de patients SLA et de patients avec une démence frontotemporale (DFT) (Neumann et al., 2006). Cette observation a conduit à l'analyse du gène *TARDBP* dans la SLAf. Ce gène *TARDBP* (1p36, 6 exons) code la protéine TDP-43 de 414 aa. Les mutations de *TARDBP* ont été observées dans 4-6 % des cas SLAf, et dans 0-2 % des cas de SLAs diagnostiqués (Daoud et al., 2009; Kirby et al., 2010). Depuis 2008, plus de 50 mutations différentes hétérozygotes dominantes ont été trouvés (Chiò et al., 2011). Elles affectent principalement le domaine C-terminal contenant la séquence signal de localisation nucléaire, tous sauf une sont faux-sens, l'exception étant T374X (Daoud et al., 2009). Les mutations de *TARDBP* se traduisent donc par la redistribution de TDP-43 du noyau vers le cytoplasme des neurones et des cellules gliales. TDP-43 est impliqué dans plusieurs niveaux de traitement de

l'ARN, y compris la transcription, l'épissage, le transport et la traduction (Lagier-Tourenne et al., 2010)

Les inclusions Ubiquitines positives contenant TDP-43 sont observées dans le cytoplasme et le noyau des neurones et des cellules gliales et sont retrouvées dans les cas de la SLAs, ainsi que dans certains cas de SLAf (non dues à une mutation du gène *SOD1*). Le cerveau et la moelle épinière des patients avec une «protéinopathie TDP-43» présentent une signature biochimique qui se caractérise par une hyperphosphorylation et une ubiquitinylation anormales de TDP-43 ainsi que par la production de fragments C-terminaux de 25 kDa, la séquence signal de localisation nucléaire (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006).

I.5.3. FUS

La découverte de mutations en *TARDBP* a incité l'étude de gènes similaires ayant la même fonction et situés dans des régions du génome liés à la SLA. Ceci a permis de mettre en évidence des mutations dans le gène *FUS* (*fused in sarcoma*) (Kwiatkowski, 2009) dans la région de liaison 16q11.2 dans la SLA. *FUS* présente de nombreuses similitudes fonctionnelles avec *TARDBP* dont une région riche en glycine et deux régions RRM (RNA recognition motif) qui lient l'ADN et les ARN, jouant un rôle dans la réparation de l'ADN, ainsi que dans la régulation de la transcription et l'épissage des ARN.

Le gène *FUS* (15 exons) code une protéine de 525 aa. La fréquence de mutation dans ce gène est de 4-6% dans des cas de SLAf et 0,7-1,8% dans des cas de SLAs (Millecamps et al., 2010; Tsai et al., 2011; Yan et al., 2010). Plusieurs mutations faux-sens, essentiellement dans les derniers exons 14 et 15, qui codent pour l'extrémité C –terminale, liaison aux ARN, ont été révélés (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009).

Les patients présentant des mutations du gène *FUS* présente une perte sévère des neurones moteurs dans la moelle épinière et dans une moindre mesure dans le tronc cérébral. Les immunohistochimies *FUS* montre des inclusions cytoplasmiques volumineux globulaires et allongés dans les neurones moteurs de la moelle épinière. Ces inclusions sont positives également pour l'Ubiquitine et p62 caractéristiques de la SLA classique.

I.5.4. C9ORF72

Plusieurs études de liaison sur le génome (GWAS) ont indiqué dès 2006 que le locus 9p21.2 devait contenir un facteur génétique en cause dans la SLA (Morita et al., 2006; Vance et al., 2006). Le séquençage de l'ensemble des gènes de cette région, exons et régions non codantes incluses, n'a pas permis d'identifier ce facteur causal. Il a fallu attendre deux études publiées en 2011 pour identifier ce facteur (DeJesus-Hernandez et al., 2011a; Renton et al., 2011a). Il s'agit d'une expansion à l'état hétérozygote d'une séquence hexanucléotidique (GGGGCC) répétée en tandem et située entre l'intron 1a et 1b du gène *C9ORF72*. L'expansion de répétition dans *C9ORF72* a été observée chez 3-46% des SLA^f et 5-21% chez les SLAs. Un gradient Nord-Sud se dessine avec une prépondérance de cas dans les populations nordiques en raison possiblement d'un effet fondateur nord européen (Majounie et al., 2012). Certaines populations semblent quant à elles relativement épargnées par cette expansion, c'est le cas de l'Inde et de l'Australie (Majounie et al., 2012). Le gène *C9ORF72* (12 exons) exprime trois transcrits différents et deux possibles isoformes protéiques. Chez les individus sains, le nombre de répétition (GGGGCC) est inférieur à 30 alors que chez les patients SLA il peut y avoir jusqu'à 1600 répétitions. Les études indiquent la présence très fréquente de troubles cognitifs ou du comportement dans les cas liés à une expansion dans *C9ORF72*, ce qui distingue ces formes de celles liées à une mutation *TARDBP* ou *SOD1* dans lesquelles les troubles cognitifs sont observés chez environ 30 % et 2 % des patients, respectivement. Il faut souligner également que l'anomalie de *C9ORF72* est également plus fréquente dans les DFT familiales (Hodges, 2012). Elles apparaissent ainsi comme un chaînon manquant dans la recherche d'un continuum entre la SLA et certaines démences.

L'expansion de la répétition (GGGGCC) a été associée à une réduction de l'expression du gène *C9ORF72* (van der Zee et al., 2013a), ce qui a suggéré un mécanisme d'haplo-insuffisance. La fonction de la protéine C9ORF72 est encore inconnue, mais un rôle dans l'autophagie et dans le trafic vésiculaire a été proposé sur la base de recherche d'homologie de séquence (Levine et al., 2013a; Zhang et al., 2012a). Deux autres mécanismes de la maladie par le gain toxique de la fonction ont été proposées (Gendron et al., 2014; Haeusler et al., 2014). Ils sont basés sur l'observation selon laquelle l'expansion est également associée à une production sens et anti-sens du transcrit ((5'GGGGCC3')_n et (5'GGCCCC3')_n), qui forment des structures d'ARN quadruplex aberrante interagissant avec diverses protéines liant l'ARN (RBPs) et formant des foyers d'ARN (DeJesus-Hernandez et al., 2011). L'équipe s'est intéressé aux répétitions d'hexanucléotide (5'GGGGCC3')_n et (5'GGCCCC3')_n qui

pourraient être présent dans d'autres gènes que C9ORF72. Nous avons analysé la présence et la distribution de cette répétition dans le génome humain. Sur la base de données sur l'expression et la fonction des gènes, nous avons établi une liste de gènes à étudier par PCR amorcée dans les maladies neurologiques et neuromusculaires (Vourc'h P., Wurmser F., Mouzat K., Kassem S., **Dangoumau A.**, et al., en révision dans *Neurobiology of aging*, en annexe 1). Des analyses par immunofluorescence ont été réalisées sur les muscles d'un patient muté pour C9ORF72. L'analyse a révélé la présence d'agrégats cytoplasmiques positifs pour l'Ubiquitine et p62 et négatif pour TDP-43 (Türk et al., 2014)

I.5.5. Autres gènes

En dehors de ces gènes qui ont été clairement impliqués dans la SLA, il existe des gènes potentiellement causaux et des gènes de susceptibilité. On peut classer ces gènes en fonction de leur fonction dans la cellule (Tableau 3).

En plus de *TARDBP* et *FUS*, on retrouve les gènes *SETX* et *SMN1* ayant un rôle dans la régulation des ARN. La protéine SMN1 intervient dans de nombreuses activités cellulaires dont celle du métabolisme des ARN. Plusieurs études, dont certaines par notre équipe, ont montré qu'un nombre anormal de copies de SMN1 augmente significativement le risque de développer une SLA (Corcia et al., 2002; Moulard et al., 1998). La protéine SETX joue un rôle dans la transcription et la réplication des ARN, sa mutation est associée à une SLA juvénile (Chen et al., 2004)

Des travaux sur la relation entre hypoxie et la mort des neurones moteurs, ont conduit à l'étude du gène *VEGF* qui joue un rôle majeur dans la réponse tissulaire à l'hypoxie. Bien qu'une étude menée sur une large population de patient a montré un lien entre certains haplotypes VEGF et SLA, aucune étude n'a identifié de mutation *VEGF* dans la SLA (Lambrechts et al., 2003). Par contre, le gène *ANG* codant l'angiogénine et en lien avec la réponse à l'hypoxie a été trouvé muté chez plusieurs patients SLA (Greenway et al., 2006; Paubel et al., 2008)

VCP et *UBQLN2* sont deux gènes impliqués dans la voie de l'Ubiquitine. VCP est une E3 ligase dont la mutation a été dans un premier temps rapportée chez des patients ayant une démence frontotemporale et par la suite décrite dans des formes classiques de SLA (Johnson et al., 2010). L'UBQLN2 est une protéine de lien entre les protéines ubiquitinylées et le

protéasome. Son gène a été trouvé muté chez quelques patients SLA (Deng et al., 2011). Des inclusions UBQLN2 positifs ont été décrits dans la moelle épinière de patients SLA (Millecamps et al., 2012)

Gène	Locus	Date	Référence
Stress oxydant			
Superoxide dismutase 1 (<i>SOD1</i>)	21q22	1993	Rosen et al.; 1993
Régulation des ARN			
TAR DNA-binding protein (<i>TARDBP</i>)	1p36.2	2008	Sreedharan et al.; 2008
Fused in sarcoma (<i>FUS</i>)	9q34	2009	Kwiatkowski et al.; 2009 Vance et al.; 2009
Senataxin (<i>SETX</i>)	9q34	2004	Chen et al.; 2004
Survival motor neuron (<i>SMN1</i>)	5p13	2002	Corcia et al.; 2002
Angiogenèse			
Angiogenin (<i>ANG</i>)	14q11.2	2006	Greenway et al.; 2006
Vasculo endothelial growth factor (<i>VEGF</i>)	6p12	2003	Lambrechts, 2003
Voie de l'ubiquitine			
Valosin-containing protein (<i>VCP</i>)	9p13-p12	2010	Johnson et al.; 2010
Ubiquilin 2 (<i>UBQLN2</i>)	Xp11	2011	Deng et al.; 2011
Excitotoxicité au glutamate			
D-amino acid oxidase (<i>DAO</i>)	12q24	2010	Mitchell et al.; 2010
Trafic endosomal			
Vesicle-associated membrane protein-associated protein B (<i>VAPB</i>)	20q13.3	2004	Nishimura et al.; 2004
Polyphosphoinositide phosphatase (<i>FIG4</i>)	6q21	2009	Chow et al.; 2009
Optineurin (<i>OPTN</i>)	10p13	2010	Maruyama et al.; 2010
Cytosquelette			
Microtubule-associated protein tau (<i>MAPT</i>)	17q21	1998	Hutton et al.; 1998
Others			
Chromosome 9 open reading frame 72 (<i>C9ORF72</i>)	9q21-22	2011	Renton et al.; 2011 De Jesus-Hernandez et al.; 2011

Tableau 3 : Gènes impliqués dans la SLA.

Plusieurs gènes mutés dans la SLA sont impliqués dans le trafic des endosomes comme *VAPB* et *OPTN*. La mutation du gène *VAPB* est retrouvée exclusivement chez des patients brésiliens (Nishimura et al., 2004). Quant au gène *OPTN*, son implication est sujette à

controverse car plusieurs études n'ont pas confirmé les premiers résultats (Maruyama et al., 2010; Millecamps et al., 2011)

I.6. Mécanismes physiopathologiques

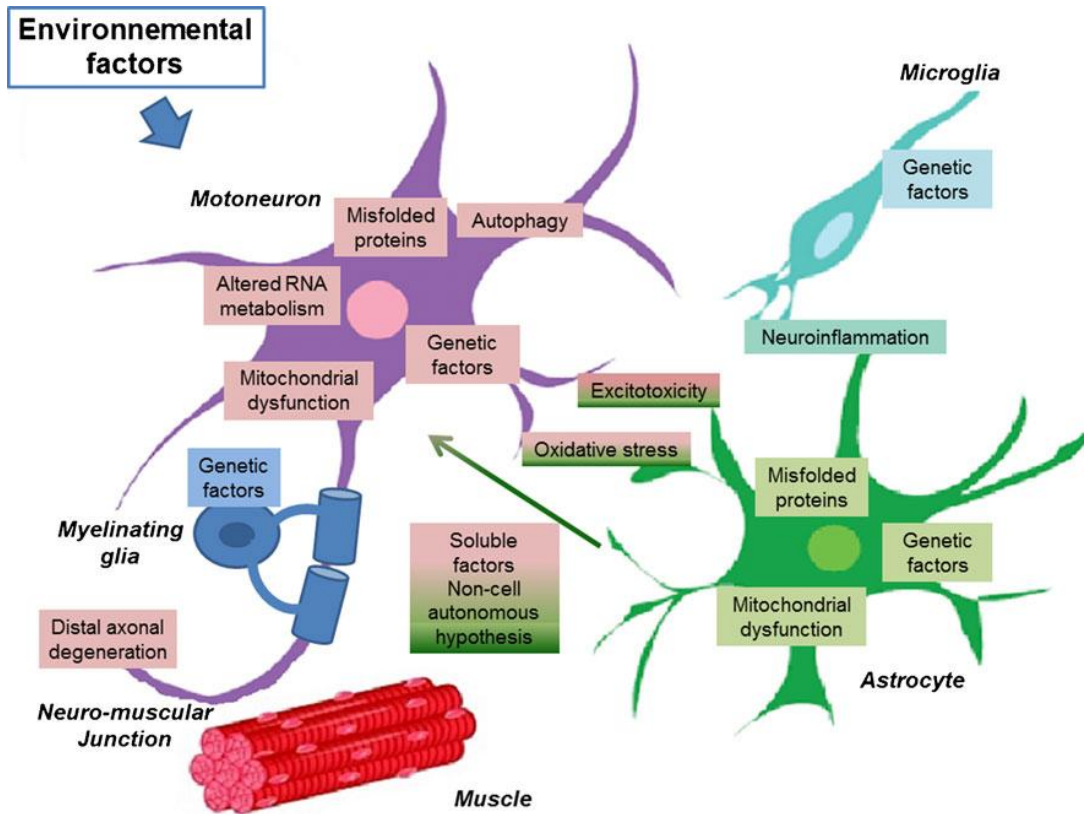


Figure 2 : Vue d'ensemble des mécanismes de dégénérescence des motoneurones dans la SLA (Veyrat-Durebex et al., 2014)

Les mécanismes qui mènent à la dégénérescence des motoneurones dans la SLA sont encore mal décrits. La découverte de mutations du gène codant l'enzyme SOD1 au début des années 1990 et de celles d'autres gènes depuis cette date a conduit à l'élaboration d'hypothèses physiopathologiques dans la SLA impliquant des étiologies environnementales comme le stress oxydatif, l'excitotoxicité au glutamate, l'inflammation et l'hypoxie (Figure 2).

I.6.1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et / ou d'une réduction de la capacité des cellules à

supprimer ou réparer les dommages induits par les ROS. Un intérêt particulier a été porté sur le stress oxydatif dans la SLA du fait de la mutation du gène *SOD1*, qui code une protéine anti-oxydante majeure dans toutes les cellules. Divers échantillons biologiques (LCR, sérum et urines) de patients atteints de SLA montrent une élévation des marqueurs de dommages par les radicaux libres comme le 4-hydroxynonanal (issu de la peroxydation des lipides membranaires dans la moelle épinière de patients SLA) et le 8-oxodeoxyguanosine (formes oxydées de l'ADN) (Mitsumoto et al., 2008; Pedersen et al., 1998; Simpson et al., 2004). Des dommages oxydatif sur les ARN ont également été documentés dans des modèles de souris mutés pour le gène *SOD1* (mSOD1) (Chang et al., 2008). Dans ce modèle murin de la SLA, l'oxydation des ARNm s'observe principalement dans les motoneurones et les oligodendrocytes. Elle se produit dans les stades précoces et pré-symptomatiques de la maladie et est associée à une diminution de l'expression globale des protéines.

Plusieurs études ont montré que le stress oxydatif interagit avec des processus physiopathologiques qui contribuent à la mort du motoneurone, comme l'excitotoxicité (Rao and Weiss, 2004), le dysfonctionnement mitochondriale (Duffy et al., 2011), l'agrégation des protéines (Wood et al., 2003) et des altérations de signalisation dans les astrocytes et la microglie (Sargsyan et al., 2005, 2009). Ainsi, la réduction effective de stress oxydatif pourrait améliorer la survie des motoneurones. Une méta-analyse des interventions thérapeutiques testées chez des souris mSOD1 jusqu'en 2007 a conclu que les thérapies anti-oxydantes étaient parmi les plus efficaces pour améliorer la survie mais ceci n'a pas été observé chez les patients atteints de SLA traités par la créatine ou la porphyrine de manganèse par exemple (Benatar et al., 2009).

I.6.2. Excitotoxicité

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus abondant dans le SNC. Il interagit avec les récepteurs au glutamate ionotropes (récepteurs NMDA, AMPA et kaïnate) ou métabotropes (RCPG, classe C (récepteurs couplés à la protéine G)) postsynaptiques. La transmission nerveuse prend fin après le recyclage du glutamate recapturé par des transporteurs spécifiques neuronaux ou astrocytaires périssynaptiques (EAAT1, 2 et 3) (Heath and Shaw, 2002; Rothstein et al., 1995)

Le glutamate extracellulaire peut être neurotoxique en cas de suractivité des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques. Il en résulte une augmentation de la concentration

intraneuronale d'ions sodium (Na^+), chlorure (Cl) ou calcium (Ca^{2+}). Ce dernier conduit à l'activation d'enzymes calcium-dépendantes, entre autres, les phospholipases, la xanthine oxydase et la nNOS (NO Synthase neuronale). Ces enzymes peuvent provoquer des dommages à l'ADN, une peroxydation lipidique, un dysfonctionnement mitochondrial et conduire à la dégénérescence des motoneurones (Shaw, 2005). L'hypothèse de l'excitotoxicité a été proposée dans la pathogenèse de la SLA suite à la découverte de taux élevés de glutamate dans le liquide céphalorachidien (LCR) des patients atteints de SLA sporadique (Rowland and Shneider, 2001; Shaw et al., 1995).

Chez certains patients SLA, les niveaux de glutamate dans le LCR sont élevés (Shaw et al., 1995), et l'expression et l'activité d'EAAT2 sont réduits dans les zones affectées du SNC (Fray et al., 1998; Rothstein et al., 1992, 1995). Toutefois il n'est pas établi si cela était une conséquence de la perte neuronale. 60 à 70% des patients SLAs présentent une perte de 30 à 95% du transporteur astroglial de glutamate EAAT2 dans le cortex moteur et la moelle épinière (Meyer et al., 1999). Ceci contribuerait à une augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate et par la suite à la dégénérescence par excitotoxicité des motoneurones (Urushitani et al., 1998). Des ARNm anormaux du gène codant le transporteur EAAT2 ont été détecté en abondance chez 65% des patients atteints de SLAs (Lin et al., 1998). Ces ARNm pourraient donner naissance à des protéines pouvant peut être affecté la fonction des transporteurs EAAT2 normaux.

En outre, un gène lié à la SLA code la D-amino- acide oxydase (*DAO*) (12q24.11) (Mitchell et al., 2010). Cette enzyme est responsable de la désamination oxydative d'acide D-aminés, dont la D-sérine qui constitue un activateur et le co-agoniste de la N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Mitchell et al., 2010). Des mutations dans le gène *DAO* pourraient favoriser des mécanismes de mort motoneuronale par excitotoxicité.

Réduire l'excitotoxicité est la seule stratégie qui jusqu'ici a permis de ralentir la progression de la SLA chez les patients. Le Riluzole qui notamment inhibe la libération de glutamate pré-synaptique, permet une augmentation modeste de la survie de 3 à 6 mois (Cheah et al., 2010; Lacomblez et al., 1996). D'autres agents anti-glutamatergique comme la Gabapentine, la Lamotrigine, le Topiramate et Talampanel n'ont pas montré d'efficacité dans les essais cliniques. Les raisons ne sont pas connues, même si une explication possible serait que le Riluzole aurait de multiples effets neuroprotecteurs (Cheah et al., 2010).

I.6.3. Inflammation

Bien que la SLA n'apparaisse pas résulter d'un dérèglement ou d'une anomalie du système immunitaire, il est évident que les processus inflammatoires sont impliqués dans sa pathogenèse. Le LCR et le plasma de patients SLA contiennent des concentrations plus élevées de cytokines et chimiokines telles que l'interleukine-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), monocyte colony-stimulating factor (MCSF), transforming growth factor β (TGF- β) (Henkel et al., 2004; Ilzecka and Stelmasiak, 2002; Ilzecka et al., 2002; Ono et al., 2001; Poloni et al., 2000). En réponse à différents stimuli, les cellules microgliales se transforment en cellules phagocytaires activées produisant de nombreuses cytokines inflammatoires (COX-2, TNF- α et MCP-1), chimiokines, prostaglandines et proteases qui participent à la réponse inflammatoire (Almer et al., 2001; Robertson et al., 2001). Ces dernières, qui peuvent être très nocives en cas d'activation chronique et intense des cellules microgliales (Sargsyan et al., 2005), peuvent agir sur les neurones, astrocytes et oligodendrocytes avoisinants. Ainsi, une augmentation du taux de prostaglandins E2 a été décrite dans le LCR de patients SLA (Almer et al., 2002). Par ailleurs, le niveau d'expression de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), une enzyme impliquée dans la synthèse des prostaglandines inflammatoires, est plus élevé dans la moelle épinière de patients SLA et de souris modèles de la pathologie (Almer et al., 2001; Yasojima et al., 2001).

L'activation des cellules microgliales représente une caractéristique pathologique majeure chez les patients atteints de SLA ainsi que chez les modèles de souris transgéniques (Hall et al., 1998; Henkel et al., 2004; Kawamata et al., 1992; Troost et al., 1990). Plusieurs études ont rapporté chez des modèles SOD1 murins une augmentation de l'expression de facteurs proinflammatoires avant l'apparition de la maladie, avec une activation microgliale soutenue tout au long de la phase active de progression de la maladie. Par exemple, l'expression de TGF- β 1 et de MCSF est augmentée chez les souris durant la phase présymptomatique, tandis que l'expression de TNF- α augmente bien avant le début des déficits moteurs (Cozzolino et al., 2008)

Le traitement des souris modèles de SLA avec la Minocycline retarde l'apparition de la maladie et prolonge la survie (Kriz et al., 2002; Zhu et al., 2002). La Minocycline est capable d'inhiber l'activation des cellules microgliales grâce à des propriétés antibiotiques et anti-inflammatoires. Elle semble agir sur les cellules microgliales en réduisant le niveau de d'iNOS (NO synthase inductible) et sur les motoneurones en empêchant la libération du cytochrome c et l'initiation de la voie pro-apoptotique (Kriz et al., 2002; Yrjänheikki et al., 1999). Néanmoins, des études *in vitro* ont montré que les cellules microgliales exprimant SOD1 mutée possèdent un potentiel neurotoxique plus élevé et sécrètent plus de monoxyde d'azote (NO) et d'anions superoxydes (Liu et al., 2009; Weydt et al., 2004; Xiao et al., 2007).

En revanche, l'activation des cellules microgliales peut exercer un effet neuroprotecteur (Eleuteri et al., 2008; Neumann et al., 2008, 2006; Polazzi et al., 2001). Les cellules microgliales sécrètent des facteurs neurotrophiques et phagocytent les débris cellulaires (Streit, 2002). Une réduction de l'activation microgliale médiée par les cellules T régulatrices est associée à une accélération de la progression de la maladie chez des souris SOD1 mutée (Beers et al., 2006). Ceci supporte un rôle bénéfique pour la réponse microgliale dans la pathogenèse de la SLA.

En plus d'avoir un rôle dans le métabolisme du glutamate, les astrocytes sont impliqués également dans la réponse neuroinflammatoire. Les astrocytes forment la population de cellules gliales la plus abondante du SNC, assurent le support métabolique des motoneurones et contribuent à la régulation de l'activité immunitaire du SNC (Raibon et al., 2008). Comme les cellules microgliales, les astrocytes réactifs expriment des facteurs pro-inflammatoires tels que la prostaglandine E2 (PGE2), IL-6 et TNF- α (Moisse and Strong, 2006). Par conséquent, le dysfonctionnement astrocytaire pourrait altérer le fonctionnement des motoneurones. La présence d'astrocytes réactifs et d'inclusions contenant SOD1 mutée dans les cellules astrocytaires ont été rapportées chez des patients atteints de SLA ainsi que les souris SOD1 (Bruijn et al., 1997; Levine et al., 1999; Schiffer and Fiano, 2004; Schiffer et al., 1996). Les astrocytes exprimant SOD1 mutée peuvent induire la mort des motoneurones *in vitro* par la production de facteurs toxiques solubles encore inconnus. Cet effet est augmenté lorsque les motoneurones expriment simultanément SOD1 mutée (Di Giorgio et al., 2007; Nagai et al., 2007). Cependant, le mécanisme de toxicité des astrocytes exprimant SOD1 mutée reste méconnu.

I.6.4. Hypoxie

Plusieurs études récentes ont mis en évidence une susceptibilité motoneuronale particulière à l'hypoxie dans les modèles murins de SLA : il existerait une altération précoce, préclinique, de la barrière hémato-encéphalique et spinale ; et des anomalies qualitatives et quantitatives de plusieurs facteurs angiogéniques ont également été mises en évidence chez l'animal (*vascular endothelial growth factor* (VEGF), angiogénine) (Tankersley et al., 2007). Peu de résultats ont néanmoins été répliqués chez l'homme, chez qui il faut tenir compte de l'existence de deux types d'hypoxémies : une hypoxémie chronique, définie par une pression partielle en O₂ inférieure à 60 % à distance de toute décompensation respiratoire, associée à une diminution de la capacité vitale, et une hypoxémie intermittente, caractérisée par des épisodes de désaturation répétées avec ré-oxygénation. Ces deux voies sont complémentaires et mettent en jeu des réponses différentes au niveau cellulaire : la voie du facteur de transcription sensible à l'hypoxie (HIF-1 et -2) pour l'hypoxie prolongée ; et la voie du facteur de transcription nucléaire kappa B (NFκ-B) et des médiateurs inflammatoires pour les épisodes d'hypoxémies intermittentes. Les dosages des taux de différents médiateurs dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de SLA sporadique, à divers stades évolutifs de la maladie (VEGF, angiogénine, angiopoïétine-2, érythropoïétine, interleukine-6, tumor necrosis factor alpha et PGE-2) ont mis en évidence des anomalies électives de la voie HIF-1/VEGF/ANG chez les patients atteints de SLA hypoxémiques par rapport aux témoins neurologiques (Devos et al., 2004; Moreau et al., 2010; Nagata et al., 2007). Les taux d'IL-6, de TNF-α, d'ANG-2 et de PGE-2 étaient élevés chez les patients SLA et corrélés à la sévérité de l'hypoxie, ce qui pourrait témoigner d'un mécanisme de compensation (Just et al., 2007; Moreau et al., 2010).

I.7. Mécanismes de mort neuronale

I.7.1. Altération du métabolisme de l'ARN

L'hypothèse d'une altération du métabolisme de l'ARN a notamment été suggérée par la découverte de mutations dans les gènes *TDP-43* et *FUS* chez les patients SLA. En effet, TDP-43 et FUS font partie des protéines dites RBPs (pour RNA-binding proteins) capables de se fixer aux ARN. La mutation de ces gènes forme des inclusions dans le cytosol des neurones moteurs des personnes atteintes de SLA. La formation de ces inclusions jouerait un rôle régulateur de la stabilité des ARN, pouvant moduler l'épissage ou la traduction. Une étude sur

les RBPs renforce l'idée d'interactions entre ces acteurs protéiques (Keller et al., 2012). On retrouve dans les inclusions ces différentes protéines, et des marqueurs de la dégradation par le protéasome. Ces travaux illustrent donc le concept d'altération du métabolisme des ARN, notamment des ARNm des neurofilaments comme phénomène central dans la physiopathologie de la SLA.

Le dérèglement de l'expression des miRNA et des voies liées aux miRNA a également été reporté dans la SLA. L'expression du miR-206, miRNA spécifique du muscle squelettique est augmenté dans le muscle après dénervation du muscle sciatique et sa carence est corrélée avec la progression de la maladie dans un modèle murin de SLA (Williams et al., 2009). Egalement TDP-43 est directement impliquée dans la voie des miRNA. TDP-43 est un composant du complexe Dicer et Drosha, qui sont important pour la biogénèse des miRNA. Il a été reporté que des mutations du gène TDP-43 provoquent une expression différentielle des miRNA matures et fonctionnelles telles que miR-132, miR-143 et miR-558 (Kawahara and Mieda-Sato, 2012). Comme TDP-43, FUS se lie à des moléuxles de pré-ARNm et détermine leur sort par la régulation de l'épissage, du transport, de la stabilité et la traduction (Lagier-Tourenne et al., 2012). Il a été montré que FUS favorise la biogenèse de miRNA spécifique par le recrutement de Drosha. Parmi eux, des miRNA avec des fonctions connues pour pour la plasticité synaptique et le developpement neuronal tels que miR-132, miR-134 et miR-9 ont été identifiés (Morlando et al., 2012). L'expression dérégulée des miRNA contribue à la pathoogie de la SLA et le profil d'expression des miRNA pourrait servir d'outil pour le diagnostic de la SLA.

I.7.2. Altération du transport axonal

L'altération du transport axonal est un élément clé de la SLA et pourrait donc jouer un rôle crucial dans la physiopathologie de la maladie. Les motoneurones, sont des cellules fortement polarisées avec de longs axones et un transport axonal efficace est donc nécessaire pour la livraison de composants essentiels tels que les ARN, les protéines et les organites. Le principal mécanisme de transport axonal utilise les microtubules dépendants de la kinésine qui assure le transport antérograde et rétrograde respectivement. Chez les souris SOD1 mutées, le défaut du transport axonal se produit dans les premières phases de la maladie (Bilsland et al., 2010; Kieran et al., 2005; De Vos et al., 2007; Williamson and Cleveland, 1999) supportant l'hypothèse que la dérégulation du transport axonal joue un rôle dans la physiopathologie de

la SLA. Les mécanismes sous-jacents du défaut du transport axonal dans les modèles de souris SOD1 mutée sont inconnus, mais sont susceptibles d'avoir plusieurs conséquences. L'altération de la fonction mitochondriale entraîne une diminution du transport mitochondrial et pourrait donc entraîner des défauts de transports d'autres éléments en raison de la demande en énergie du transport axonal. Des facteurs de nécrose tumorale (TNF α et FasL), qui est élevée chez les souris SOD1 mutées (Kiaei et al., 2007) perturbent la fonction de la kinesine via un mécanisme impliquant la protéine MAPK p38 (Veglianese et al., 2006) dont l'activation a été démontrée dans des modèles de SLA (Ackerley et al., 2004).

Un ralentissement du transport axonal est détecté très tôt chez des souris transgéniques SOD1 G37R et G85R, de sorte que le transport de la tubuline, des neurofilaments et d'autres composants est ralenti au niveau des axones des motoneurones (Williamson and Cleveland, 1999; Zhang et al., 1997). Il a également été rapporté une altération du transport axonal (lent et rapide) chez des sujets atteints de SLA sporadique. En effet, le transport lent des neurofilaments dans la partie proximale des axones et leur accumulation dans le corps cellulaire des motoneurones sont liés à la pathogenèse de la SLA (Sasaki et al., 2005).

Les neurofilaments (NF) constituent les protéines de structure les plus importantes des motoneurones. L'accumulation et l'assemblage aberrants de neurofilaments sont des caractéristiques retrouvées dans des cas familiaux et sporadiques de la SLA (Rao and Nixon, 2003). La création de plusieurs modèles de souris transgéniques a permis de mettre en évidence que la modulation des quantités des différentes sous-unités des NF peut générer un phénotype de type SLA (Larivière and Julien, 2004). En outre, le croisement des souris transgéniques modèles de SLA avec des souris surexprimant ou déficientes pour certaines sous-unités des NF, s'est avéré protecteur pour les motoneurones (Couillard-Després et al., 1998; Kong and Xu, 2000; Williamson et al., 1998). L'accumulation de NF dans le corps cellulaire du neurone auraient un effet protecteur, tandis que l'accumulation dans l'axone, bloquant le transport axonal, serait nocif (Julien and Beaulieu, 2000)). Ces données suggèrent que des anomalies de ratio et d'organisation des NF seraient des facteurs de risque dans la SLA.

Finalement, une explication complémentaire au dysfonctionnement du transport axonal rétrograde détecté aux stades précoces de la maladie (Williamson and Cleveland, 1999), impliquerait les complexes de dynéine et de dynactine (complexes protéiques permettant le déplacement des vésicules dans les axones et les dendrites). La mutation du

gène de la dynéine chez la souris provoque une maladie progressive du motoneurone (Hafezparast et al., 2003). Chez l'homme, une mutation ponctuelle de la sous-unité p150 de la dynactine a été observée chez quelques patients (Münch et al., 2004).

I.7.3. Dysfonctionnement mitochondrial

Les mitochondries présentent la source principale d'énergie sous forme d'ATP et leur fonctionnement normal est crucial pour les motoneurones qui sont les neurones portant les plus longs neurites du corps et dont le métabolisme est très élevé. Les anomalies mitochondriales des motoneurones sont les premiers signes pathologiques détectés tant chez certains modèles de souris transgéniques SOD1 mutée (G93A ou G37R) que chez des patients atteints de SLA, et ce avant l'apparition des symptômes cliniques. Il s'agit d'une vacuolisation des mitochondries dans les terminaisons des axones moteurs mais également dans le muscle des patients (Wiedemann et al., 2002). Il a été rapporté dans la moelle épinière que SOD1 mutée est recrutée sélectivement par les mitochondries. SOD1 mutée est accumulée sur la face cytoplasmique des mitochondries et par la suite, importée dans l'espace intermembranaire (Liu et al., 2004). Cette accumulation est indépendante de l'activité de SOD1 mutée. Elle contribue à l'altération de la fonction mitochondriale en s'agrégeant sur les composants membranaires mitochondriaux et/ou dans l'espace intermembranaire (Liu et al., 2004). Il a également été trouvé un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire associé à des dommages oxydatifs des protéines et des lipides des mitochondries dans les tissus provenant de patients atteints de la SLA (Wiedemann et al., 2002) et dans des modèles SOD1 mutée (Mattiazzi et al., 2002).

Le dysfonctionnement mitochondrial pourrait favoriser l'activation du mécanisme d'apoptose dans les motoneurones via la libération de cytochrome c (Zhu et al., 2002). Le transport axonal des mitochondries est altéré dans des modèles expérimentaux de la SLA, et il est possible que la réduction du nombre de mitochondrie distale de l'axone, combinée à une fonction mitochondriale altérée, conduise à une mort par axonopathie (Devos et al., 2004; De Vos et al., 2007). Le rôle de la mitochondrie dans la pathogenèse de la SLA est très probable et est en accord avec les effets bénéfiques de la minocycline (Van Den Bosch et al., 2002; Zhu et al., 2002), dérivé de la tétracycline inhibant entre autre le relargage du cytochrome c (Kriz et al., 2002), et de la créatine (Klivenyi et al., 1999), qui augmente les capacités de stockage d'énergie et bloque l'ouverture des pores de transition mitochondriaux, sur la progression de la maladie dans les lignées transgéniques.

I.7.4. Autophagie

L'autophagie est un processus de dégradation qui implique l'élimination intracellulaire des protéines et des organites par les lysosomes. Il s'agit d'un processus conservateur et joue un rôle crucial dans la croissance cellulaire et le développement, et le maintien de l'homéostasie cellulaire en particulier dans des situations induites par le stress. Des études suggèrent que l'autophagie peut contribuer à la SLA en tant que l'un des facteurs initiaux. Des études indiquent que la clairance de l'autophagie des mutants SOD1 peut retarder la perte des motoneurones dans la SLA (Crippa et al., 2010; Hetz et al., 2009). In vitro, l'induction de l'autophagie par la rapamycine montre une diminution des agrégats SOD1 et de la toxicité par SOD1 (Kabuta et al., 2006). Par conséquent, il existe une possibilité que SOD1 mutée interagisse avec des modulateurs autophagiques à promouvoir la neurodégénérescence alors que la clairance des agrégats autophagiques SOD1 pourrait être bénéfique pour la survie des motoneurones (Banerjee et al., 2008). Les études sur les modèles transgéniques de SLA de souris et sur les patients SLA montrent une augmentation des marqueurs autophagiques. Le niveau de LC3-II augmente dans les souris SOD1G93A dans la moelle épinière (Li et al., 2008; Morimoto et al., 2007), et le taux de LC3-II commence à augmenter à l'âge de 90 jours où la souris SLA montre des symptômes cliniques modeste, et atteint son apogée à l'âge de 120 jours (Zhang et al., 2011). Une relation entre l'autophagie et la SLA est confirmée mais il est encore controversé de savoir si l'activation de l'autophagie est bénéfique ou néfaste pour la dégénérescence des motoneurones.

I.7.5. Agrégation des protéines

Les agrégats protéiques représentent une caractéristique commune à toutes les formes de la SLA et sont fréquemment présents dans les motoneurones de la moelle épinière des patients atteints de SLA. La SLA partage donc avec d'autres maladies neurodégénératives la présence d'agrégats protéiques intracellulaires (ex. Maladies de Parkinson et d'Alzheimer). Différentes protéines ont été identifiées dans ces agrégats y compris les filaments intermédiaires tels que les neurofilaments et la périphérine (Larivière and Julien, 2004), la protéine SOD1, les protéines kinases telles que la p38MAPK (Bendotti et al., 2004) et la Cdk5 (Nakamura et al., 1997), la TDP-43 (Arai et al., 2006), l'ubiquitine ainsi que d'autres composants (Wood et al., 2003). Il reste à identifier si ces protéines sont directement impliquées dans la formation d'agrégats ou tout simplement piégées à l'intérieur.

Des agrégats (ou inclusions) protéiques immunoréactifs pour SOD1 mutée sont détectés au niveau des tissus provenant de patients présentant une mutation de SOD1 et des souris transgéniques SOD1 mutée et dans des cultures cellulaires exprimant divers mutants de SOD1 (Bruijn et al., 1998; Durham et al., 1997; Johnston et al., 2000; Wang et al., 2002; Watanabe et al., 2001). En outre, l'agrégation peut impliquer la forme native de la protéine SOD1 (wild-type), ce qui pourrait amplifier la toxicité et accélérer la maladie (Deng et al., 2006; Furukawa et al., 2006). Dans les cas sporadiques de SLA non mutés pour SOD1, de tels agrégats se retrouvent dans les motoneurones ainsi que les astrocytes (Bruijn et al., 1998). Ils ne contiennent pas de protéines SOD1 mais sont immunoréactifs pour l'ubiquitine, dorfine et des molécules chaperonnes telles que Hsp40 et Hsp70 (Niwa et al., 2002).

On ignore si les agrégats protéiques sont toxiques ou bénéfiques pour les motoneurones en séquestrant les facteurs toxiques. Ils pourraient être toxiques pour ces motoneurones en piégeant des protéines essentielles à leur survie ou en formant un obstacle mécanique interférant avec le transport cellulaire. À titre d'exemple, les agrégats de neurofilaments nuisent au transport axonal et conduisent à la dégénérescence des motoneurones (Côté et al., 1993; Xu et al., 1993).

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la formation et le rôle de ces agrégats intracellulaires dans la SLA. Certaines conditions, comme le stress oxydatif, pourraient induire des changements de conformation ainsi que des dommages oxydatifs (carbonylation, nitration) sur les protéines telles que SOD1 ou les protéines du cytosquelette favorisant la formation d'agrégats (Casoni et al., 2005; Crow et al., 1997; Ezzi et al., 2007; Ferrante et al., 1997). Les agrégats intraneuronaux peuvent se former lorsque la machinerie de dégradation protéique à savoir la voie de l'ubiquitine protéasome est défectueuse. L'activité catalytique du protéasome est réduite dans la moelle épinière de souris transgéniques SOD1, dans les motoneurones et les astrocytes des patients SLA et dans des cellules en culture exprimant la SOD1 mutée (Casoni et al., 2005; Kabashi et al., 2004; Mendonça et al., 2006; Urushitani et al., 2002).

Le protéasome est un assemblage multiprotéique qui dégrade les protéines selon un mécanisme ATP-dépendant. Il est formé de deux complexes distincts, les complexes protéasome 20S et 19S (Benaroudj, 2005). Le complexe 19S est responsable de la reconnaissance des protéines destinées à la dégradation qui sont généralement associées à une chaîne de molécules d'ubiquitine. En effet, au stade présymptomatique de la SLA, une

réduction de l'activité du protéasome a été détectée chez des souris transgéniques SOD1-G93A au niveau de la moelle épinière lombaire (Kabashi et al., 2004). La séquestration du protéasome au sein d'agrégats contenant SOD1 mutée, a également été mise en évidence (Matsumoto et al., 2005). Une autre étude a montré que les motoneurones sont très sensibles à l'inhibition du protéasome (Urushitani et al., 2002). Ces données supportent le rôle du dysfonctionnement protéolytique du protéasome dans la mort neuronale chez les patients atteints de SLA familiale.

II. Les voies de l'Ubiquitine et des Ubiquitines-like

Les modifications post-traductionnelles jouent un rôle fondamental dans la physiologie cellulaire, et de fait leur anomalie a pu être directement impliquée dans de très nombreuses pathologies. En effet ces modifications permettent très souvent aux protéines néo-synthétisées d'acquérir leur structure tertiaire fonctionnelle. Elles peuvent aussi permettre à une protéine d'acquérir une nouvelle fonction (permettant de nouvelles interactions, une nouvelle localisation subcellulaire), de réguler sa fonction (activation ou inactivation), ou encore de réguler sa demi vie. Les modifications des protéines cellulaires par liaison à des protéines ubiquitine (Ub) ou ubiquitine-like (Ubl) en constituent un très bel exemple. De très nombreuses protéines sont en effet les cibles de systèmes enzymatiques, appelées voies de l'ubiquitine ou voies des ubiquitines-like, qui vont permettre de modifier leur fonction ou de les marquer pour les diriger vers le protéasome pour dégradation.

II.1. La voie de l'Ubiquitine

L'Ubiquitine est une protéine de 76 résidus d'acides aminés, Elle a ainsi été appelée parce qu'elle est localisée dans tous les compartiments subcellulaires de toutes les cellules des organismes (procaryotes, eucaryotes). Dans le génome humain l'Ubiquitine est codée par quatre gènes, *UBB*, *UBC*, *UBA52* et *RPS27A*. Les gènes *UBB* et *UBC* codent des précurseurs de polyUbiquitines alors que les gènes *UBA52* et *RPS27A* codent une seule copie de l'Ubiquitine fusionnée à une protéine ribosomale L40 ou S27a, respectivement.

Les Dr Avram Hershko, Aaron Ciechanover et Irwin Rose ont obtenu en 2004 le Prix Nobel de Chimie pour avoir découvert au début des années 1980 l'un des processus cycliques les plus importants dans les cellules; la dégradation des protéines contrôlée par la voie de l'Ubiquitine. Depuis cette date la voie de l'Ubiquitine a été impliquée dans beaucoup d'autres mécanismes physiologiques.

II.1.1. Le cycle

La voie de l'Ubiquitine comprend plusieurs étapes enzymatiques successives qui permettent au final le couplage de l'Ubiquitine à une protéine cible (Figure 3).

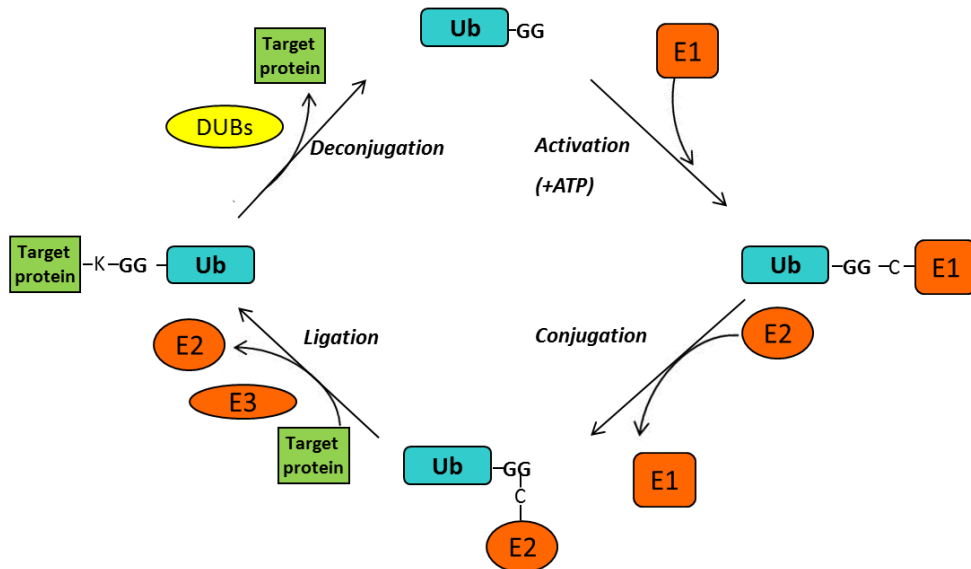


Figure 3 : La voie de l'ubiquitine. La voie de l'ubiquitine (Ub) nécessite l'activité de quatre enzymes : Les enzymes E1 d'activation, les enzymes E2 de conjugaison, les enzymes E3 de liaison de l'ubiquitine à la protéine cible (target protein) et les DUBs permettant le recyclage de l'Ubiquitine liée en Ubiquitine libre.

Dans ce cycle, l'Ubiquitine doit d'abord passer par une étape de maturation avant d'être prise en charge par la machinerie d'ubiquitylation (Reyes-Turcu and Wilkinson, 2009). Dans un premier temps, une enzyme d'activation (E1) assure l'adénylation du résidu glycine G76 de l'Ubiquitine en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et d'un ion magnésium (Mg^{2+}) (Ciechanover et al., 1980; Hershko et al., 1980). L'Ubiquitine activée subit une attaque nucléophile de la cystéine catalytique de l'enzyme E1, suite à la déprotonation de son groupement sulfhydryle (Cys-SH) donnant un anion thiolate (Cys-S⁻). Une liaison thioester covalente de haute énergie est ainsi formée entre l'enzyme E1 et l'ubiquitine (Ciechanover et al., 1981, 1982). Cette dernière est par la suite transférée à la cystéine catalytique d'une enzyme de conjugaison (E2) lors d'une réaction de transthiolation. Dans la majorité des cas, l'enzyme de conjugaison E2 chargée (E2-Ub) est reconnue par une enzyme de liaison (E3) (Haas et al., 1988; Hershko et al., 1983). La caractéristique générale des enzymes de liaison est de faciliter la formation d'un lien isopeptidique entre l'Ubiquitine et la protéine cible (Zimmerman et al., 2010). Ce lien covalent s'établit entre le groupement carboxyle du dernier résidu de l'Ubiquitine (G96) et le groupement ε amine d'un résidu lysine de la protéine cible.

II.1.2. Les enzymes

II.1.2.1. Les enzymes d'activation E1

Les enzymes d'activation E1 initient le mécanisme de modification post-traductionnelle. La plupart des enzymes E1 présentent des structures tridimensionnelles et des mécanismes d'activation similaires ; elles sont au nombre de huit chez l'homme (Schulman and Harper, 2009). Certaines enzymes d'activation E1 présentent la particularité de prendre en charge plusieurs des Ublps (Ubiquitin-like proteins) de différentes familles. Il semble que le mécanisme d'activation des Ublps soit très conservé, puisqu'il est retrouvé chez les procaryotes comme *Escherichia coli* (Gavin et al., 2012).

Les enzymes d'activation E1 de l'Ubiquitine comportent trois domaines principaux: un domaine d'adénylation, un domaine catalytique (Cys) et un domaine UFD (Ubiquitin-Fold Domain) (Lee and Schindelin, 2008; Lois and Lima, 2005; Walden et al., 2003). Le domaine d'adénylation peut être composé de deux protéines. C'est au sein de ce domaine que se produit l'activation de l'Ubiquitine. Cette dernière est par la suite transférée sur la cystéine catalytique de l'enzyme (Olsen et al., 2010). Le domaine UFD sert au recrutement de l'enzyme de conjugaison E2 (Huang and Schulman, 2005; Lois and Lima, 2005). Ces domaines sont liés entre eux par des régions flexibles permettant des changements de conformation essentielles à la fonction de l'enzyme E1.

II.1.2.2. Les enzymes de conjugaison E2

Les familles des enzymes E2 de la voie de l'Ub/Ub-like comporte 37 membres comme l'équipe l'a montré (Michelle et al., 2009). La vaste majorité d'entre elles (37) est dédiée au processus d'Ubiquitylation (Michelle et al., 2009; van Wijk and Timmers, 2010). Leur nombre, qui est plus important que celui des enzymes d'activation, reflète une spécialisation de leur fonction. En effet, les enzymes de conjugaison E2 servent d'intermédiaires dans le processus de modification post-traductionnelles en interagissant, dans un premier temps, avec les enzymes d'activation E1 et une fois liées à l'Ub ou Ublp, avec les multiples enzymes de liaison E3 (Wenzel et al., 2011). Ces interactions sont considérées comme consécutives car les enzymes d'activation E1 et les enzymes de liaison E3 reconnaissent une surface similaire sur les enzymes de conjugaison E2 (Eletr et al., 2005). Toutes les enzymes de conjugaison E2 possèdent un domaine catalytique UBC (UBiquitin Conjugating) de cent cinquante résidus d'acides aminés environ où réside le site actif (Winn

et al., 2004). Mis à part la poche catalytique constituée de résidus relativement conservés entourant la cystéine active, la composition de la séquence primaire du domaine catalytique de conjugaison diffère grandement entre les différentes enzymes E2 (Tolbert et al., 2005). Néanmoins, le domaine catalytique de toutes les enzymes E2 présente une structure tridimensionnelle similaire et compacte (van Wijk and Timmers, 2010). Ce domaine est constitué de quatre hélices α , d'une petite hélice 3_{10} située à proximité du site actif, et d'un feuillet β formé de quatre brins β antiparallèles (Figure 4).

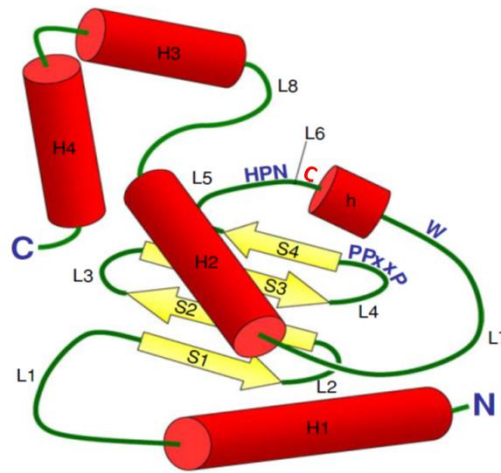


Figure 4 : Schéma de la structure tridimensionnelle du domaine UBC des enzymes de conjugaison E2. Les hélices α (H1 à H4) sont représentées par des cylindres rouges. Les brins β (S1 à S4) sont représentés par des flèches jaunes. Les boucles sont numérotées de L1 à L8 et les résidus fortement conservés sont indiqués dont la cystéine catalytique indiquée en rouge. (D'après Michelle et al. ; 2009)

Les enzymes E2 sont souvent la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles qui modulent leurs activités (Scott et al., 2011). Ainsi UBC7 est adressé au protéasome lorsque sa cystéine catalytique est liée à une chaîne de poly-Ubiquitine (Ravid and Hochstrasser, 2007). La modification du résidu lysine 92 de l'enzyme UBE2N par ISG15 (interferon-stimulated protein of 15 kDa) inhibe sa capacité à former un lien thioester avec l'Ubiquitine (Zou et al., 2005). La SUMOylation de l'enzyme E2 UBE2K sur son résidu K14 inhibe son interaction avec l'enzyme d'activation UBA1 (Pichler et al., 2005).

II.1.2.3. Les enzymes de liaison E3

On estime le nombre de gènes humains codant des enzymes de liaison E3 à plus de 600 (Deshaies and Joazeiro, 2009). La grande diversité des cibles protéiques explique probablement le très grand nombre d'enzymes E3. L'E3 peut être considérée comme une protéine d'échafaudage (Buday and Tompa, 2010). En effet, celle-ci interagit à la fois avec l'enzyme de conjugaison E2 liée à une Ub/ Ublp et avec une protéine cible via des domaines distincts. Une des caractéristiques majeures des enzymes E3 est leur organisation en multi-domaines. Ces différents domaines peuvent faire partie de la même chaîne peptidique, comme pour la ligase E3 RAD18 (RADiation sensitivity protein 18) ou bien de chaînes peptidiques différentes comme les ligases E3 Cullin-RING composées de complexes protéiques (Zheng et al., 2002).

Les enzymes E3 peuvent être classées en deux principales familles : les ligases à domaine RING (Really Interesting New Gene) et les ligases à domaines HECT (Homologous to E6-associated protein C-terminus) (Deshaies and Joazeiro, 2009; Rotin and Kumar, 2009). Bien que les domaines HECT et RING soient structurellement différents, ceux-ci sont reconnus par la même région de l'enzyme de conjugaison E2.

Les ligases E3 à domaines HECT présentent une similarité avec les enzymes d'activation E1 et de conjugaison E2. Ainsi avant d'aboutir à la modification du substrat protéique cible, un lien thioester est formé entre l'Ubiquitine et une cystéine active située au sein d'un domaine HECT multilobé (Scheffner et al., 1995). Alors que la région d'interaction avec la protéine cible, située en N-terminal de l'E3, le domaine HECT (environ trois cent cinquante résidus) qui interagit avec l'E2 et l'Ubiquitine est toujours localisé en C-terminal (Huang et al., 1999; Ogunjimi et al., 2010). Avec seulement une trentaine de membres répertoriés chez l'humain, la famille des E3 à domaine HECT ne représente qu'un faible pourcentage de l'ensemble des E3.

La plupart des recherches actuelles portent sur la famille des E3 à domaines RING (Lorick et al., 1999) telles que les E3 à domaines U-box (Ubiquitin Fusion Degradation protein2-box) (Hatakeyama and Nakayama, 2003) et à domaines SP-RING (Siz/Protein Inhibitor of Activated STAT/RING) (Jackson, 2001). Ces enzymes représentent plus de 95% de l'ensemble des E3 connus. Dans la majorité des cas connus, les E3 à domaines RING semblent participer à l'ubiquitinylation de la protéine cible sans formation de lien thioester avec l'Ubiquitine. Le modèle actuel propose que le rôle principal des E3 de type RING serait

d'augmenter la probabilité de réaction d'ubiquitylation des protéines cibles pour les E2 en stabilisant le complexe substrat/E2/Ubiquitine (Deshaies and Joazeiro, 2009; Petroski and Deshaies, 2005). En effet, les E3 possèdent un domaine RING qui contacte l'enzyme de conjugaison E2, mais aussi un ou plusieurs autres domaines impliqués dans l'interaction avec la cible. Ces enzymes sont des protéines à multi-domaines qui peuvent être classées en une trentaine de sous-familles selon la nature et l'organisation des domaines ou motifs qu'elles contiennent (Deshaies and Joazeiro, 2009). La fonction des ligases E3 peut être modulée, entre autres, par leur oligomérisation, leurs interactions avec d'autres protéines ou par des modifications post-traductionnelles.

II.1.2.4. Les enzymes de désubiquitylation

L'ubiquitylation des protéines est un processus réversible. Les enzymes de désubiquitylation (DeUBiquitinases (DUBs)), clivent la liaison iso-peptidique entre l'Ubiquitine et la protéine ubiquitylée. Il existe plus d'une centaine de DUBs de différents types ; celles-ci reconnaissent l'Ubiquitine ou les différentes chaînes poly-Ubiquitines liées aux protéines. Cette reconnaissance se fait via la présence de motifs d'interaction non-covalente avec l'Ubiquitine. En fonction du type de motifs et de leur agencement, les DUBs reconnaissent différents types de chaînes poly-Ubiquitines (Reyes-Turcu and Wilkinson, 2009).

II.1.3. Interactions de l'Ubiquitine avec les protéines

II.1.3.1. Fonctions associées à l'Ubiquitylation des protéines

L'Ubiquitylation d'un résidu lysine d'une protéine est encore souvent associée à un signal inducteur de dégradation de cette protéine cible par le protéasome tel que rapporté il y a plus de vingt ans (Chau et al., 1989; Eytan et al., 1989; Gregori et al., 1990). Afin de cibler la protéine Ubiquitylée vers le protéasome, que celle-ci doit être poly-Ubiquitylée (chaîne d'au moins quatre Ubiquitines) (Komander and Rape, 2012).

Le type d'Ubiquitylation (mono-ubiquitylation, multi-ubiquitylation, ubiquitylation en amino-terminal ou poly-ubiquitylation des protéines), ainsi que le type de chaîne formée font partie des facteurs qui déterminent le sort des protéines modifiées et les processus biologiques qui en résultent (Komander and Rape, 2012) (Figure 5).

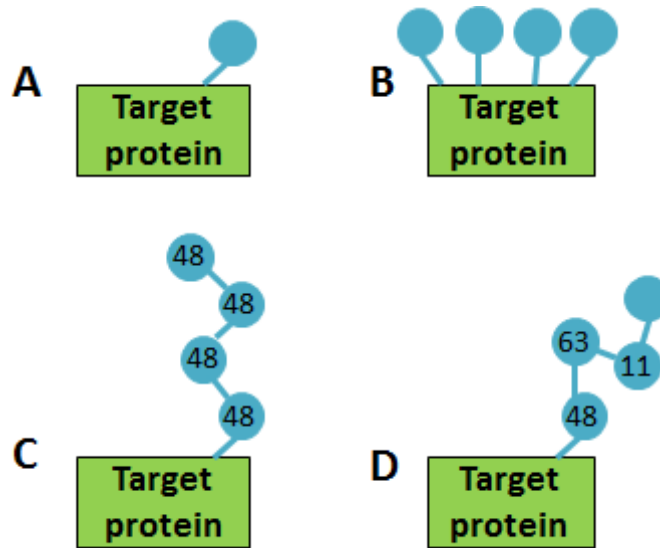


Figure 5 : Les différentes topologies d'ubiquitylation. A-Mono-ubiquitylation, B-Multi-mono-ubiquitylation, C-Chaîne d'ubiquitine homogène, D-Chaîne d'ubiquitine mixte, (d'après Komander and Rape, 2012)

À ce jour, des fonctions spécifiques ont été associées à chacune des formes d'ubiquitylation caractérisée. Ainsi, la mono-ubiquitylation des protéines est associée aux processus d'endocytose, d'activation de la transcription, mais aussi à la réparation de l'ADN (Hicke, 2001). La multi-ubiquitylation est, elle aussi, associée à l'endocytose (Mukhopadhyay and Riezman, 2007). Bien que la poly-ubiquitylation des protéines soit majoritairement associée à la dégradation des protéines via la protéasome, celle-ci est aussi reliée à différents processus biologiques en fonction du type de lien formé au sein de la chaîne de poly-Ubiquitines. Les sept résidus lysine sont autant de sites de couplage permettant la formation de chaînes de poly-Ubiquitines distinctes (Figure 6) (Komander and Rape, 2012). Le positionnement de ces sites de couplage influence la topologie des chaînes de poly-Ubiquitines qui en résultent. Ainsi, les chaînes d'Ubiquitines issues du couplage covalent sur les résidus lysine K48 et K63 ont été les plus étudiées car étant les plus abondamment formées dans les cellules (Peng et al., 2003). Les chaînes de poly-Ubiquitines (K6) sont associées à la réparation et à la réplication de l'ADN (Morris, 2010). Les chaînes de poly-Ubiquitines via le résidu K11 ont été associées à la dégradation de protéines au cours du cycle cellulaire (APC/C) mais aussi à la dégradation des protéines endosomales (ERAD pour **E**ndoplasmic **R**eticulum **A**ssocited protein **D**egradation) (Jin et al., 2008; Xu et al., 2009).

Les chaînes de poly-Ubiquitines (K29) sont quant à elles, associées à la dégradation via le lysosome (Mastrandrea et al., 1999). Les chaînes de poly-Ubiquitines (K48) sont impliquées dans la dégradation des protéines par le protéasome. Finalement, les chaînes (K63) sont, elles, majoritairement impliquées dans les processus de réparation de l'ADN et de régulation de kinases (Shambharkar et al., 2007).

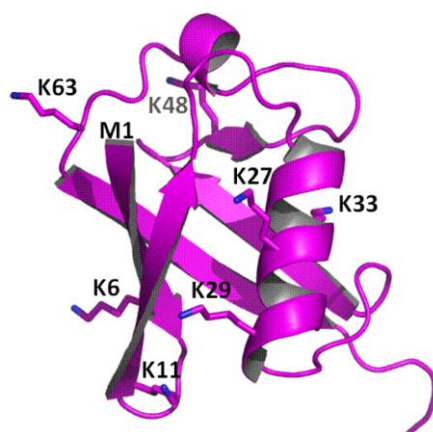


Figure 6 : Position des lysines sur la molécule d'Ubiquitine pouvant se lier à des protéines cibles

II.1.3.2. Fonctions associées à l'interaction non-covalente de l'Ubiquitine avec les protéines

On recense plus d'une vingtaine de motifs ou de domaines différents, pour lesquels une interaction non covalente avec l'Ubiquitine a été déterminée (Tableau 4). La majorité des protéines exposant ces domaines sont associées à la machinerie d'ubiquitylation ou bien à la dégradation protéique via le protéasome (Husnjak and Dikic, 2012). Ces régions nommées Ubiquitin Binding Domains (UBDs) sont donc considérées comme des décodeurs/traducteurs du code de l'Ubiquitine. Ces UBDs (Ubiquitin Binding Domains) peuvent se classer en quatre groupes, en fonction de la nature du domaine qui lie l'Ubiquitine. Un premier groupe forme des domaines constitués d'une ou de plusieurs hélices α (les UIM, pour Ubiquitin Interacting Motif et les UBA, pour UBiquitin Associated domain). Ce sont les UBDs les plus répandues. Un second groupe englobe des domaines de type doigts de zinc (A20 Zinc Finger, UBP ZF pour Ubiquitin-Binding Protein Zinc Finger et NZF pour Npl4 Zinc Finger). Une troisième catégorie regroupe des protéines arborant un domaine PH (Pleckstrin-Homology). Enfin, tel que précédemment abordé, certaines enzymes de conjugaison E2 interagissent de manière non-covalente avec l'Ubiquitine via la surface *backside* (région sur la surface opposée au site

actif) de leur domaine UBC. Finalement, un dernier groupe englobe des protéines distinctes qui interagissent avec l'Ubiquitine via un domaine spécifique à chacune d'entre elles.

	UBD	Structure du domaine	résidu reconnu	Intéraction
1er groupe	UBA	domaine de 3 hélices	I44	Mono/Poly-Ub (K48) et UBL
	CUE	domaine de 3 hélices	I44	Mono-Ub
	UIM	hélice α	I44	Mono/Poly-Ub (K48, K63) et UBL
	MIU/IUIM	hélice α	I44	Mono-Ub
	DUIM	hélice α	I44	Mono-Ub
	VHS	longue hélice α	I44	Mono-Ub
	GAT	domaine de 3 hélices	I44	Mono-Ub
2ème groupe	NZF	doigt de zinc Brin β	I44	Mono/Poly-Ub (K63)
	ZnF A20	doigt de zinc	D58	Mono-Ub
	ZnF UBP	doigt de zinc	L8 et I36	Poly-Ub
	UBZ	doigt de zinc ($\beta\beta\alpha$)	I44	Mono/Poly-Ub
3ème groupe	GLUE	domaine PH	I44	Mono-Ub
	PRU	domaine PH	I44	Mono/Poly-Ub et UBL
4ème groupe	UBC	Feuillet β	I44	Mono-Ub
	UEV	Feuillet β	I44	Mono-Ub
	UBM	hélice tour hélice	L8	Mono-Ub
	Jab1/MPN	domaine MPN	I44	Mono-Ub
	PFU	4 brins β et 2 hélices α	I44	Mono/Poly-Ub
	SH3	tonneau β	I44	Mono-Ub
	UBAN	dimère coiled coil	F4 et I44	di-Ub (M1)
	WD40b propeller	WD40b propeller	I44	Mono-Ub

Tableau 4 : Inventaire et caractéristiques des différentes UBDs interagissant avec l'Ubiquitine

Les conséquences moléculaires et fonctionnelles qui résultent de l'interaction de ces UBDs avec l'Ubiquitine sont très diverses et dépendent de nombreux facteurs (le type de chaînes d'Ubiquitine, la nature du domaine d'interaction, la voie de signalisation dans laquelle la protéine est impliquée etc...). Ainsi, et pour ne citer que quelques exemples, on retrouve des domaines d'interaction avec l'Ubiquitine dans beaucoup d'enzymes associées aux processus d'Ubiquitinylation. Parmi celles-ci, on compte plusieurs enzymes de

conjugaison E2 qui interagissent avec l'Ubiquitine via différentes interfaces (Brzovic and Klevit, 2006; Merkley and Shaw, 2004). Ces interactions sont importantes pour la formation de chaînes de poly-Ubiquitines. On compte aussi plusieurs enzymes de liaison E3 de différentes familles qui présentent des domaines/motifs d'interaction avec l'Ubiquitine. Ceux-ci permettent, entre autres, de faciliter l'élongation des chaînes de poly-Ubiquitines, de reconnaître des partenaires poly-ubiquitylés ou de favoriser l'ubiquitylation de substrats (Blankenship et al., 2009; Davies et al., 2004; Yagi et al., 2012). Différents types de domaines d'interaction avec l'Ubiquitine sont aussi retrouvés dans plusieurs des composantes du protéasome (Schreiner et al., 2008; Zhang et al., 2009). Ces domaines sont impliqués dans la reconnaissance spécifique de protéines poly-ubiquitylées qui seront dégradées par le protéasome.

II.1.4. Voie de l'ubiquitine et la SLA

La présence d'inclusions riches en Ubiquitine dans les motoneurones est une caractéristique neuropathologique retrouvée chez les patients SLA^f et SLA^s mais aussi dans des modèles animaux et cellulaire de la maladie (Bendotti et al., 2004; Leigh et al., 1991; Migheli et al., 1990). De nombreuses protéines cellulaires ont leur demi-vie régulée par le système Ubiquitine-protéasome, prévenant leur accumulation potentiellement toxique par la cellule. Le fait d'observer des inclusions intracellulaire contenant de l'Ubiquitine dans la SLA a été attribué à des perturbations du fonctionnement des voies Ub/Ub-like (Cheroni et al., 2005; Urushitani et al., 2002, 2004). Plusieurs études ont en effet montré une implication directe de ces voies dans cette pathologie.

Outre l'accumulation d'agrégats de protéines ubiquitylées dans les motoneurones, des changements dans la composition des sous-unités du protéasome ou des protéines liées à l'UPS (Ubiquitine Proteasome System) ont été démontrées chez les patients SLA et dans certains modèles animaux. Une étude a montré que l'accumulation de la protéine mutante SOD1 dans la moelle épinière de souris transgéniques de SOD1^{G93A} symptomatique est due à une altération de la dégradation de la protéine mutante SOD1 plutôt qu'à une augmentation des niveaux d'expression.

Par ailleurs plusieurs gènes mutés dans des cas des SLA codent des protéines qui, soit interagissent directement avec l'UPS comme VCP, FUS, UBQLN2, soit sont connues pour être dégradée par le protéasome, comme SOD1 et TDP43.

II.1.4.1. SOD1

Une étude a montré qu'au cours de la progression de la maladie, les souris transgéniques surexprimant SOD1^{G93C} accumulent sélectivement la protéine mutante dans la région ventrale de la moelle épinière, où sont situés les motoneurones, mais non dans l'hippocampe. Des immunocytochimies des moelles épinières de souris SOD1^{G93C} ont montré que la formation d'agrégats Ubiquitine positifs dans les motoneurones était en corrélation avec la progression de la maladie (Basso et al., 2006; Cheroni et al., 2005).

Les inclusions protéiques détectées chez les patients SLA et chez les modèles de souris contiennent des protéines de l'UPS. Les interactions possibles de SOD1 mutante avec certaines de ces molécules ont été étudiées plus en détail et sont présentées ci-dessous

Dorfin, une E3 ligase de type RING a été trouvée localisée dans les inclusions présentes dans les motoneurones de moelle épinière de patients SLAf et SLAs. En culture cellulaire, Dorfin peut sélectivement interagir avec SOD1 mutante, permettant sa poly-ubiquitinylation et sa dégradation, et protégeant ainsi les cellules de l'effet toxique de la protéine mutante (Niwa et al., 2002). L'activité E3 de Dorfin dépend de son interaction directe avec la protéine VCP, dont le gène a été trouvé muté chez des patients SLAf (Johnson et al., 2010). En fait VCP^{K524A}, une forme dominante de la protéine, réduit l'activité E3 de Dorfin sur SOD1 mutante (Ishigaki et al., 2004). Fait intéressant, l'expression de Dorfin est augmentée dans la moelle épinière de patients SLAs (Ishigaki et al., 2002) et colocalise avec VCP dans les inclusions dans les neurones de patients SLA (Ishigaki et al., 2004). Enfin le surexpression de Dorfin in vitro protège les cellules neuronales contre l'effet toxique de la protéine mutante SOD1 et réduit les inclusions de SOD1 (Niwa et al., 2002), tandis que chez les souris SOD1^{G93A}, il diminue les taux de SOD1 mutante dans la moelle épinière et améliore les symptômes neurologiques (Sone et al., 2010).

Gp78 est une E3 ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique et caractérisée par un domaine cytosolique RING-finger. Elle est impliquée dans la dégradation associée à l'ERAD (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) (Fang et al., 2001). Comme Dorphin, gp78 interagit physiquement avec VCP et cette interaction représente une voie de couplage de l'ubiquitinylation avec une retrotranslocation dans le cytosol qui conduit au protéasome. Dans un modèle de culture cellulaire, gp78 a été montré pour interagir avec la protéine mutante SOD1 provoquant son ubiquitinylation et sa dégradation via l'ERAD. Le knock-out de gp78 dans les cultures primaires de neurones de souris SLAf mutée pour SOD1

provoquent une augmentation de la mort cellulaire et la formation d'agrégats SOD1. De plus, l'expression de gp78 est augmentée dans la moelle épinière de souris SLAf mutée SOD1 avant l'apparition des symptômes et cette protéine colocalise avec les inclusions SOD1 positives (Ying et al., 2009).

NEDL1 (NEDDA-Like ubiquitin-protein ligase-1) est également une E3 à motif HECT qui s'exprime préférentiellement dans les tissus nerveux et qui interagit avec Trap δ (translocation associated protein δ), un composant du réticulum endoplasmique (RE) impliqué dans la translocation des protéines. Dans les motoneurones de moelle épinière dans les souris transgéniques SOD1 et chez les patients SLAf, la protéine SOD1 mutée, interagit avec le complexe NEDL1-Trap δ . Le degré d'ubiquitylation de SOD1 mutée par NEDL1 est en corrélation avec la gravité de la maladie (Miyazaki et al., 2004).

MITOL, aussi connu comme l'E3 MULAN (Mitochondrial E3 ubiquitin-protein ligase 1) ou Mdm30 (mitochondrial distribution and morphology protein 30), est localisée dans la membrane externe mitochondriale. Elle régule la dégradation des mutants SOD1 mal repliés dans la mitochondrie. L'accumulation et l'agrégation des mutants SOD1 dans les mitochondries ont été impliquées dans la toxicité neuronale des mutants SOD1 et dans la pathogénicité de la SLAf (Cozzolino et al., 2009). MITOL atténue la toxicité des mutants SOD1 en ubiquitylant sélectivement les mutants SOD1 mitochondriaux et conduisant à leur dégradation (Yonashiro et al., 2009).

II.1.4.2. TDP-43

Le facteur nucléaire TDP43 (TAR DNA-binding protein 43) a été identifié comme un composant majeur des inclusions ubiquitylées observés dans les SLAs (Neumann et al., 2006). Il a été suggéré que la redistribution cytoplasmique de TDP-43 serait un événement précoce dans la SLA, qui précéderait la formation d'inclusions d'Ubiquitine positives insolubles dans les motoneurones (Giordana et al., 2010). L'accumulation de TDP-43 ubiquitylées pourrait être une conséquence d'une déficience de l'UPS et/ou de l'autophagie. Une étude récente a montré que 2 enzymes de la voie de l'ubiquitine, UBE2E3 et UBPY, participent à la régulation de TDP-43 via son ubiquitylation (Hans et al., 2014).

II.1.4.3. FUS

Plusieurs études ont montré la présence de la protéine FUS dans les inclusions Ubiquitine positives dans la moelle épinière des patients SLA (Kwiatkowski et al., 2009;

Neumann et al., 2009; Tateishi et al., 2010). In vitro, l'expression de la protéine FUS sauvage ou mutée n'induit pas d'accumulation significative de dépôt d'Ubiquitine (Ito et al., 2011) conduisant à l'hypothèse que l'ubiquitinylation de FUS interviendrait à la fin du processus de formation des inclusions.

II.1.4.4. VCP

VCP est un facteur de chaîne multi-Ubiquitines de ciblage nécessaire pour transférer les protéines mal repliées vers le protéasome 26S pour la dégradation (Dai and Li, 2001). Des études récentes ont démontré in vitro que la dégradation de la protéine mutante SOD1 par le protéasome peut être médiée par un système complexe qui implique l'interaction de VCP avec le complexe CHIP et Bag-1 et des E3 dorfins, gp78 ou MITOL. Ainsi une modification de l'expression ou de l'activité de VCP pourrait expliquer l'accumulation de protéines ubiquitinylées dans les neurones moteurs dans la SLA.

II.1.4.5. UBQLN2

L'ubiquiline 2 est un membre de la famille de l'Ubiquiline, qui régule la dégradation des protéines ubiquitinylées. Elle contient un domaine analogue à l'Ubiquitine en N-terminal et un domaine associé à l'Ubiquitine en C-terminal. Cette protéine associe physiquement le protéasome 19s et les chaînes poly-Ubiquitines, liées à des protéines à dégrader. Deng et al. a montré une perte d'activité de l'UPS dans les cellules exprimant une forme mutée de l'Ubiquiline 2 (Deng et al., 2011).

II.2. La voie de la SUMOylation

La SUMOylation est une voie de modification post-traductionnelle des protéines proche dans son fonctionnement de la voie de l'ubiquitinylation (d'où son nom ubiquitin-like). Dans cette voie les petites protéines SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) sont liées de façon covalente à des protéines cibles. Contrairement à l'ubiquitinylation, la SUMOylation ne conduit pas directement à la dégradation des protéines même si elle peut y participer indirectement en régulant la balance ubiquitinylation/SUMOylation de ses cibles protéiques. La voie de la SUMOylation est principalement connue pour réguler les interactions protéine/protéine et donc leur activité, leur localisation intracellulaire et leur transport nucléo-cytoplasmique. Elle est aussi impliquée, tout comme la voie de

l'ubiquitinylation, dans les mécanismes épigénétiques de régulation de la compaction de la chromatine par modifications post-traductionnelles des histones des nucléosomes.

II.2.1. Les différents isoformes de SUMO

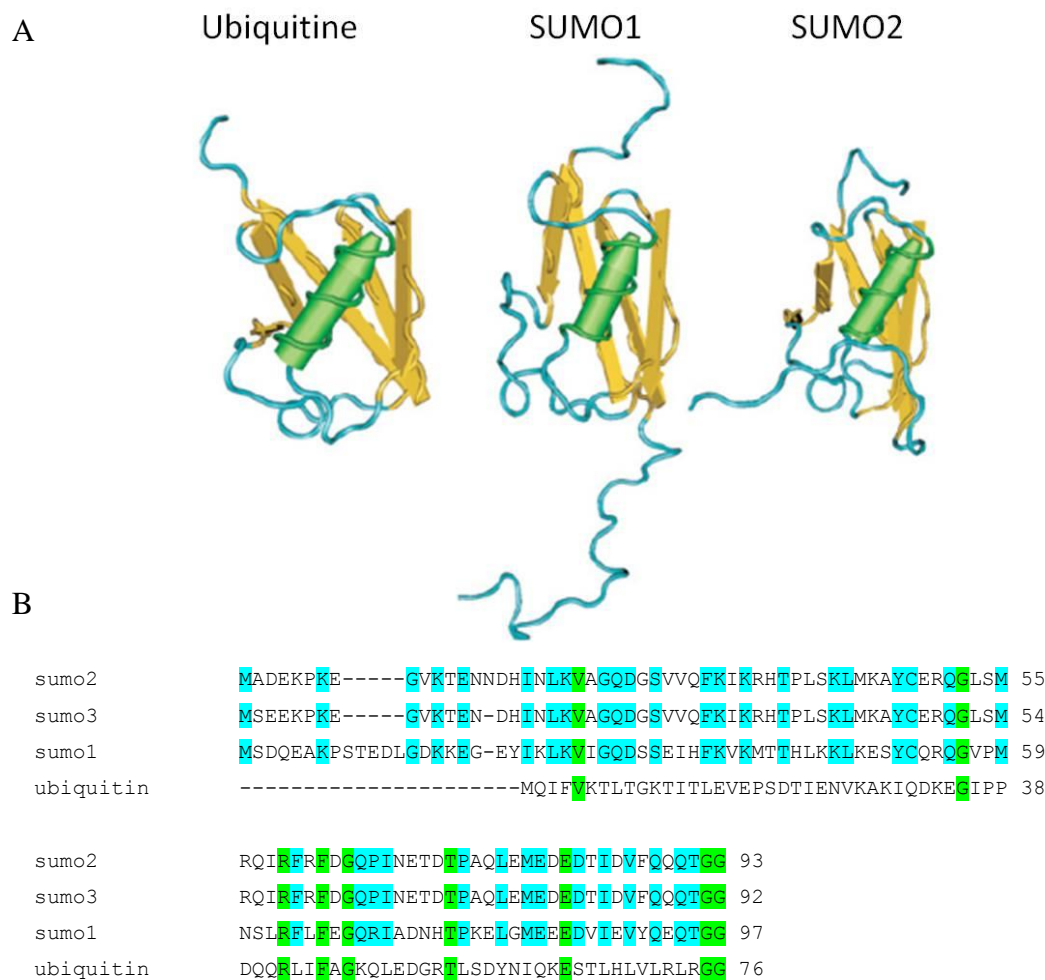


Figure 7: Structure et alignement de l'Ubiquitine, SUMO1, SUMO2 et SUMO3 A- Représentation schématisée de la structure tridimensionnelle des formes humaines de l'Ubiquitine et de SUMO1 et SUMO2 (Martin, 2009). B-Alignement des séquences primaires des protéines humaines Ubiquitine, SUMO1, SUMO2 et SUMO3 (logiciel ClustalW). En vert, résidus identiques pour les 4 protéines, en bleu résidus identiques pour les 3 isoformes de SUMO.

Les protéines SUMO sont aussi appelées Ubiquitin-like car même si SUMO1 par exemple ne présente que 18% d'identité de séquence avec la protéine Ubiquitine, leurs structures tridimensionnelles sont quasiment superposables (Figure 7). Il existe chez l'homme trois principales isoformes de SUMO (Lapenta et al., 1997). SUMO1 présente 50%

de similarité de séquence primaire avec SUMO2 et SUMO3, qui elles-mêmes présentent 95 % de similarité entre elles, (seulement 3 acides aminés différent entre ces 2 isoformes. SUMO4 présente une grande homologie avec SUMO2/3 (87%) mais son expression est limitée aux reins, à la ratte et aux ganglions lymphatiques (Bohren et al., 2004). Les gènes des différentes isoformes de SUMO sont localisés pour *SUMO1* en 2q33, *SUMO2* en 17q25.1, *SUMO3* en 21q22.3 et *SUMO4* en 6q25.

Les différentes isoformes de SUMO sont exprimées sous la forme de précurseurs qui vont subir une étape de maturation par un clivage d'une extension C-terminale effectuée par l'une des protéases spécifiques de SUMO, les SENPs (sentrin-specific protease). Ce clivage permet d'exposer les glycines C-Terminales requises pour la conjugaison des protéines cibles.

II.2.2. Le cycle

La voie de la SUMOylation est un cycle enzymatique réversible en plusieurs étapes. Elle est initiée par la formation ATP-dépendante d'un pont thioester entre la glycine C-terminale exposée de SUMO et une cystéine interne de l'enzyme E1 d'activation, un hétérodimère composé de 2 sous-unités (SAE1 et SAE2). SUMO activée est ensuite transférée par transestérification sur la cystéine catalytique de l'unique enzyme de conjugaison E2 de la voie de la SUMOylation, UBE2I. UBE2I a la capacité de reconnaître directement les protéines cibles et de catalyser la formation d'une liaison isopeptidique entre la glycine C-terminale de SUMO et le groupe ϵ -amine d'une lysine de la protéine cible. La conjugaison de SUMO est très spécifique. Le plus souvent SUMO se fixe sur une lysine comprise dans un motif consensus défini par le motif protéique $\psi KxE/D$; ψ correspondant à un résidu hydrophobe, x à un résidu quelconque et E/D au glutamate ou à l'aspartate respectivement. Les ligases E3 de la voie de la SUMOylation permettent d'accroître l'efficacité globale de la SUMOylation en augmentant la spécificité pour le substrat protéique cible. Cette réaction est réversible grâce aux protéases SENPs qui clivent la liaison SUMO-protéine cible (Figure 8).

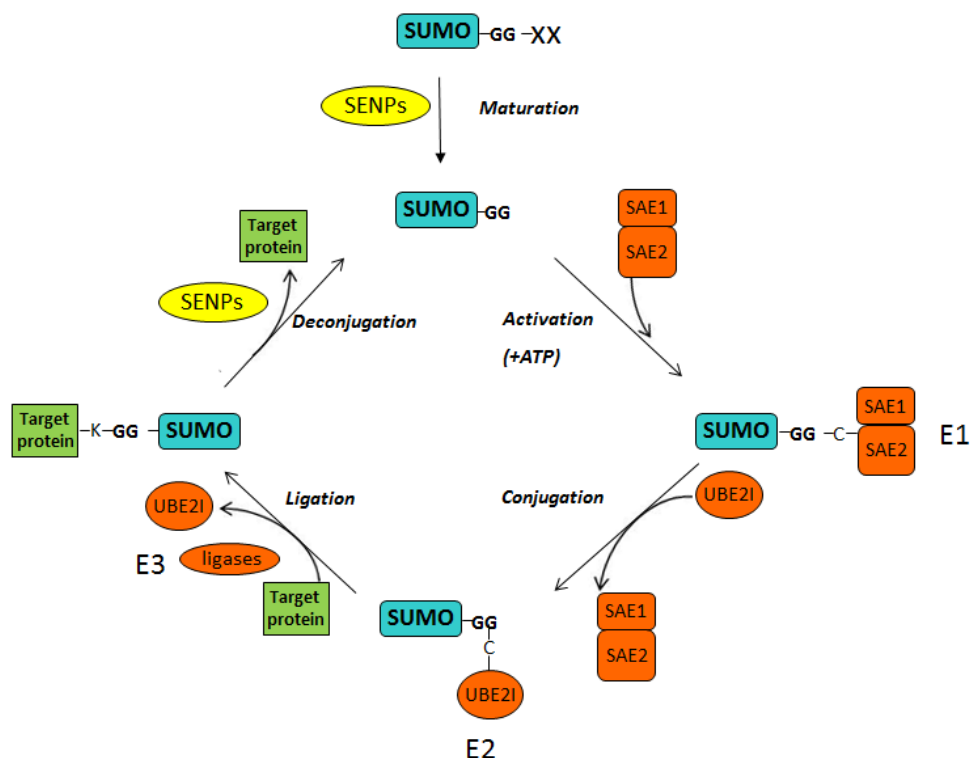


Figure 8 : La voie de la SUMOylation (Dangoumau et al., 2013). La voie de la SUMOylation est composée de quatre enzymes : L'enzyme E1 d'activation (SAE1/SAE2), l'enzyme E2 de conjugaison (UBE2I), les enzymes E3 de liaison de la protéine SUMO à la protéine cible (target protein) et les SENPs permettent le recyclage de SUMO liée en SUMO libre.

II.2.3. Les enzymes

II.2.3.1. Le complexe enzymatique d'activation E1

Contrairement à la voie de l'Ubiquitine, l'enzyme E1 d'activation de la voie de la SUMOylation catalyse une réaction en trois étapes. Le groupe carboxyle en C-terminal de SUMO réagit avec une molécule d'ATP, formant un groupement adénylate. Ensuite, le groupe thiol de la cystéine du site actif de l'E1 réagit avec le groupement adénylate de SUMO, libérant une molécule d'AMP et formant une liaison thioester de haute énergie entre l'enzyme E1 et SUMO. Enfin la protéine SUMO activée est transférée sur une cystéine de l'enzyme E2. La plupart des organismes contiennent une seule enzyme d'activation E1 pour SUMO. Cette enzyme existe sous la forme d'un complexe hétérodimérique, chaque monomère ayant des similarités avec des régions de l'enzyme E1 de l'Ubiquitine. La sous-unité SAE1 (SAE Aos1) possède des similarités avec la région N-terminale de l'E1 de l'Ubiquitine tandis que SAE2 (UBA2), deuxième sous unité du complexe, est similaire à l'extrémité C-terminale de l'E1 de l'Ubiquitine (Johnson and Blobel, 1997). Les monomères

ne sont jamais observés individualisés dans les cellules et par conséquent il est supposé qu'ils sont incapables de fonctionner de façon indépendante (Azuma et al., 2001).

II.2.3.2. L'enzyme de conjugaison E2

Dans la seconde étape de la voie de la SUMOylation, SUMO est transférée de l'enzyme E1 à la cystéine du site actif de l'enzyme de conjugaison E2, ceci en formant une liaison thioester. La présence d'une seule enzyme E2, UBE2I, dans la voie de la SUMOylation contraste avec l'existence de nombreuses E2 chez l'homme pour la voie de l'ubiquitinylation (Hayashi et al., 2002; Michelle et al., 2009).

II.2.3.3. Les enzymes de liaison E3

Un grand nombre de SUMO E3 ligases ont été découvertes. Elles ont été classées en trois familles : la famille des PIAS (protein inhibitor of activated STAT) (Hochstrasser, 2001), la famille de la protéine RanBP2 (Ran binding protein 2) (Pichler and Melchior, 2002) et la famille de la protéine Pc2 (Polycomb Pc2) (Kagey et al., 2003). Pour que ces protéines répondent à la définition d'une E3, elles doivent 1) se lier à l'E2, 2) se lier à une cible protéique et 3) favoriser le transfert de SUMO de l'E2 sur le substrat. Ces E3 ne forment pas d'intermédiaires covalents avec SUMO, mais semblent agir en approchant UBE2I et les cibles protéiques.

Le plus grand groupe de ligases E3 réunit les protéines PIAS codées par quatre gènes chez les mammifères : PIAS1, PIAS3, PIAS γ et PIAS x possédant deux isoformes issues d'un épissage alternatif, désignés PIAS $x\alpha$ (ARIP3) et PIAS $x\beta$ (Miz1) (Liu et al., 1998). PIAS1 et PIAS3 sont exprimés dans toutes les cellules de l'organisme alors que PIAS x et PIAS γ semblent avoir une expression principalement testiculaire (Gross et al., 2001). Les PIAS ont une région N-terminale (400 résidus) fortement conservée qui consiste en un domaine responsable de la liaison avec les domaines d'ADN riche en AT et un domaine SP-RING. Ce domaine ressemble aux domaines RING présent dans de nombreuses E3 de l'ubiquitinylation. Il se lie à UBE2I favorisant la SUMOylation (Schmidt and Müller, 2002). Les PIAS contiennent également des motifs d'interaction à SUMO (SIMs) qui peuvent se lier aux protéines SUMO (Rytinki et al., 2009). Les principales différences entre les protéines PIAS est en C-terminal. Il est probable que ces domaines C-terminaux interagissent avec des substrats spécifiques. Il a été montré que les différentes protéines PIAS SUMOylent un ensemble de substrats différents qui peuvent occasionnellement se chevaucher (Schmidt and

Müller, 2002). Par exemple PIAS1, PIAS3 et PIASy peuvent toutes promouvoir la SUMOylation de p53 (Kahyo et al., 2001; Schmidt and Müller, 2002).

Le deuxième groupe d'E3 ligases contient des protéines membres de la grande protéine de pore nucléaire spécifique des vertébrés RanBP2 (également appelé Nup358), qui se localise sur les fibrilles cytoplasmiques des pores nucléaires et contient plusieurs domaines fonctionnels (Pichler and Melchior, 2002). Le domaine E3, appelé domaine de répétition interne (IR), contient deux répétitions d'une séquence d'environ 50 résidus qui ne partage aucune similarité de séquence avec une quelconque E3 d'ubiquitylation. En plus d'avoir la capacité d'agir comme une E3 de la voie de la SUMOylation le domaine IR de RanGAP1 forme un complexe trimérique stable avec SUMO-domaine IR et UBE2I. Il est responsable de la localisation de SUMO-RanGAP1 aux pores nucléaires (Saitoh et al., 1998). RanBP2 lui-même peut également être sumoylée (Pichler and Melchior, 2002; Saitoh et al., 1998), ce qui permettrait son importation nucléaire.

La dernière famille d'E3 ligases de SUMOylation identifiée à ce jour est le groupe des protéines Polycomb (PcG) PC2 (Kagey et al., 2003). Les protéines PcG forment de grands complexes multimériques qui ont une activité de méthylation d'histone. Ils participent à la répression de la transcription. Pc2 SUMOyle le co-represseur de transcription CtBP localisé dans le noyau (Lin et al., 2003).

II.2.3.4. Les SENPs

La voie de la SUMOylation est un système dynamique qui change d'activité au cours du cycle cellulaire et en réponse à divers stimuli. Des enzymes de clivage de SUMO, les SENPs (isopeptidases) présentent au moins deux fonctions dans ce processus. Elles clivent la liaison entre SUMO et la cible protéique, ce qui rend la modification réversible. Elles fournissent également une source de SUMO libres pouvant être réutilisés. SUMO libre est générée à la fois à partir de SUMO nouvellement synthétisée, qui doit être clivée pour supprimer un court peptide C-terminal, et à partir de déSUMOylation de protéines SUMOylées. Ces deux sources de SUMO libres sont indispensables pour maintenir un niveau constant de SUMOylation. Toutes les SENPs contiennent un domaine C-terminal d'environ 250 acides aminés (domaine ULP) qui a une activité de clivage de SUMO (Mossessova and Lima, 2000). Par contre le domaine N-terminal est différent selon les SENPs. Il est responsable de la localisation cellulaire et est substrat spécifique (Mossessova and Lima, 2000)(Li and Hochstrasser, 2003) (Figure 9). Actuellement, six SUMO protéases ont été

identifiés chez l'Homme, SENP1 à 3 et SENP5 à 7 (Kamitani et al., 1998; Kim et al., 2002). En fonction de leur homologie, la famille des SENP peut être divisée en trois sous familles. SENP1 et SENP2 présentent une séquence conservée d'environ 40 résidus en amont du domaine catalytique. Elles constituent la première sous famille SENP. Le domaine catalytique de SENP3 est à 62% identique à celui de SENP5. Ces deux SENPs sont classées dans la deuxième sous-famille. La troisième sous-famille des SENPs est composée de SENP6 et SENP7 contenant une insertion de 80 résidus dans leur domaine catalytique.

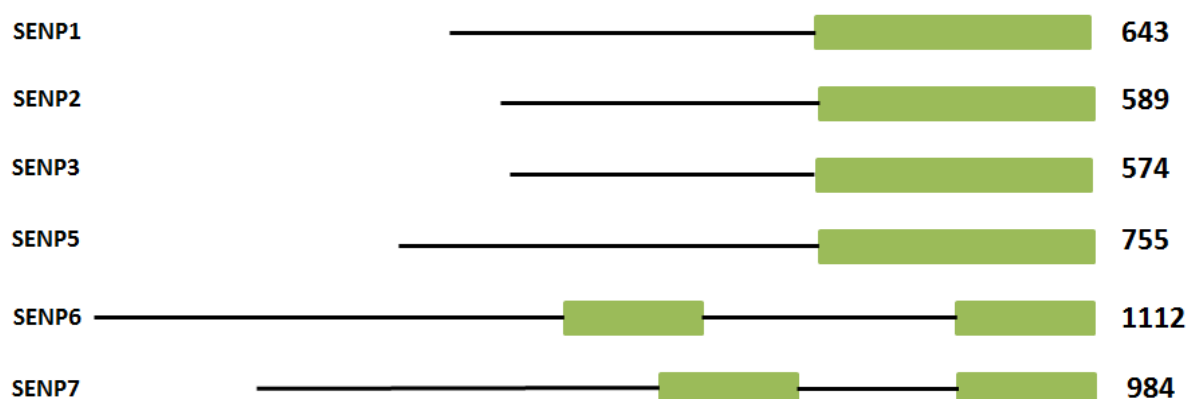


Figure 9 : Structure primaire des SENPs. Le domaine conservé ULP est représenté en vert (d'après Hwa Kim, 2008). Les chiffres représentent la taille en acides aminés.

SEN1 est localisée principalement dans le noyau à l'exclusion du nucléole. Elle contient un signal de localisation nucléaire (NLS) à l'intérieur de son extrémité N-terminale. EN plus du NLS, SEN1 dispose également d'un signal d'exportation nucléaire (NES) dans la région C-terminale, permettant d'effectuer un transfert nucléocytoplasmique. Les cibles de SEN1 incluent une grande famille de facteurs de transcription et leurs co-régulateurs tels que les récepteurs des androgènes et les histones désacétylases (Bawa-Khalfe et al., 2007). SEN1 est également responsable de la maturation et de la désSUMOylation de SUMO1. Dans les cellules déficientes en SEN1, on observe une accumulation de SUMO1 libres et de SUMO1 conjugués alors que SUMO2/3 et leurs conjugués restent stables (Yamaguchi et al., 2005). Les rôles biologiques de SEN1 sont étroitement associés au développement comme le montre un certain nombre d'études sur animaux transgéniques (Mukhopadhyay, 2007).

SENP2 est une protéase associée à la membrane nucléaire. Elle se trouve du côté nucléoplasmique du complexe du pore nucléaire (Hang and Dasso, 2002; Zhang et al., 2002). Comme SENP1, elle contient également une séquence NLS et NES et se comporte comme une protéine du transport nucléocytoplasmique. Elle est également sensible à l'ubiquitylation cytoplasmique et à la dégradation par le protéasome (Itahana et al., 2006).

SENP3 et SENP5 sont localisées dans le nucléole et ont une préférence pour la déSUMOylation de SUMO2 et 3 (Di Bacco et al., 2006; Gong and Yeh, 2006; Nishida et al., 2000). La distribution tissulaire par immunoblot dans différentes lignées cellulaires semble indiquer que SENP5 est présente principalement dans les cellules de la prostate (PC3), le sang (cellules HeLa), et les seins (MCF7) (Gong and Yeh, 2006). La surexpression de SENP5 conduit à l'inhibition de la prolifération cellulaire et à une altération de l'architecture nucléaire, ce qui suggère un rôle cruciale de SENP5 dans la mitose et /ou la cytokinèse (Di Bacco et al., 2006).

Les protéases SENP6 et SENP7 se trouvent dans le cytosol (Kim and Baek, 2009; Mukhopadhyay and Riezman, 2007). SENP6 est également située dans le noyau et présente une préférence pour le clivage des chaînes polymères de SUMO2/3. SENP6 et SENP7 présentent une activité hydrolytique similaire à SENP2 dans la réaction de déconjugaison de SUMO2/3 et dans les réactions de clivages des polymères SUMO2/3. Elles présentent une activité beaucoup plus faible pour la réaction de déconjugaison de SUMO1.

II.2.4. Les sites de SUMOylation des protéines

II.2.4.1. Les sites consensus de SUMOylation

Peu de temps après la caractérisation des enzymes impliquées dans le processus de SUMOylation, un site consensus de SUMOylation a pu être défini (Sternsdorf et al., 1999). Ce dernier a été caractérisé pour un très grand nombre de substrats protéiques.

Dans la majorité des cas la modification par SUMO d'un résidu lysine d'une protéine cible s'effectue si celui-ci se trouve au sein d'un motif ou d'un site consensus spécifique qui correspond au site consensus canonique ψ KxE/D, ψ correspond à un résidu hydrophobe, K à un résidu lysine, x à n'importe quel résidu et E/D est un résidu acide à savoir un acide glutamique ou un acide aspartique (Sternsdorf et al., 1999). Plusieurs algorithmes de

prédiction de sites de SUMOylation consensus au sein d'une protéine donnée ont été conçus dans le but de faciliter leur identification (SUMOplot et SUMOsp). Cependant, le site consensus seul n'est pas suffisant. En effet, certaines protéines qui possèdent ce site consensus ne sont pas SUMOylées sur ce site (Pichler et al., 2005). En effet des critères structuraux rentrent aussi en compte. Suite à la détermination de la structure du complexe ternaire UBC9/RanGap1/SUMO1, les principales caractéristiques structurales d'un site consensus de SUMOylation ont pu être déterminées (Bernier-Villamor et al., 2002). Ainsi un site de SUMOylation doit généralement faire partie d'une région non-structurée ou d'une boucle. Il est suggéré que ce sont les résidus entourant le site actif de la seule enzyme de conjugaison UBE2I qui dictent, pour partie, la reconnaissance de la séquence consensus de SUMOylation.

Récemment des sites consensus alternatifs ont été déterminés. Tout d'abord, une approche par spectrométrie de masse a permis d'identifier deux types de sites pour plusieurs substrats de SUMO2 (Matic et al., 2010). Le premier type correspond en tout point au site consensus classique, mais en position inversée : ICM (Inverted Consensus Motif, E/DxKψ). Le deuxième type contient une séquence courte de résidus hydrophobes en N-terminal du résidu lysine ciblé par SUMO : HCSM (Hydrophobic Cluster SUMO Motif).

Enfin deux régions adjacentes au site de SUMOylation consensus ont été identifiées comme influençant positivement la SUMOylation au site consensus. Dans le premier cas, le site de SUMOylation consensus est suivi par des résidus chargés négativement (NDSM pour Negatively charged amino-acid-Dependent SUMO Motif) (Yang et al., 2006). Ces résidus acides favorisent la SUMOylation du résidu lysine présent au sein du site consensus. Dans le deuxième cas, le site de SUMOylation consensus est régulé par la phosphorylation (PDSM pour Phosphorylation-Dependent SUMO Motif) (Hietakangas et al., 2003). Il est suivi par des résidus sérines et/ou thréonines phosphorylables. Lorsque phosphorylés, ces derniers entrent en contact avec une surface basique d'UBE2I ce qui facilite la SUMOylation des substrats protéiques (Mohideen et al., 2009).

Plus récemment, une étude a mis à jour un nouveau site de SUMOylation, baptisé pSuM pour phosphorylated SuMOylation Motif; le motif est présent dans un nombre significatif de protéines. Quasi identique au site consensus de SUMOylation, il comporte un résidu sérine phosphorylable à l'emplacement du résidu acide (E/D) trouvé dans le site consensus classique (Picard et al., 2012).

II.2.4.2. Les sites non consensus de SUMOylation

Un motif de liaison avec SUMO, SIM (SUMO Interacting Motif), a été identifié dans plusieurs protéines sur la base de leur interaction non-covalente avec SUMO (Minty et al., 2000). Une séquence consensus de ce motif a par la suite été déterminée (Hannich et al., 2005; Reverter and Lima, 2005; Song et al., 2004, 2005). Elle correspond à $\Psi\Psi\text{x}\Psi$ ou $\Psi\text{x}\Psi\Psi$ (où Ψ correspond à un résidu hydrophobe, le plus souvent V, I ou L et x correspond à n'importe quel résidu). Lorsque le motif SIM de la protéine cible se lie à SUMO, il forme un brin β parallèle ou antiparallèle prolongeant le feuillet β de SUMOs. En plus de dicter l'orientation SUMO/SIM, les résidus sérines et/ou thréonines juxtaposés aux motifs SIMs sont dans la grande majorité des cas phosphorylable par la kinase CK2 (Stehmeier and Muller, 2009). L'apport de charges négatives par la phosphorylation de ces résidus semble favoriser les interactions SUMO/SIM. Récemment, il a aussi été déterminé que l'acétylation des protéines SUMO sur des résidus spécifiques, altère leur interaction avec certains motifs SIM (Ullmann et al., 2012).

II.2.5. Fonctions biologiques de la SUMOylation

II.2.5.1. Conséquences moléculaires

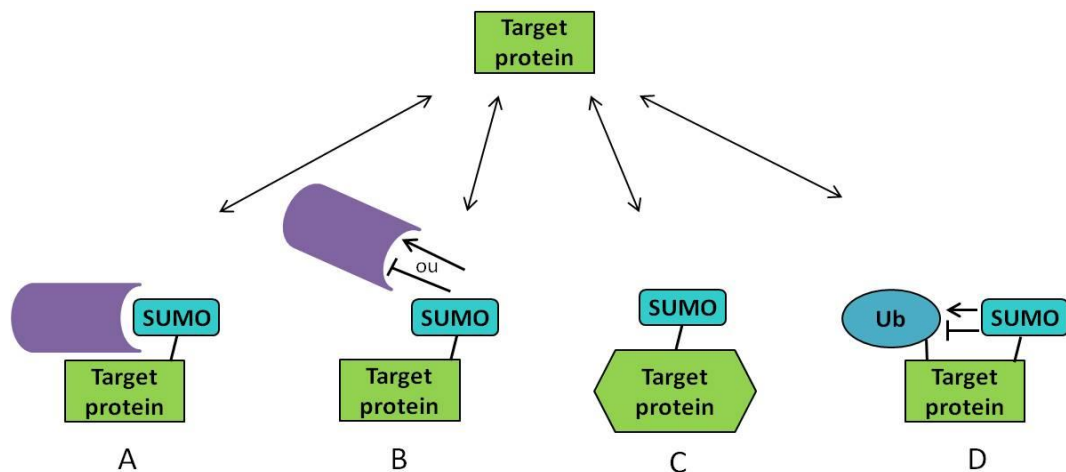


Figure 10 : Conséquences moléculaires des interactions covalentes et non covalentes de SUMO avec les substrats. La modification de la protéine cible par SUMO sur un résidu lysine peut engendrer différentes conséquences. A-Induire l'interaction avec une autre protéine, B- inhiber l'interaction avec une autre protéine, C- induire un changement de conformation de la protéine SUMOylée, D- Inhiber ou favoriser d'autres modifications post-traductionnelles qui ciblent des résidus lysines comme l'ubiquitylation (d'après Wilkinson, 2010).

Des mécanismes moléculaires simples induits par la SUMOylation des protéines sont à la base de conséquences fonctionnelles parfois complexes. En se couplant de façon covalente à une protéine, SUMO peut influencer les interactions de la protéine avec d'autres molécules. À ce jour, quatre mécanismes sont proposés pour expliquer les conséquences que peut avoir la SUMOylation d'une protéine sur ses fonctions (Figure 10). Ainsi, la SUMOylation d'une protéine peut (A) faciliter des interactions ou (B) inhiber des interactions (C) induire un changement de conformations dans la protéine SUMOylée et/ou (D) entraîner d'autres modifications post-traductionnelles (inhiber ou activation).

La SUMOylation est impliquée dans de nombreux processus nucléaires (Bruderer et al., 2011; Vertegaal et al., 2006), au niveau nucléaire, cytoplasmique et la membranaire (Huang et al., 2012; Kang et al., 2008; Long et al., 2004).

II.2.5.2. Rôle dans la régulation de la transcription

Comme vu précédemment, la SUMOylation module l'activité des protéines en régulant de différentes façons les interactions avec leurs partenaires. De nombreuses protéines modifiées par SUMO sont localisées dans le noyau des cellules.

Beaucoup de facteurs de transcription et de co-régulateurs de la transcription sont SUMOylables. La plupart du temps, la SUMOylation inhibe l'activité de ces régulateurs transcriptionnels. À ce jour, au moins deux modèles sont proposés pour expliquer l'effet inhibiteur de SUMO sur l'activité de ces protéines. La SUMOylation du régulateur de transcription induit le recrutement de facteurs qui inhibent la transcription. Ou bien elle altère son interaction avec l'ADN. La SUMOylation est le plus souvent associée à la répression de la transcription. De nombreux exemples illustrent un rôle direct de la modification par SUMO dans la répression transcriptionnelle. Ainsi, la mutation des sites de SUMOylation de plusieurs facteurs de transcription (Elk1, Sp3 et c-Jun) et de récepteurs nucléaires (AR, GR et PR pour Androgen Receptor, Glucocorticoid Receptor et Progesterone Receptor) induit une augmentation de leur activité transcriptionnelle (Muller et al., 2000; Poukka et al., 2000).

La SUMOylation d'activateurs de transcription peut être associée à une altération de leur interaction avec l'ADN. Il en résulte une perte d'activation de la transcription. Il semble que cela soit le cas pour STAT1 qui est SUMOylable dans son domaine d'interaction avec l'ADN. Ainsi STAT1 présente une plus grande affinité pour ses éléments de réponse sur

l'ADN lorsque muté dans son site de SUMOylation. De plus, l'ajout d'une désomoylase SENP1 augmente l'activité transcriptionnelle induite par STAT1 (Grönholm et al., 2012).

De très rares études ont rapporté une activation de la transcription suite à la SUMOylation de facteurs de transcription. Ainsi, Ikaros est modifié par SUMO sur deux sites majeurs. Il est à noter que la répression de la transcription dépendante d'Ikaros est augmentée lorsque les deux sites de SUMOylation d'Ikaros sont mutés. Ceci s'explique par le fait que la SUMOylation d'Ikaros altère son interaction avec plusieurs co-répresseurs (Gómez-del Arco et al., 2005).

II.2.5.3. Rôle dans l'intégrité du génome

Récemment, la machinerie de SUMOylation a été associée au mécanisme de réparation de l'ADN. En effet, les ligases E3 de la famille PIAS sont recrutées par l'ADN suite à des cassures double brin induites par les rayons UV (Ultra-Violet) et/ou des agents chimiques. Il s'avère que le recrutement des protéines PIAS dans la zone de dommages est essentiel à l'initiation des processus de réparation, suggérant que ces dernières se situent au début des mécanismes de réparation (Galanty et al., 2009; Morris et al., 2009).

II.2.5.4. Rôle dans le ciblage sub-cellulaire

La régulation des interactions protéiques dépendantes de SUMO peut être associée à des variations dans le ciblage sub-cellulaire de protéines. Un exemple très étudié est le recrutement de RanGAP1 à la surface cytoplasmique des pores nucléaires. RanGAP1 fait partie d'un complexe protéique localisé aux pores nucléaires, lieux de transport bidirectionnel des protéines entre le cytoplasme et le noyau. Ainsi, suite à sa SUMOylation, RanGAP1 est adressé aux pores nucléaires où elle interagit de façon stable avec RanBP2. La SUMOylation est impliquée dans cette localisation puisqu'un mutant du site de SUMOylation de RanGAP1 (K526) se retrouve uniquement localisé dans le cytoplasme des cellules (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1998). La formation du complexe RanGAP1*SUMO1*RanBP2 est essentielle à la fonction de ligase E3 SUMO de RanBP2 (Werner et al., 2012). En effet, la SUMOylation de certaines protéines s'effectue lors de leur transfert du cytoplasme vers le noyau. Ainsi, SP100 requiert une séquence NLS (Nuclear Localization Signal) fonctionnelle afin d'être adéquatement SUMOylée (Sternsdorf T, 1999). Ceci suggère que l'altération du ciblage nucléaire altère le niveau de SUMOylation de certains substrats. D'autre part, la SUMOylation de plusieurs protéines est impliquée dans la rétention de ces dernières dans le

noyau. Certaines protéines font la navette entre différents compartiments nucléaires et ce transport est régulé par leur SUMOylation. Ainsi, la topoisomerase-1, une enzyme déroulant la double hélice d'ADN fait la navette entre le nucléoplasme et le nucléole. La SUMOylation de la topoisomerase-I est associée à sa localisation dans le nucléoplasme puisqu'un mutant de SUMOylation est uniquement retrouvé dans le nucléole. La modification par SUMO de la topoisomerase-1 altérerait son interaction avec la nucléoline, une protéine présente dans le nucléole des cellules (Rallabhandi et al., 2002).

II.2.6. Régulation de la SUMOylation

Les lysines SUMOylables peuvent être également des sites de fixation de diverses autres modifications : ubiquitinylation, acétylation, méthylation par exemple.

De nombreuses protéines sont des cibles pour SUMO et pour l'Ubiquitine, et cela sur un même résidu lysine. Il est maintenant établi que la relation entre ces deux systèmes est complexe. La SUMOylation et l'ubiquitinylation agissent soit de manière séquentielle, soit ensemble pour réguler la protéine cible. Par exemple une régulation antagoniste a été décrite pour Ik-B α , l'ubiquitinylation de cette protéine sur sa lysine 21 facilite sa dégradation par le protéasome alors que la SUMOylation de cette même lysine a un effet protecteur (Desterro et al., 1998). Cependant SUMO et Ubiquitine ne semble pas agir en compétition. L'ubiquitinylation d'Ik-B α dépend de la phosphorylation préalable de ses sérines 32 et 36. Lorsqu'Ik-B α est phosphorylée au niveau de ces deux sérines, la SUMOylation n'est pas possible.

SUMO et l'Ubiquitine agissent également de façon séquentielle lors de la régulation d'un autre partenaire de la voie NF κ B, NEMO (NF- κ B essential modulator). NEMO est SUMOylée sur deux résidus lysine à son extrémité C-terminale (K277 et K309). Ceci entraîne son accumulation dans le noyau où elle peut être phosphorylée par la kinase ATM (ataxie télangiectasie mutée). Ainsi la SUMOylation de NEMO facilite sa phosphorylation par ATM. Ceci est une condition nécessaire à son ubiquitinylation aux mêmes lysines que celles préalablement ciblées par la SUMOylation. Cette ubiquitinylation induit l'export nucléaire de NEMO, ce qui lui permet de s'associer avec les autres sous-unités d'IKK et former une kinase active (Huang et al., 2003).

En plus de la co-régulation des protéines cibles, l'ubiquitinylation et la SUMOylation peuvent directement se réguler l'un l'autre par la modification de leur machinerie

enzymatique respective. Par exemple, LA SUMOylation de E2-25K, une enzyme E2 de l'ubiquitinylation, inhibe sa capacité à lier l'Ubiquitine sur des protéines cibles. La SUMOylation peut donc réguler le système d'ubiquitinylation (Pichler et al., 2005). A l'inverse, Gam1 (nécessaire à la réplication virale) fonctionne grâce à l'inhibition de la SUMOylation par l'ubiquitinylation de SAE1, une sous-unité de l'enzyme E1 de la SUMOylation, conduisant à sa dégradation par le protéasome (Boggio et al., 2007). La régulation croisée entre l'Ubiquitine et SUMO se produit également par exemple pour une enzyme E3 de la voie de l'Ubiquitine, Parkin, impliquée dans la maladie de Parkinson. Parkin ubiquitinye RanBP2, une enzyme E3 de la SUMOylation et conduit à sa dégradation (Um and Chung, 2006). La SUMOylation de Parkin renforce son activité d'Ubiquitine ligase (Um and Chung, 2006), créant une boucle de rétrocontrôle négative entre les deux systèmes.

II.2.7. Voie de la SUMOylation et la SLA

Plusieurs observations indiquent un rôle de la voie de la SUMOylation dans les mécanismes impliqués dans la SLA, comme la réponse à l'hypoxie, le stress oxydant, l'excitotoxicité au glutamate et le dysfonctionnement du protéasome. Des études récentes suggèrent également que des modifications par SUMO de SOD1, TDP43, CTE (COOH terminus of EAAT2) peuvent participer à la physiopathologie de la SLA. De plus, le gène *FUS* muté dans des cas de SLA, code une protéine à activité E3 ligase de SUMOylation. Dans la revue suivante, nous traitons des liens entre la SUMOylation et les différentes protéines impliquées dans la SLA et nous discutons de l'intérêt d'étudier la voie de la SUMOylation dans la SLA (Dangoumau et al., 2013).

REVIEW

Protein SUMOylation, an emerging pathway in amyotrophic lateral sclerosis

Audrey Dangoumau,¹ Charlotte Veyrat-Durebex,^{1,2} Hélène Blasco,^{1,2} Julien Praline,^{1,3} Philippe Corcia,^{1,3} Christian R. Andres,^{1,2} and Patrick Vourc'h^{1,2}

¹UMR INSERM U930, Université François-Rabelais, Tours, France, ²Service de Biochimie et de Biologie Moléculaire, and ³Service de Neurologie, CHRU de Tours, Tours, France

The covalent attachment of SUMO proteins (small ubiquitin-like modifier) to specific proteins or SUMOylation regulates their functional properties in the nucleus and cytoplasm of neurons. Recent studies reported dysfunction of the SUMO pathway in molecular and cellular abnormalities associated with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Furthermore, several observations support a direct role for SUMOylation in diverse pathogenic mechanisms involved in ALS, such as response to hypoxia, oxidative stress, glutamate excitotoxicity and proteasome impairment. Recent results also suggest that SUMO modifications of superoxide dismutase 1, transactive response DNA-binding protein 43, CTE (COOH terminus of EAAT2) (proteolytic C-terminal fragment of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 2, EAAT2) and proteins regulating the turnover of ALS-related proteins can participate in the pathogenesis of ALS. Moreover, the fused in sarcoma (*FUS*) gene, mutated in ALS, encodes a protein with a SUMO E3 ligase activity. In this review, we summarize the functioning of the SUMO pathway in normal conditions and in response to stresses, its action on ALS-related proteins and discuss the need for further research on this pathway in ALS.

KEYWORDS: ALS, SUMO, ubiquitin, hypoxia, oxidative stress

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is characterized by a progressive degeneration of motor neurons in the spinal cord and the brain (for review see [1]). One feature of ALS is aggregation of proteins. These aggregates form inclusion bodies containing ubiquitin and SUMO proteins (small ubiquitin-related modifier). Another feature of ALS is the implication of several stresses acting all on the SUMO pathway.

The addition of SUMO to target proteins is a post-translational modification by an enzymatic pathway, the SUMO pathway. Several genes mutated in Mendelian forms of ALS, such as superoxide dismutase 1 (*SOD1*) and TAR DNA-binding protein (*TARDBP*), encode targets for this pathway [2,3]. Moreover, fused in sarcoma (*FUS*) gene, mutated in 5% of familial cases, encodes a protein with SUMO E3 ligase activity [4–7]. SUMO addition can modify gene transcription, subcellular localization and turnover of proteins by competing with ubiquitin for example. Studies also reported that

SUMOylation could affect protein solubility. More importantly, SUMOylation is involved in the cellular response to oxidative stress, hypoxia, glutamate excitotoxicity and proteasome impairment, which have been linked to motor neuron degeneration in ALS [8].

The SUMO pathway

The SUMO cycle

Four *SUMO* paralog genes exist in mammals, *SUMO1* to *SUMO4* [9,10]. These genes have specific cellular expressions and encode proteins with various subcellular localizations. SUMO2 and SUMO3 differ only by their three N-terminal residues and are referred as SUMO2/3; SUMO4 isoform is highly homologous to SUMO2/3 (87%). SUMO2/3 and SUMO1 display approximately 50% of sequence similarity and have a wide tissue distribution, whereas SUMO4 expression is limited to the kidneys, lymph nodes and spleen [9]. In the central nervous system (CNS), neurons and glial cells express SUMO1, 2/3 [11,12]. SUMO1 is located in the cytoplasm and the nucleus, with a higher concentration in promyelocytic leukemia bodies and the nuclear envelope.

Received 15 October 2012; revised 18 December 2012; accepted 20 December 2012.

Correspondence: Patrick Vourc'h, UMR INSERM U930, Université François Rabelais, 37032 Tours, France. E-mail: vourch@med.univ-tours.fr

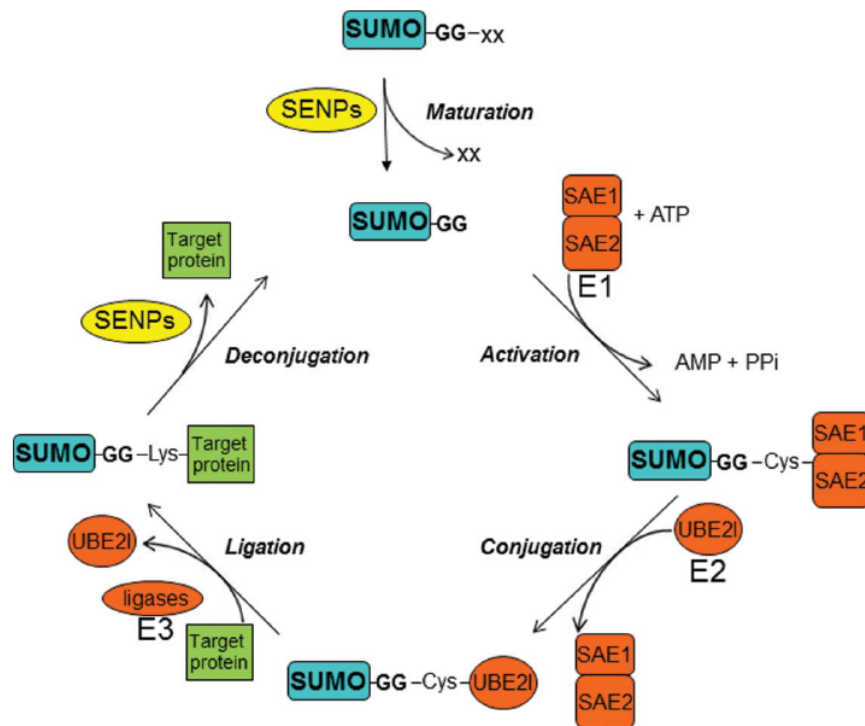


Figure 1. The SUMO pathway requires the activity of four enzymes: Sentrin-specific proteases (SENPs) cleave several C-terminal amino acids (XX), E1 activating enzyme (two subunits SAE1 and SAE2) binds SUMO before a transfer to E2 conjugating enzyme (UBE2I) and E3 ligases. E2 and E3 ligases give the specificity for the substrates.

The SUMOylation is a posttranslational modification of proteins by the covalent attachment of SUMO1, 2/3 to one (monosumoylation) or several (multisumoylation) lysines. This modification is dynamic and reversible. SUMO2/3 are capable of forming polySUMO chains (polysumoylation) on protein through internal lysine residues (mainly lysine¹¹) [13], and SUMO1 in that context acts as a chain terminator on SUMO2/3 polymers [14].

The SUMO pathway is a multistep enzymatic pathway (Figure 1). SUMO is expressed as a precursor that undergoes maturation by cleavage by SUMO-specific proteases (SENPs). The SUMOylation is initiated by a thioester bond between SUMO and a cysteine of the SUMO activating enzyme E1, SAE1/SAE2 (E1) [15]. SUMO is then transferred to the catalytic cysteine of the ubiquitin conjugating enzyme E2, UBE2I [16,17]. UBE2I has the capacity to directly recognize the target protein and to catalyze the formation of an amide bond between SUMO and the ϵ -amine group of a lysine of the target protein. The lysine must be within a consensus motif μ KxE (μ : hydrophobic residue) [18,19], which can be followed by a serine (μ KxE_{xx}S) whose phosphorylation increases SUMOylation [20]. Many SUMO E3 ligases exist in human. They enhance the efficiency of SUMOylation. The SUMOylation is a reversible

process by the action of the SENPs. Noncovalent attachment of SUMO to target proteins has also been reported for proteins such as the androgen receptor [21].

Relationship between SUMOylation and ubiquitination

Many proteins covalently bind SUMO or ubiquitin to the same lysine residue. I κ B, for example, can be polyubiquitinated on two lysines, which facilitates its degradation by the proteasome. [22]. I κ B is protected from degradation when Lys²¹ is SUMOylated. This stabilization of I κ B leads to the inhibition of NF κ B (nuclear factor κ B) target genes, such as COX2. Treatment with COX2 inhibitors protects motor neurons [23]. The estrogen receptor β (ER β) consists in another example. Attachment of SUMO1 to ER β prevents its degradation by competing with ubiquitin at the same lysine and induces ER β transcription inhibition [24]. Interestingly, ER β expression increases in motor neuron cell line ventral spinal cord 4.1 cell line (VSC4.1) in response to estrogen or estrogen receptor agonists, contributing to neuroprotection [25]. These examples show an antagonism between SUMOylation and ubiquitination in motor neurons.

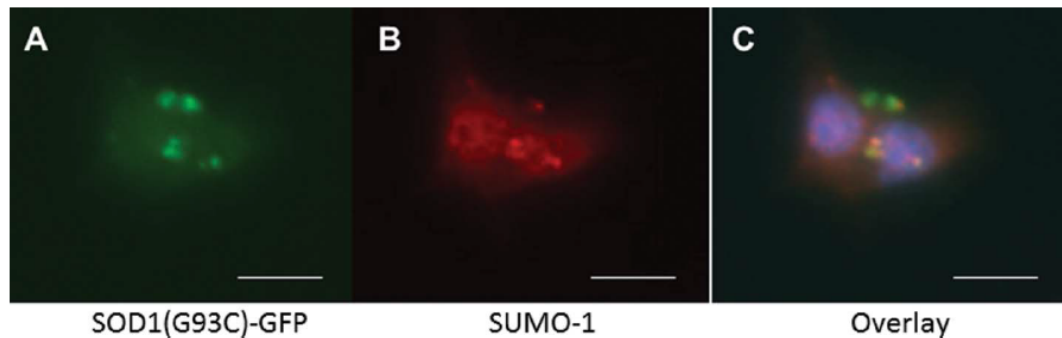


Figure 2. Co-localization of the overexpressed mutant SOD1 (G93C)-GFP (A) with SUMO-1 (B) in neuroblastoma spinal cord 34 cell line (NSC-34) cells; (C) overlay. Scale bars: 30 μ m.

Proteins can also bind SUMO and ubiquitin to different lysine residues. Some E3 ubiquitin ligases, named SUMO-targeted ubiquitin ligases (STUbL), recognize their targets only if these targets are previously SUMOylated. The protein von Hippel-Lindau (VHL), member of an E3 complex involved in the regulation of the hypoxia inducible factor (HIF), is an example of STUbL (more details in paragraph 3). This mechanism indicates that SUMOylation and ubiquitination can act in a cooperative way in neurons. SUMO-dependent regulations of particular enzymes of the ubiquitin pathway, and *vice versa*, consist in other examples of cooperation between the SUMO and ubiquitin pathways. The deSUMOylation enzyme SENP3 is ubiquitinated and degraded by the proteasome. The ubiquitin-specific protease USP25 and the E2 enzyme E2-25k are regulated by SUMOylation [26]. The only E2 of the SUMOylation pathway, UBE2I, is a target of SUMOylation [27]. Its SUMOylation is believed to act on its target specificity.

Another relationship between SUMO and ubiquitin is their presence within inclusions in cells. In ALS, *in vitro* overexpression of wild type or mutant SOD1 leads to SUMO and ubiquitin positive inclusions [2,28] (Figure 2, personal observation). It is not understood why SUMO is accumulated in inclusions and how it is involved in ALS pathogenesis.

SUMOylation of ALS-related proteins

The SOD1 and transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43), two proteins encoded by genes mutated in ALS, can be SUMOylated [2,3].

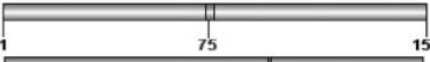







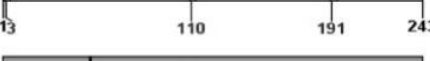
















Proteomic studies showed that the yeast SOD1 protein is SUMOylated on multiple lysines [29]. Human SOD1 is also SUMOylated on Lysine 75 (Table 1). The substitution of this lysine led to an absence of SOD1 SUMOylation [2]. The overexpression of wild-type SOD1 in human embryonic kidney 293 cell line (HEK293) cells is associated with

SOD1 SUMOylation and colocalization of SUMO1 and SOD1 in inclusion bodies [2]. SUMO1 modification of both overexpressed wild-type SOD1 and mutant SOD1 G93A contributes to their stability and accumulation. We confirmed in a mouse motor neuron cell line that SUMO1 co-localizes in aggregates with another overexpressed ALS mutant form, SOD1 G93C (Figure 2). Immunocytochemistry experiments on cultures of motor neurons expressing SOD1 with mutations affecting the SUMO consensus site could be interesting to indicate whether or not the SUMOylation of SOD1 facilitates its aggregation and participates in cell death under basal condition and under stress.

The TDP-43 is located within ubiquitin-positive inclusions in ALS. In pathological conditions, TDP-43 is redistributed from the nucleus to the cytoplasm where it is cleaved and forms ubiquitinated and insoluble inclusions. Several isoforms of TDP-43 exist. Interestingly, one of them, TDP-S6 lacking the C-terminal domain, is located within SUMO-2/3 positive nuclear inclusions when overexpressed [3]. TDP-43 is also associated with promyelocytic leukemia bodies [30], nuclear structures known to colocalize with SUMO2/3 [31,32]. Moreover, in response to heat shock, SUMO polymerized into polySUMO chains and redistributes among a large numbers of proteins, including TDP-43 [33]. These results support further research on TDP-43 SUMOylation and its consequences on TDP-43 translocation, degradation and aggregation in ALS.

In recent years, a growing number of SUMO substrates have been identified in neurons. There are certainly still a lot to identify. We searched for the presence of SUMO consensus sites in proteins encoded by ALS-related genes (involved in familial and sporadic ALS, or in rare and atypical forms of ALS), using the software SUMOsp [34,35]. A large number of these proteins could be targets of SUMOylation as described in Table 1. Proteomic analyses focused on these proteins will have to be performed on extracts from motor neurons to identify their possible regulation by

Table 1. SUMOylation sites in ALS-related proteins. (FTD: Frontotemporal dementia; PD: Parkinson disease). SUMO consensus sites (red); position of lysine in consensus sites (blue).

Genetic subtype	Gene	Location of potentiel SUMO consensus sites (Position of lysine)	Reference
ALS associated gene			
ALS1	Superoxide dismutase 1 (SOD1)		Rosen (1993) (71)
ALS6	Fused in sarcoma (FUS)		Kwiatkowski et al. (2009)(5) Vance et al. (2009)(6)
ALS9	Angiogenin (ANG)		Greenway et al. (2006)(72)
ALS10	TAR DNA-binding protein (TARDBP)		Sreedharan et al. (2008)(73)
ALS12	Optineurin (OPTN)		Maruyama et al. (2010)(74)
ALSX	Ubiquilin 2 (UBQLN2)		Deng et al. (2011)(75)
Rare or atypical forms of ALS			
ALS2	Alsin (ALS2)		Yang et al. (2001)(76)
ALS4	Senataxin (SETX)		Chen et al. (2004)(77)
ALS5	Spatacsin (SPG11)		Orlacchio et al. (2010)(78)
ALS8	vesicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB)		Nishimura et al. (2004)(79)
ALS11	Polyphosphoinositide phosphatase (FIG4)		Chow et al. (2009)(80)
ALS-FTD	σ Non-opioid receptoe 1 (SIGMAR1)		Luty et al. (2010)(81) Al-Saif et al. (2011)(82)
ALS-FTD	Chromosome 9 open reading frame 72 (C9ORF72)		Renton et al. (2011)(83) DeJesus-Hernandes et al. (2011)(84)
ALS-dementia-PD	Microtubule-associated protein tau (MAPT)		Hutton et al. (1998)(85)
	Valosin-containing protein (VCP)		Johnson et al. (2010)(86)
Others			
APOE2	Apolipoprotein E		Buée et al. (1996)(87)
ALS13	Ataxin-2		Elden et al. (2010)(88)
CHGB	Chromogranin B		Gros-Louis et al. (2009)(89)
CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2B		Parkinson et al. (2006)(90)
PON2	Paraoxonase 2		Saeed et al. (2006)(91)
PON3	Paraoxonase 3		Saeed et al. (2006)(91)
SLC11A2	Solute carrier family 11		Blasco et al. (2011)(92)
SMN1	Survival of motor neuron 1		Corcia et al. (2002)(93)
SMN2	Survival of motor neuron 2		Veldink et al. (2001)(94)
UNC13A	UNC-13 homolog A		Van Es et al. (2009)(95)

SUMOylation. For example, two SUMO1 consensus sites exist in survival of motor neuron (SMN) proteins [36]. Interestingly, in response to stress, SUMO1 was transiently localized into neuronal Cajal bodies, nuclear organelles involved in the maturation of small nuclear ribonucleoproteins. These SUMO1 positive Cajal bodies also contain SMN proteins, leading to the hypothesis that the SUMOylation of SMN might play a role in the molecular reorganization of Cajal bodies in response to stress. Another interesting observation resulting from proteomic analysis was the discovery of the E3 SUMO ligase activity of FUS protein. FUS promotes the SUMOylation of the p42 isoform of ERB1, resulting in its nucleolar translocation and repressive action on E2F-1 transcription factor [4]. E2F-1 is a cell cycle regulator whose activation has been linked to apoptotic cell death of ALS spinal cord motor neurons [37]. It would be interesting to test whether ALS-related mutations in *FUS* could affect its SUMO E3 ligase activity resulting in E2F-1 activation.

Stress stimuli in ALS and SUMO pathway

The SUMO substrates are located in the nucleus, in the cytosol and in organelles. The nuclear and extranuclear roles of SUMOylation/deSUMOylation appear to be crucial in neuronal function in normal conditions [38]. Activation of SUMO conjugation is proposed to be an endogenous neuroprotective stress response [39]. The processes underlying the neurodegenerative disease ALS are multifactorial and not fully understood. A complex interaction between genetic factors and multiple mechanisms, including response to hypoxia, oxidative stress, glutamate excitotoxicity and proteasome impairment, is generally admitted [35]. SUMOylation appears to be a critical regulator for numerous proteins directly involved in these mechanisms.

The hypoxic response of cells is mediated in part through the induction of a transcriptional pathway mediated by HIF1. HIF1 α regulates the response to hypoxia by the action of many genes participating in the anaerobic metabolism (*GLUT-1*) and angiogenesis (vascular endothelial growth factor (*VEGF*), *ANG* mutated in ALS) [40,41]. HIF1 α is degraded by the proteasome under normal conditions. This is mediated by its hydroxylation by prolyl hydroxylases, leading to its ubiquitination in the cytosol by an E3 ubiquitin ligase complex containing the VHL protein. Under hypoxia, HIF1 α stability is regulated by SUMOylation. Indeed, hypoxia promotes the translocation of HIF1 α to the nucleus, enabling its conjugation to SUMO1 by the E3 protein inhibitor of activated STATy (PIASy) [42,43]. SUMO1-HIF1 α can be deSUMOylated by the sentrin/SUMO-specific protease

SEN1 [44]. The shifting in metabolic strategies toward increased flux through the glycolytic pathway during hypoxic conditions could also be mediated by the SUMOylation of metabolic enzymes [45]. SUMOylation might also represent a major regulatory mechanism for glucose transporters in the CNS, as suggested by the SUMOylation of glucose transporters GLUT1 and GLUT4 [46]. A recent study indicated that motor neurons from SOD1 G93A mice, a model of ALS, lack the neuroprotective response of the HIF-1 α system to hypoxic stress [47]. Studies on the consequences of variation of levels and duration of hypoxia on motor neurons will have to be performed to precise the implication of the SUMO pathway in regulating the balance between the cellular adaptive and neuroprotective response to a stress and cell death.

Oxidative stress is suspected to contribute to neurodegeneration in ALS [48]. It is caused predominantly through the production of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide (O₂⁻) and hydroxyl radicals (OH \cdot). SUMO conjugation is reported as a major response to oxidative stress. Particularly, the balance SUMOylation/deSUMOylation may have a critical function in the cellular adaptive response to ROS production [49]. For example, under basal conditions, SENP3 is expressed at low levels, ubiquitinated and degraded by the proteasome [50]. Oxidative stress causes a redistribution of SENP3 to the nucleoplasm, where it regulates the SUMOylation of p300. Upon exposure to low doses of H₂O₂, SUMO2/3 are deconjugated from p300 in a process mediated by SENP3, in spite of an increase in global cellular SUMO2/3 conjugation [51]. Moreover, p300 deSUMOylation facilitates its binding to HIF1. This represents a new mechanism underlying the increase of HIF1 transcriptional activity in response to a mild oxidative stress [52]. Interestingly, low concentrations of ROS (H₂O₂) during a short period of time induce a rapid disappearance of most SUMO conjugates, due to inhibition of SUMOylation enzymes. This inhibition is reversible and indicates that SUMO enzymes represent specific effectors of H₂O₂ [53].

Another candidate mechanism is ER β SUMOylation in a context of oxidative stress in ALS. Picard and collaborators [24] showed that ER β SUMOylation induces its transcriptional inhibition. This is enhanced by the activation of the glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β), which appears as an important pathogenic mechanism in ALS. Indeed, mutant SOD1 G93A and A4V activate GSK-3 β in motor neurons, thus becoming vulnerable to oxidative stress [54]. Moreover, the treatment of ALS transgenic mice (SOD1 G93A) with GSK-3 β inhibitor showed excellent motor ability and delay of the symptom onset and survival [55]. As previously mentioned, treatment of the motor neuron cell line VSC4.1 with estrogen or estrogen receptor agonists induces

overexpression of ER β , contributing to neuroprotection [25]. A key event in this neuroprotective mechanism could be the deSUMOylation of ER β .

Other studies of interest in ALS will be to specify the relationship between the ubiquitin and SUMO pathways in regulating protein turnover in motor neurons in a context of oxidative stress. One interesting observation is the regulation of mutant SOD1 degradation by the molecular chaperone heat shock protein 90 (Hsp90) and the ubiquitin ligase carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) [56]. Recent results support the idea that the SUMO pathway can regulate this mechanism. Indeed, Yan and collaborators [57] reported that SUMO2/3 protease SENP3 is regulated by CHIP and Hsp90. Under normal conditions, SENP3 is maintained at a low basal level due to Hsp90-independent CHIP-mediated ubiquitination. Upon mild oxidative stress, SENP3 recruits Hsp90, which protects SENP3 from CHIP-mediated ubiquitination and subsequent degradation. These findings, which represent a new mechanism of SUMO protease regulation in response to oxidative stress, will have to be tested in motor neurons expressing ALS-related mutant proteins under normal conditions and oxidative stress.

Glutamate excitotoxicity is another contributor to degeneration of motor neurons in ALS. It could result from the impairment of the astroglial glutamate excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2), also known as glutamate transporter 1. EAAT2 is essential for the clearance of synaptically released glutamate and the prevention of toxicity. Excitotoxicity caused by a reduction in expression and activity of EAAT2 is one of the proposed mechanisms implicated in motor neuron death in ALS [58]. Focal loss of EAAT2 was observed in the ventral horn of the spinal cord of SOD1 G93A rat model of ALS [59]. This appeared before motor neuron degeneration. Reduced levels of EAAT2 have also been observed in the spinal cord of ALS patients [38,60]. EAAT2 is cleaved by caspase 3, resulting in impaired glutamate transport activity and generating a proteolytic fragment (CTE, COOH terminus of EAAT2) [61,62]. Studies on SOD1 G93A mouse showed that this fragment was SUMOylated (CTE-SUMO1) and accumulated in the nucleus of astrocytes [59]. This CTE-SUMO1 was targeted to promyelocytic leukemia nuclear bodies [62]. Expression in astrocytes of CTE artificially tagged with SUMO1 to mimic the native SUMOylated fragments, recapitulated the nuclear accumulation of the endogenous EAAT2 derived fragment. Moreover, the expression of CTE-SUMO1 in spinal cord astrocytes *in vitro* initiated toxicity in neuroblastoma spinal cord-34 cell line (NSC-34) cells by inducing caspase 3 activation [59]. Prolonged nuclear accumulation of CTE-SUMO1 was toxic to spinal cord astrocytes, although this gliotoxic effect occurred later than in motor neurons [59].

Several observations demonstrated that the transforming growth factor beta (TGF- β) signaling protects neurons from glutamate-mediated excitotoxicity. The neuroprotective activity of TGF- β 1 against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity is partly mediated by the tissue type plasminogen activator inhibitor-1 (PAI) produced by astrocytes. The activation of PAI is dependent of Smad3, a target of SUMOylation [63]. Studies on SOD1 mutant transgenic mice indicated that a stimulation of the TGF- β -Smad2/3 pathway restored motor function in this mouse model of ALS [64]. The SUMO E3 ligase PIASy can suppress TGF- β signaling by stimulating the SUMOylation and nuclear export of Smad3 [65]. These findings suggest that part of the disruption of Smad signaling in ALS may come from an abnormal cellular localization of Smad proteins in glial cells and motor neurons resulting from a modification in Smad SUMOylation. Reduced intensity of nuclear Smad3 immunoreactivity has been observed in cells bearing TDP-43 inclusions in spinal cords from sporadic ALS patients [66].

Perspectives on the SUMO pathway in ALS

Despite all the progress in disease models, ALS is still untreatable. So far, Riluzole is the only drug having an effect, slightly slowing disease progression [1,67]. From a drug development perspective, a better understanding of the cellular and molecular mechanisms implicated in the pathogenesis of ALS is crucial. SUMO modification is an interesting and promising mechanism. Indeed, it is affected in stresses acting on motor neurons and glial cells in a context of ALS. The regulation of SUMOylation occurs at various levels, such as the specificity on targets depending of the presence of multiple SUMO E3 ligases, the interplay between ubiquitination/SUMOylation and the modulation of the conjugation/deconjugation system.

The SUMO-positive deposits are histopathologically found in patients with ALS. It is not clearly understood why SUMO, and ubiquitin, accumulate in motor neurons and how this is involved in ALS pathogenesis. Interestingly, recent suggestions, from studies on FUS and SENP3 proteins for example, point out a possible implication of malfunction of the SUMO system in ALS. As previously described, targeting the SUMOylation of downstream effectors of pathways such as TGF- β and GSK3- β in motor neurons and/or glial cells may result in a possible protection against the degeneration of motor neurons in ALS. Further studies on the Fas death receptor/Daxx pathway in ALS and regulation of Daxx SUMOylation in response to various stresses will also be interesting to perform. Indeed, a chronic activation of the Fas death receptor/Daxx pathway is suspected

in motor neurons degeneration [68]. In mutant SOD1 mice, Daxx accumulate in discrete subnuclear domains in motor neurons. Results from Lin and collaborators [69] strongly support a direct role of SUMO in Daxx subnuclear compartmentalization.

Modulation of any of the four classes of enzymes of the SUMO pathway could be achieved by specific drugs. Drugs acting on SAE1/SAE2 (E1) and UBE2H (E2) would result in global modulation of SUMO modification. The E3 enzymes regulating SUMOylation efficiency appear to be more interesting targets for drug development because of their diversity and their greater selectivity for protein substrates. Protein SUMOylation is reversed by isopeptidases (deSUMOylases). Several deSUMOylases (SENPs) could also be valuable targets for drug development. A second class of deSUMOylases, DeSI (DeSUMOylating Isopeptidase) has just been identified [70]. A better understanding of the roles of SUMO enzymes in motor neurons and astrocytes, particularly during stresses, could help identify new targets in ALS.

Conclusion

The SUMO pathway is involved in various stress responses associated with motor neuron degeneration in ALS. Several proteins directly involved in the pathogenesis of ALS are targets or putative targets (Table 1) of SUMOylation. FUS is a SUMO E3 ligase. Moreover, recent observations support the SUMO pathway as an actor in the processes of neurodegeneration in ALS. Altogether, these data indicate the SUMO pathway as a relevant pathway to further study in ALS.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper. We thank the association ARSLA for its financial support.

References

- Hardiman O, Van den Berg LH, Kiernan MC. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2011;7(11):639–49.
- Fei E, Jia N, Yan M, et al. SUMO-1 modification increases human SOD1 stability and aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;347(2):406–12.
- Seyfried NT, Gozal YM, Dammer EB, et al. Multiplex SILAC analysis of a cellular TDP-43 proteinopathy model reveals protein inclusions associated with SUMOylation and diverse polyubiquitin chains. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(4):705–18.
- Oh S-M, Liu Z, Okada M, et al. Ebp1 sumoylation, regulated by TLS/FUS E3 ligase, is required for its anti-proliferative activity. *Oncogene* 2010;29(7):1017–30.
- Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009;323(5918):1205–8.
- Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009;323(5918):1208–11.
- Brown JA, Min J, Staropoli JF, et al. SOD1, ANG, TARDBP and FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: a United States clinical testing lab experience. *Amyotroph Lateral Scler* 2012;13(2):217–22.
- Xu R, Wu C, Zhang X, et al. Linking hypoxic and oxidative insults to cell death mechanisms in models of ALS. *Brain Res* 2011;1372:133–44.
- Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, et al. 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* 2004;279(26):27233–8.
- Lapenta V, Chiurazzi P, Van der Spek P, et al. SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. *Genomics* 1997;40(2):362–6.
- Lee JH, Park SM, Kim OS, et al. Differential SUMOylation of LXRalpha and LXRbeta mediates transrepression of STAT1 inflammatory signaling in IFN-gamma-stimulated brain astrocytes. *Mol Cell* 2009;35(6):806–17.
- Craig TJ, Henley JM. Protein SUMOylation in spine structure and function. *Curr Opin Neurobiol* 2012;22(3):480–7.
- Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, et al. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 2001;276(38):35368–74.
- Matic I, Van Hagen M, Schimmel J, et al. In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol Cell Proteomics* 2008;7(1):132–44.
- Gong L, Li B, Millas S, Yeh ET. Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Lett* 1999;448(1):185–9.
- Johnson ES, Blobel G. Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem* 1997;272(43):26799–802.
- Michelle C, Vourc'h P, Mignon L, Andres CR. What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *J Mol Evol* 2009;68(6):616–28.
- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, et al. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J* 1999;18(22):6455–61.
- Sampson DA, Wang M, Matunis MJ. The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 2001;276(24):21664–9.
- Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, et al. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(1):45–50.
- Zheng Z, Cai C, Omwancha J, et al. SUMO-3 enhances androgen receptor transcriptional activity through a sumoylation-independent mechanism in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2006;281(7):4002–12.
- Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT. SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* 1998;2(2):233–9.
- Pramatarova A, Laganière J, Roussel J, et al. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in trans-

- genic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 2001;21(10):3369–74.
24. Picard N, Caron V, Bilodeau S, et al. Identification of estrogen receptor β as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3 β . *Mol Cell Biol* 2012;32(14):2709–21.
 25. Das A, Smith JA, Gibson C, et al. Estrogen receptor agonists and estrogen attenuate TNF- α -induced apoptosis in VSC4.1 motoneurons. *J Endocrinol* 2011;208(2):171–82.
 26. Meulmeester E, Kunze M, Hsiao HH, et al. Mechanism and consequences for paralogue-specific sumoylation of ubiquitin-specific protease 25. *Mol Cell* 2008;30(5):610–9.
 27. Knipscheer P, Flotho A, Klug H, et al. Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Mol Cell* 2008;31(3):371–82.
 28. Gomes C, Escrivente C, Costa J. Mutant superoxide dismutase 1 overexpression in NSC-34 cells: effect of trehalose on aggregation, TDP-43 localization and levels of co-expressed glycoproteins. *Neurosci Lett* 2010;475(3):145–9.
 29. Zhou W, Ryan JJ, Zhou H. Global analyses of sumoylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *J Biol Chem* 2004;279(31):32262–8.
 30. Wang I-F, Reddy NM, Shen C-KJ. Higher order arrangement of the eukaryotic nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(21):13583–8.
 31. Mukhopadhyay D, Ayaydin F, Kolli N, et al. SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *J Cell Biol* 2006;174(7):939–49.
 32. Vertegaal ACO, Ogg SC, Jaffray E, et al. A proteomic study of SUMO-2 target proteins. *J Biol Chem* 2004;279(32):33791–8.
 33. Golebiowski F, Matic I, Tatham MH, et al. System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Sci Signal* 2009;2(72):ra24.
 34. Ren J, Gao X, Jin C, et al. Systematic study of protein sumoylation: development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Proteomics* 2009;9(12):3409–12.
 35. Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, et al. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2011;7(11):616–30.
 36. Navascues J, Bengoechea R, Tapia O, et al. SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. *J Struct Biol* 2008;163(2):137–46.
 37. Ranganathan S, Bowser R. p53 and cell cycle proteins participate in spinal motor neuron cell death in ALS. *Open Pathol J* 2010;4:11–22.
 38. Martin S, Wilkinson KA, Nishimune A, Henley JM. Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 2007;8(12):948–59.
 39. Datwyler AL, Lättig-Tünnemann G, Yang W, et al. SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011;31(11):2152–9.
 40. Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, et al. ANG mutations segregate with familial and « sporadic » amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2006;38(4):411–3.
 41. Paubel A, Violette J, Amy M, et al. Mutations of the ANG gene in French patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2008;65(10):1333–6.
 42. Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, et al. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 α during hypoxia. *Cell* 2007;131(2):309–23.
 43. Kang S, Hong S. SUMO-1 interacts with mutant ataxin-1 and colocalizes to its aggregates in Purkinje cells of SCA1 transgenic mice. *Arch Ital Biol* 2010;148(4):351–63.
 44. Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ETH. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1 α during hypoxia. *Cell* 2007;131(3):584–95.
 45. Agbor TA, Cheong A, Comerford KM, et al. Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-1 promotes glycolysis in hypoxia. *J Biol Chem* 2011;286(6):4718–26.
 46. Giorgino F, De Robertis O, Laviola L, et al. The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(3):1125–30.
 47. Sato K, Morimoto N, Kurata T, et al. Impaired response of hypoxic sensor protein HIF-1 α and its downstream proteins in the spinal motor neurons of ALS model mice. *Brain Res* 2012;1473:55–62.
 48. Baillet A, Chanteperdrix V, Trocmé C, et al. The role of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2010;35(10):1530–7.
 49. Tempé D, Piechaczyk M, Bossis G. SUMO under stress. *Biochem Soc Trans* 2008;36(Pt 5):874–8.
 50. Kuo M-L, Den Besten W, Thomas MC, Sherr CJ. Arf-induced turnover of the nucleolar nucleophosmin-associated SUMO-2/3 protease Snp3. *Cell Cycle* 2008;7(21):3378–87.
 51. Girdwood D, Bumpass D, Vaughan OA, Thain A, et al. P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 2003;11(4):1043–54.
 52. Huang X, Ding L, Bennewith KL, et al. Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol Cell* 2009;35(6):856–67.
 53. Bossis G, Melchior F. Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol Cell* 2006;21(3):349–57.
 54. Koh S-H, Lee Y-B, Kim KS, et al. Role of GSK-3 β activity in motor neuronal cell death induced by G93A or A4V mutant hSOD1 gene. *Eur J Neurosci* 2005;22(2):301–9.
 55. Ahn S-W, Kim J-E, Park KS, et al. The neuroprotective effect of the GSK-3 β inhibitor and influence on the extrinsic apoptosis in the ALS transgenic mice. *J Neurol Sci* 2012;320(1–2):1–5.
 56. Crippa V, Sau D, Rusmini P, et al. The small heat shock protein B8 (HspB8) promotes autophagic removal of misfolded proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Hum Mol Genet* 2010;19(17):3440–56.
 57. Yan S, Sun X, Xiang B, et al. Redox regulation of the stability of the SUMO protease SENP3 via interactions with CHIP and Hsp90. *EMBO J* 2010;29(22):3773–86.
 58. Van den Bosch L. [The causes and mechanism of selective motor neuron death in amyotrophic lateral sclerosis]. *Verh K Acad Geneesk Belg* 2006;68(4):249–69.
 59. Foran E, Bogush A, Goffredo M, et al. Motor neuron impairment mediated by a sumoylated fragment of the glial glutamate transporter EAAT2. *Glia* 2011;59(11):1719–31.
 60. Maruyama H, Morino H, Ito H, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2010;465(7295):223–6.
 61. Boston-Howes W, Gibb SL, Williams EO, et al. Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2. *J Biol Chem* 2006;281(20):14076–84.
 62. Gibb SL, Boston-Howes W, Lavina ZS, et al. A caspase-3-cleaved fragment of the glial glutamate transporter EAAT2 is sumoylated and targeted to promyelocytic leukemia nuclear bodies in mutant SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 2007;282(44):32480–90.
 63. Docagne F, Nicole O, Gabriel C, et al. Smad3-dependent induction of plasminogen activator inhibitor-1 in astrocytes mediates neuroprotective activity of transforming growth factor- β 1 against NMDA-induced necrosis. *Mol Cell Neurosci* 2002;21(4):634–44.
 64. Nakamura M, Ito H, Wate R, et al. Phosphorylated Smad2/3 immunoreactivity in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis and its mouse model. *Acta Neuropathol* 2008;115(3):327–34.

65. Imoto S, Ohbayashi N, Ikeda O, et al. Sumoylation of Smad3 stimulates its nuclear export during PIASy-mediated suppression of TGF-beta signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;370(2):359–65.
66. Nakamura M, Kaneko S, Ito H, et al. Activation of transforming growth factor-beta/Smad signaling reduces aggregate formation of mislocalized TAR DNA-binding protein-43. *Neurodegener Dis* 2012. [Epub before print] DOI 10.1159/000338151.
67. Gordon PH, Meininger V. How can we improve clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis? *Nat Rev Neurol* 2011;7(11):650–4.
68. Raoul C, Buhler E, Sadeghi C, et al. Chronic activation in presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice of a feedback loop involving Fas, Daxx, and FasL. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(15):6007–12.
69. Lin D-Y, Huang Y-S, Jeng J-C, et al. Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell* 2006;24(3):341–54.
70. Shin EJ, Shin HM, Nam E, et al. DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO Rep* 2012;13(4):339–46.
71. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59–62.
72. Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, et al. ANG mutations segregate with familial and «sporadic» amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2006;38:411–3.
73. Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008;319:1668–72.
74. Maruyama H, Morino H, Ito H, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2010;465:223–6.
75. Deng H-X, Chen W, Hong S-T, et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 2011;477:211–5.
76. Yang Y, Hentati A, Deng HX, et al. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2001;29:160–5.
77. Chen Y-Z, Bennett CL, Huynh HM, et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet* 2004;74:1128–35.
78. Orlacchio A, Babalini C, Borreca A, et al. SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2010;133:591–8.
79. Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HCA et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* 2004;75:822–31.
80. Chow CY, Landers JE, Bergren SK, et al. Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *Am J Hum Genet* 2009;84:85–8.
81. Luty AA, Kwok JBJ, Dobson-Stone C, et al. Sigma nonopiod intracellular receptor 1 mutations cause frontotemporal lobar degeneration-motor neuron disease. *Ann Neurol* 2010;68:639–49.
82. Al-Saif A, Al-Mohanna F, Bohlega S. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2011;70:913–9.
83. Renton AE, Majounie E, Waite A, et al. A hex nucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011;72:257–68.
84. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hex nucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011;72:245–56.
85. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998;393:702–5.
86. Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 2010;68:857–64.
87. Buée L, Pérez-Tur J, Leveugle B, et al. Apolipoprotein E in Guamanian amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex: genotype analysis and relationships to neuropathological changes. *Acta Neuropathol* 1996;91:247–53.
88. Elden AC, Kim H-J, Hart MP, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 2010;466:1069–75.
89. Gros-Louis F, Andersen PM, Dupre N, et al. Chromogranin B P413L variant as risk factor and modifier of disease onset for amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:21777–82.
90. Parkinson N, Ince PG, Smith MO, et al. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 2006;67:1074–7.
91. Saeed M, Siddique N, Hung WY, et al. Paraaxonase cluster polymorphisms are associated with sporadic ALS. *Neurology* 2006;67:771–6.
92. Blasco H, Vourc'h P, Nadjar Y, et al. Association between divalent metal transport 1 encoding gene (SLC11A2) and disease duration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2011;303:124–7.
93. Corcia P, Mayeux-Portas V, Khoris J, et al. Abnormal SMN1 gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2002;51:243–6.
94. Veldink JH, van den Berg LH, Cobben JM, et al. Homozygous deletion of the survival motor neuron 2 gene is a prognostic factor in sporadic ALS. *Neurology* 2001;56:749–52.
95. van Es MA, Veldink JH, Saris CGJ, et al. Genome-wide association study identifies 19p13.3 (UNC13A) and 9p21.2 as susceptibility loci for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2009;41:1083–7.

III. Modèles d'études in vitro

Les avancées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliquées dans la SLA imposent un modèle d'étude pertinent, associant facilité d'utilisation, reproductibilité dans l'utilisation de ce modèle et spécificité par rapport à la pathologie. De nombreuses équipes travaillent ainsi sur des modèles cellulaires, avec toujours la priorité de reproduire au maximum la contraste cellulaire et environnementale de la SLA (pour revue conférer en annexe : Veyrat-Durebex C., Corcia P., **Dangoumau A.**, et al., 2013). Les données tirées des modèles expérimentaux sont utilisés pour (1) évaluer les premiers événements dans la mort des motoneurones, (2) améliorer la connaissance sur des mécanismes physiopathologiques et (3) identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

III.1. Modèles cellulaires

Les cellules NSC-34 sont les cellules les plus largement utilisées dans les études sur la SLA. C'est une lignée de motoneurones, hybride de neuroblastome-motoneurones de moelle épinière de souris (Cashman et al., 1992). Ces cellules expriment plusieurs marqueurs de motoneurones (voie de synthèse de l'acétylcholine) et elles sont connues pour être sensibles au glutamate et au stress oxydant. Il existe plusieurs études sur des modèles de co-culture (motoneurones-astrocytes) permettant d'étudier un environnement plus complexe. Les cultures cellulaires sont utilisées par exemple pour étudier la viabilité cellulaire, l'apoptose, l'agrégation des protéines, la fonction de récepteurs et de l'activité d'enzyme dans la SLA.

Le stress oxydatif et l'excitotoxicité au glutamate peuvent ainsi être étudiés in vitro. Différentes méthodes peuvent induire un stress oxydant, comme l'exposition au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , de 100 μM à 10 mM) pendant 1 à 24 h (Lee et al., 2001; Soo et al., 2009) ou à la L-buthionine sulfoximine (BSO, 25 à 200 μM) (Chi et al., 2007). Le stress oxydatif dans des cultures de lignées de cellules motoneuronale ou de cultures primaires de motoneurones peut également être induit par le chlorure de cobalt ($CoCl_2$) ou par une hypoxie prolongée chronique (0,1% O_2) dans le but d'explorer le lien entre l'hypoxie et le stress oxydatif dans la mort neuronale dans la SLA (Xu et al., 2011). Les modèles cellulaires d'étude de l'excitotoxicité au glutamate sont basés sur le mauvais fonctionnement des transporteurs excitateurs d'acides aminés (EAAT2) ou l'activation de récepteurs post-synaptiques. L'exposition de cultures primaires de neurones au glutamate, AMPA (acide

alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique) ou NMDA (N-méthyl-D-aspartate) à différentes concentrations est utilisée pour évaluer les effets de l'excitotoxicité sur les récepteurs AMPA et NMDA (Mahajan et al., 2011). Un modèle d'excitotoxicité au glutamate lente a été réalisé par l'inhibition du transporteur au glutamate par le threo-hydroxyaspartate, induisant une toxicité motoneuronale détectée par la mesure de l'activité de l'acétylcholine transférase (ChAT) (Rothstein et al., 1992).

Les modèles cellulaires de SLA sont souvent basés sur la surexpression de SOD1 mutant. De nouveaux modèles utilisant la surexpression de FUS et TARDBP mutés existent également. Les cellules souvent utilisées dans des modèles génétiques sont des fibroblastes provenant de biopsies ou des cellules de tissus post-mortem de patients atteints de SLA (Dimos et al., 2008; Haidet-Phillips et al., 2011) ou de cellules prélevées sur des modèles animaux de la SLA (Boutahar et al., 2011), généralement des rongeurs transgéniques SOD1. Des lignées de cellules en culture peuvent également être modifiées pour sur-exprimer des gènes liés à la SLA. La méthode la plus largement utilisée pour sur- ou sous-exprimer des gènes *in vitro* est la transfection. La transfection avec l'ADN de plasmide contenant un gène d'intérêt produit des rendements variables en fonction de la lignée cellulaire. Cette méthode a permis d'étudier des protéines mutées impliquées dans la SLA, comme SOD1 (Urushitani et al., 2002) et TDP-43 (Shiina et al., 2010), d'explorer différentes voies de signalisation (Boutahar et al., 2008) et d'examiner les réponses cellulaires à la manipulation d'enzymes ou de récepteurs comme le récepteur sigma1 (Al-Saif et al., 2011).

III.2. Modèles animaux

Les modèles animaux de la SLA constituent des outils indispensables pour comprendre les mécanismes de la mort des motoneurones et pour évaluer l'effet d'agents thérapeutiques potentiels. La découverte des mutations ponctuelles de SOD1 responsables de formes familiales de SLA a contribué au développement de nombreux modèles murins (Rosen et al., 1993a; Siddique et al., 1989). Il s'agit entre autres de souris transgéniques qui surexpriment une forme mutée de SOD1 humaine (Bruijn et al., 1997; Gurney et al., 1994; Jonsson et al., 2004; Wang et al., 2002; Wong and Borchelt, 1995; Wong et al., 1995). Des modèles de rats transgéniques surexprimant des formes mutées de la SOD1 humaine ont été également générés (Howland et al., 2002; Nagai et al., 2001).

Tous ces modèles transgéniques développent une dégénérescence motoneuronale proche de celle observée chez les patients SLA. Cependant, ils diffèrent au niveau de l'âge d'apparition des symptômes, de la progression et la durée de la maladie, et de certaines caractéristiques histopathologiques. La maladie se manifeste par une faiblesse musculaire au niveau des membres postérieurs, accompagnée de tremblements et d'une réduction de l'activité motrice. Elle évolue vers une paralysie motrice complète entraînant la mort en quelques semaines à quelques mois selon la lignée. L'âge du début de la maladie et sa progression dépendent du nombre de copies du transgène intégrés dans le génome des souris transgéniques (Dal Canto and Gurney, 1995, 1997). La perte des neurones moteurs concorde avec l'apparition des symptômes et se poursuit jusqu'à la fin de la maladie. Étant donné les similitudes cliniques et histopathologiques qui existent entre les modèles de souris transgéniques et les patients atteints de SLA, ces animaux constituent de bons modèles pour l'étude de la SLA.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

La Sclérose Latérale Amyotrophique est caractérisée par une dégénérescence progressive des motoneurons dans la moelle épinière et le cerveau. Les causes encore mal identifiées de cette dégénérescence impliquent des facteurs génétiques (*C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*) et environnementaux (stress oxydant, hypoxie, excitotoxicité par le glutamate). Une des caractéristiques de la SLA est la présence d'agrégats protéiques immunoréactifs pour l'Ubiquitine (Ub) et l'Ub-like SUMO dans les motoneurons en dégénérescence.

La liaison de SUMO sur des protéines cibles dans les cellules consiste en une modification post-traductionnelle par une voie enzymatique dite voie de la SUMOylation, qui dans son fonctionnement ressemble à la voie de l'Ub. La SUMOylation peut modifier la localisation subcellulaire des protéines en affectant par exemple leur transport, leur fonction, ou encore leur 1/2 vie par compétition ou synergie avec l'Ub. Plusieurs études ont également montré que la SUMOylation des protéines peut affecter leur solubilité, et donc pourrait contribuer à la formation des agrégats observés dans les motoneurons dans la SLA. Les facteurs environnementaux impliqués dans la SLA agissent par ailleurs directement sur les voies SUMO/Ub. Plusieurs protéines codées par des gènes mutés dans des cas de SLA, comme SOD1 et TDP-43, sont des protéines cibles de la SUMOylation.

L'objectif de la thèse a été d'étudier les relations entre la voie de la SUMOylation et la présence, combinée ou non, d'un stress environnemental, le stress oxydant, et d'une anomalie génétique, la mutation du gène *SOD1* (superoxyde dismutase 1). Ces travaux avaient pour but de mieux comprendre le rôle de la voie de la SUMOylation dans les mécanismes physiopathologiques entraînant la mort des motoneurons, pour ainsi identifier de nouvelles pistes de stratégies thérapeutiques dans la SLA.

- La première partie de la thèse a porté sur le développement d'une stratégie d'étude des conséquences fonctionnelles de nouvelles mutations du gène *SOD1*.
- La seconde partie de thèse a consisté en l'étude de l'effet combiné d'un stress oxydant et de l'expression de mutants de SOD1 sur l'expression génique des voies SUMO/Ub.
- La troisième partie de thèse avait pour but l'étude du rôle de la SUMOylation dans l'agrégation protéique observée dans les cellules motoneuronales exprimant des mutants SOD1.

MATERIEL ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. Biologie moléculaire

I.1. Production des plasmides

I.1.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits en utilisant la méthode de Chomczynski et Sacchi grâce au TRIzol® reagent (Chomczynski and Sacchi, 1987). Ce réactif contient du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine qui se complexe à l'ARN et permet de rompre les interactions entre l'ARN et les protéines. L'extraction des ARN se fait à basse température (centrifugation à 4°C) pour éviter une activation de nucléases. Les leucocytes sont mis en contact avec 1 mL de TRIzol® avant d'être congelées à -80°C pendant au moins 15 min. L'homogénat est ensuite incubé 5 minutes à température ambiante pour permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques. L'ajout de 0,2 ml de chloroforme permet la dénaturation de toutes les protéines pendant 3 min à température ambiante. Après centrifugation (4°C, 12000 g, 15 min), il y a obtention de trois phases : une phase rosée inférieure qui correspond aux protéines et à l'ADN, une mince couche blanchâtre intermédiaire correspondant à l'ADN et une phase aqueuse supérieure où se trouve l'ARN. C'est cette dernière phase qui est récupérée et précipitée avec 0,5 ml d'isopropanol pendant 10 min à température ambiante. Une centrifugation à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C permet l'obtention d'un culot d'ARN pouvant être invisible à l'oeil nu. Ce culot est isolé du surnageant puis lavé avec 1 ml d'éthanol 70 % et centrifugé à 7500 g, durant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est séché 10 minutes à l'air libre. Les ARN totaux sont ensuite repris dans 20 µL d'eau RNase free. La concentration des ARN totaux a été calculée par la mesure de la densité optique par spectrophotométrie grâce au Nanodrop 2000 (ThermoScientific) à une longueur d'onde de 260 nm. La pureté des ARN totaux a été vérifiée par la mesure du rapport de la valeur de la densité optique de la solution à 260 nm sur celle à 280 nm. Les ARN totaux extraits présentaient tous un rapport compris entre 1,7 et 2.

I.1.2. Traitement à la Dnase I et transcription inverse

Afin d'éliminer une éventuelle contamination par de l'ADN, les échantillons ont été traités à la Dnase I (Invitrogen™) à 0,3 U/μL. La réaction s'effectue pendant 10 minutes à température ambiante, puis la Dnase est dénaturée au bain marie 15 minutes à 65°C. Les ARN totaux traités à la Dnase I ont ensuite été rétro-transcrits par l'enzyme Superscript II (Invitrogen™). Cette réaction, effectuée dans un volume réactionnel de 25 μL sur 250 ng d'ARN traités à la Dnase I, contient 100 U de Superscript II, 10 mM de dithiothréitol, 4 ng d'hexamères (Invitrogen™), 0,2 mM de dNTP (Invitrogen™). La rétro-transcription a été effectuée à 42°C pendant 50 minutes. L'enzyme a été ensuite inactivée par chauffage à 95°C pendant 5 minutes.

I.1.3. Réaction de polymérisation en chaîne, PCR

Le choix des couples d'amorces utilisés pour l'amplification du gène *SOD1* a été réalisé grâce au logiciel Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Le mélange réactionnel de la PCR se compose de 25μl contenant 200ng d'ADN, 1,25U de Taq Gold (Applied®), 1X de tampon 10x PCR Gold (Applied®), 2,5mM de MgCl₂ (Applied®), 12,5mM de dNTP, 10pmol de chaque amorce sens et antisens (tableau 5). L'amplification est réalisée dans un thermocycler Biorad iCycler pendant 35 cycles comprenant chacun 30 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation des amorces sur l'ADN cible à une température d'hybridation T_m dépendante du couple d'amorces et 1 minute d'élongation à 72°C ; ces 35 cycles sont précédés d'une dénaturation initiale de 10 minutes à 95°C et suivis d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

La vérification du produit obtenu est obtenue par migration électrophorétique de 10μl de chaque produit de PCR additionné de 3μl de bleu de bromophénol, sur gel d'agarose (Eurobio®) à 1,2 % dans du tampon TBE 1X (Tris 1,0 M, acide borique 1,9 M, EDTA 0,01M). Le BET (Merk®) incorporé à 0,5μg/μl dans le gel permet de visualiser les fragments obtenus en s'intercalant dans l'ADN et en émettant une fluorescence après une irradiation aux UV (à 312 nm). La taille des fragments amplifiés est estimée par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire ayant migré en parallèle. Les fragments ont été purifiés sur gel à l'aide du kit DNA Gel Extraction (Millipore®).

I.1.4. Mutagenèse dirigée

La technique de mutagenèse dirigée nous a permis d'insérer les différentes mutations dans le gène SOD1 (Figure 11). Deux segments d'ADN, l'un s'étendant "en amont" et l'autre "en aval" de la mutation désirée sont amplifiés en utilisant des oligonucléotides qui introduisent la mutation désirée et génèrent des produits de PCR qui se chevauchent sur 20 nucléotides ou plus dans la région de la mutation. Quand ces deux produits de PCR sont mélangés et hybridés l'un avec l'autre, un des produits possibles est composé de deux brins d'ADN qui s'hybrident sur une courte région au niveau de leur extrémité 3'. Cette molécule peut être polymérisée par l'ADN polymérase pour générer une matrice correspondant au fragment entier portant la mutation. Cette matrice est ensuite amplifiée par une troisième PCR utilisant les oligonucléotides 1 et 3.

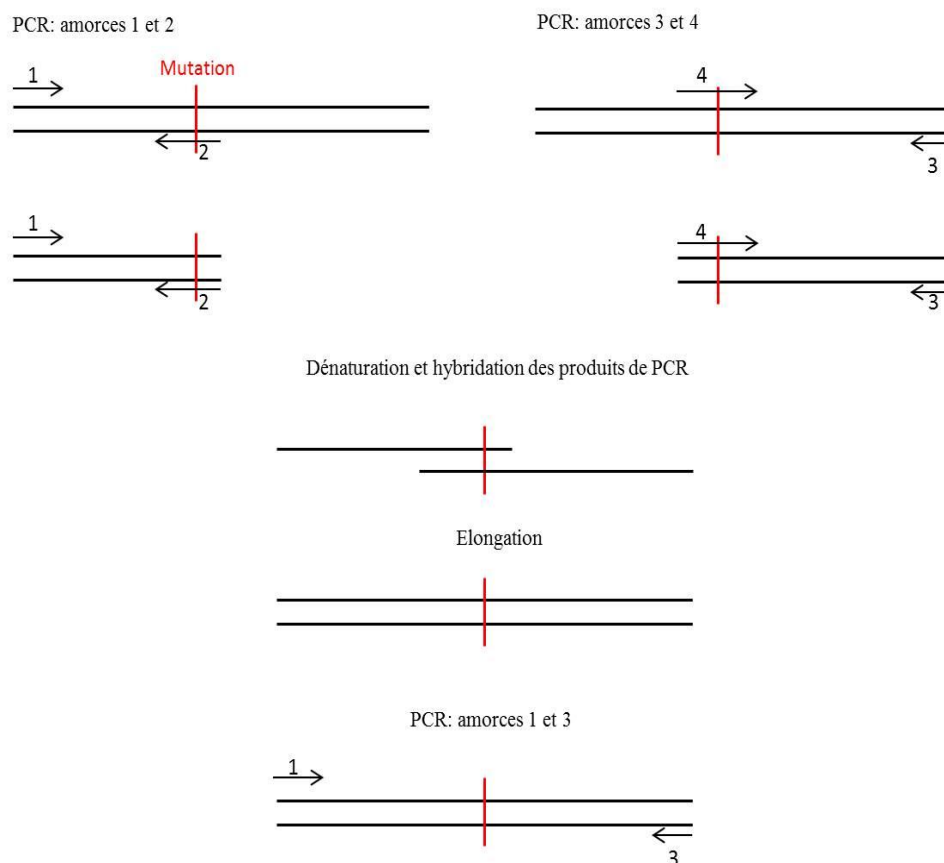


Figure 11 : Technique de mutagenèse dirigée

Les PCR utilisées pour cette technique sont les même que ceux indiquées dans le paragraphe II.1.3 et les séquences des amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau suivant.

Nom des amorces	Séquence 5'-3'	Température d'hybridation
SOD1_H_F	ATGGCGACGAAGGCCGTGTGTGC	60°C
SOD1_H_R_DelStop	TTGGGCGATCCCAATTACACC	60°C
SOD1_H_5R1	TTATTGGGCGATCCCAATTACACCAC	60°C
SOD1_A4V_F	ATGGCGACGAAGGTCGTGTGCGTGCTG	60°C
SOD1_K75R_F	AACACGGTGGGCCAAGGGATGAAGAGAGGCATGTTG	60°C
SOD1_K75R_R	ATCCCTTGGCCCACCGTGTT	60°C
SOD1_V31A_F	CCAGTGAAGGCGTGGGGAAGCATTAAGGAC	60°C
SOD1_V31A_R	CTTCCCCACGCCTTCACTGG	60°C
SOD1_E121G_F	ACACTGGTGGTCCATGGAAGAGCAGATGAC	60°C
SOD1_E121G_R	TTTCATGGACCACCAGTGT	60°C

Tableau 5 : Séquence des amorces utilisées pour les PCR

I.1.5. Clonage

Une première étape d'ajout d'ATP aux fragments est nécessaire pour obtenir un meilleur rendement de clonage. L'élongation s'effectue avec 10µl d'ADN extraits sur gel, 10mM de dNTP et 0.75 U de taq Gold (Applied®) pendant 10 minutes à 72°C.

Le fragment amplifié a ensuite été inséré dans le vecteur Vivid Colors™ pcDNA™ 6.2/EmGFP/TOPO (Invitrogen™) (Figure 12) qui permet d'insérer la séquence SOD1 en phase avec la séquence de la protéine fluorescente GFP, selon les recommandations du fabricant : 4µL de produit de PCR ont été ajoutés à 1µL de solution saline et 1µL de vecteur. Après une incubation de 8 minutes à température ambiante, des bactéries TOP 10 E. Coli (Invitrogen™) ont été transformées avec ce plasmide. Pour cela, les bactéries ont été mises en présence de 2 µL de plasmide préparé précédemment pendant 30 minutes à 4°C suivi d'un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes pour permettre leur transformation. Les bactéries ont été placées dans du milieu S.O.C à 37 °C sous agitation à 200 rpm pendant 1 h. Elles ont ensuite été placées sur une gélose de LB agar (Gibco® Invitrogen™) contenant 100µg/mL d'ampicilline pendant 12 h à 37 °C.

Les bactéries transformées avec les plasmides ont été cultivées dans du milieu Luria Broth (LB- Gibco®-Invitrogen™) contenant 100 µg/mL d'ampicilline à 37°C pendant 12 h. Les plasmides ont ensuite été extraits et purifiés grâce au kit EndoFree Plasmid Maxi Kit

(Qiagen®). La concentration et la pureté des plasmides ont été déterminées par mesure de la densité optique de la solution de plasmide à 260 et 280 nm.

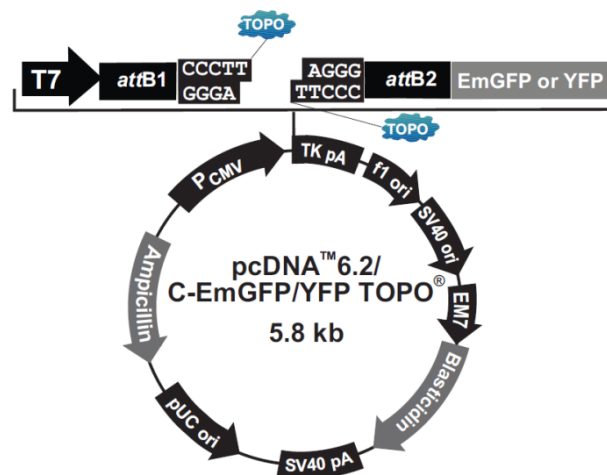


Figure 12 : Carte du plasmide pcDNA™ 6.2/C-EmGFP/TOPO

I.1.6. Séquençage

Le séquençage nous a permis de vérifier la présence des mutations insérées par mutagenèse dirigée ainsi que le bon sens insertion du gène dans le plasmide. Les 2 brins du produit de PCR sont synthétisés séparément. Cette réaction est effectuée dans un volume de 10µL contenant 2,5µL des produits de PCR précédemment obtenus, 2µM d'amorce, 1,5µL de tampon BigDye Terminator v1.1,v3.1 (Applied Biosystems®) et 1µL de mix BigDye Terminator v1.1 cycle (Applied Biosystems®). La réaction de séquençage s'est déroulée selon le programme suivant : une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, suivi de 35 cycles d'1 minute à 95°C, 30 secondes à 60°C et 1 minute à 72°C et une dernière étape d'élongation finale de 10 minutes à 72°C.

Après purification des produits du cycle de séquençage à l'aide du kit de purification Montage Millipore, les séquences d'ADN sont lues par électrophorèse capillaire sur un séquenceur ABI 3130xl 16 capillaires (Applied®) situé sur le site de l'UTTIL de l'hôpital Bretonneau. Les séquences ont ensuite été analysées avec le logiciel CodonCode Aligner.

I.2. Microarray

I.2.1. Extraction et purification des ARN

Après avoir été extrait les ARN des cellules NSC34 selon le protocole décrit au paragraphe II.1.1, les ARN totaux ont été purifiés une seconde fois à l'aide du kit RNeasy micro kit (Qiagen). Aux 20µL d'ARN extrait ont été ajoutés 350µL d'éthanol 70% et 350µL de tampon de lyse RLT. Le mélange a été transféré sur colonne fournie dans le kit et centrifugé 15 secondes à 8000g. Le filtrat a été jeté et 350µL de tampon de rinçage RW1 ont été ajoutés sur la colonne. Après une nouvelle centrifugation de 15 secondes à 8000g et élimination du filtrat, 10µL de DNase et 70µL de tampon RDD ont été ajoutés. La colonne a ensuite été laissée 15 minutes à température ambiante, puis un nouveau rinçage au tampon RW1 et une centrifugation de 15 secondes à 8000g ont été réalisés. 500µL de tampon RPE ont ensuite été ajoutés avant centrifugation à 8000g pendant 15 secondes. Après addition de 500µL d'éthanol 80%, la colonne a été centrifugée 2 minutes à 8000g. Une fois le filtrat jeté, une nouvelle centrifugation identique tube ouvert a été réalisée. La colonne a été placée dans un eppendorf de 1,5mL avant ajout de 14µL d'eau ultrapure (sans DNase) et centrifugation d'une minute à 12000g.

I.2.2. Préparation à l'hybridation sur puce Agilent

La préparation des ARN et l'hybridation sur lames ont été réalisées selon le protocole fourni par Agilent. Une lame SurePrint G3 Mouse GE 8x60K comporte 8 puces identiques, chacune portant 60951 sondes correspondant à 55681 ARN différents et 5270 sondes de contrôle. Les sondes sont des oligomères de 60 nucléotides.

I.2.2.1. Synthèse de l'ADNc

Un contrôle positif « spike-in » dilué successivement au 1/20, puis 1/25 et 1/10 (4µL) a été préparé à partir d'une solution-mère. Après 5 minutes à 37°C la dilution a été centrifugée 10000g 20 secondes. 1µL de solution spike-in diluée a été mélangée à 0,8µL d'amorce promotrice T7 avant centrifugation à 2000g 20 secondes, incubation de 10 minutes à 65°C puis 5 minutes dans la glace. Les échantillons d'ARN obtenus à partir des cultures ont de leurs côtés été dilués pour obtenir des concentrations homogènes de 100ng/µL. Un mélange réactionnel de transcription inverse a été préparé : 1,05mM de dNTPs, 20 mM de

DTT, du tampon « First Buffer » 1X et de 1,2 µL du mélange « affinityScript RNase Block Mix » contenant un cocktail d'enzymes inhibitrices (kit Low Input Quick Amp Labeling Kit, Agilent), ceci dans un volume total de 4,7 µL. Pour la réaction de transcription inverse, 3,5µL d'ARN à 100ng/µL, 1,8µL de spike-in et 4,7 µL de mélange réactionnel de RT précédemment préparés ont été mélangés. Après une incubation 2h à 40°C, le mélange a été soumis à une dénaturation de 15 minutes à 70°C, puis placé 5 minutes dans la glace.

I.2.2.2.Synthèse de l'ARNc marqué à la Cyanine 3

Un mélange réactionnel a été préparé pour le passage des ADNc en ARNc avec incorporation de Cyanine 3 (Cy₃). Il était composé d'eau sans nucléase, de tampon de transcription 1X, de 16mM de DTT, de 1,6 mM de nucléotides triphosphates (NTP), de Cyanine 3 CTP, et de 0,21µL de T7 RNA Polymerase Blend contenant un cocktail de polymérases (kit Low Input Quick Amp Labeling Kit, Agilent), ceci dans un volume final de 6µL. Après homogénéisation, le mélange a été incubé 2h à 40°C, centrifugé 20 secondes à 10 000g, puis stocké à -20°C. Les ARNc marqués Cy₃ obtenus ont ensuite été purifiés. Pour cela 16µL d'ARNc marqué à la Cy₃ ont été additionnés de 84µL d'eau sans nuclease et 350µL de tampon RLT. Ce mélange a été transféré sur une colonne avant centrifugation 30 secondes à 15 000g 4°C. L'éluat a été jeté et 500 µL de tampon RPE ont été ajoutés sur la colonne avant une nouvelle centrifugation de 30 secondes. Après une autre centrifugation de 1 minute, 30 µL d'eau sans RNase ont été ajoutés sur la colonne pour l'élution des ARNc marqués. Pour cela, après une incubation de 1 minute, la colonne a été centrifugée 1 minute à 18 000g. A partir de la solution obtenue, 1,2µL d'ARNc marqués ont été dosés via le Nanodrop® et des dilutions ont effectuées pour obtenir une concentration finale en ARNc marqués de 80ng/µL.

I.2.2.3.Hybridation sur puce 8x60k et lavages

Une solution de blocage (Blocking agent, Agilent) lyophilisée a été réhydratée dans 1250µL d'eau sans nucléase, mélangée par vortex et centrifugée 20 secondes à 10 000g. Une solution de fragmentation a également été préparée. Elle était constituée d'eau sans nucléase, de 16µL d'ARNc à 50ng/µL marqué à la Cyanine 3 (800ng d'ARNc), de GE blocking agent 1X et de tampon de fragmentation 1X, soit 25µL final. Le mélange a été homogénéisé par vortex, centrifugé 20 secondes à 10 000g et incubé 30 minutes dans le noir à 60°C avant une nouvelle centrifugation de 20 secondes à 10 000g. 25µL de tampon Hi-rpm Hybridization 2x ont été ajoutés à la solution de fragmentation permettant d'obtenir un mélange d'hybridation

qui a été mélangé par vortex et centrifugé 20 secondes à 10 000g. 40µL du mélange d'hybridation ont été déposés par puce sur une lame de micro-array. L'étape d'hybridation entre ARNc marqués et les sondes de la puce a été réalisée par hybridation de 17h à 65°C dans un four avec agitation rotative de 10rpm. La lame a été lavée 1 minute dans un tampon Wash 1 puis 1 minute dans un tampon Wash2 à 37°C, avant lecture par un scanner Agilent SureScan 2600D piloté par le logiciel Agilent's Scan control. La conversion du fichier image des puces en fichier texte a été réalisée par le logiciel Feature extraction 9.5.

I.2.3. Bioinformatique

La liste des gènes des voies de la famille de l'ubiquitine a été obtenue sur le site KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) et les données recoupées avec différents autres sites (Ensembl et DDB) afin d'avoir la liste de gènes la plus exhaustive possible. L'analyse des données de micro-array a été faite à l'aide du logiciel GeneSpring (Agilent ; paramètres par défaut du constructeur). Afin de déterminer les gènes dont l'expression était significativement modulée entre nos conditions expérimentales, nous avons utilisé un test de Student, et la p value a été corrigée par la méthode de correction de tests multiples de Benjamini-Hochberg FDR (False Discovery Rate, ici de 0,05). Nous avons sélectionné les gènes ayant une p value < 0,05. Nous avons utilisé la p value pour sélectionner les gènes d'intérêt et non l'amplitude de variation (Fold change) car celle-ci ne prenant pas en compte les différences de variance entre échantillons contrairement à la p value. Des analyses complémentaires de voies cellulaires ont été faites avec le site <http://david.abcc.ncifcrf.gov/gene2gene.jsp>.

I.3. RT-QPCR

Cette technique permet la mesure de la quantité d'un transcrit présent dans un échantillon. Pour cela, la réaction de PCR est réalisée en présence d'une molécule, ici le SYBR-Green qui s'intercale dans l'ADN double brin au fur et à mesure de l'amplification de l'ADN. Le SYBR-Green émet de la fluorescence uniquement lorsqu'il est intercalé dans l'ADN. Ainsi, l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin. Sur chaque courbe obtenue, le cycle seuil (Ct) est enregistré et correspond au nombre de cycles nécessaires pour que le taux de fluorescence dépasse une valeur seuil correspondant à un rapport signal / bruit de fond défini. Le traitement se fait à l'aide du logiciel LightCycler software®.

Gene	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')	Température d'hybridation	Longueur du fragment	Efficacité du couple d'amorces
<i>Sumo1</i>	ATG TCT GAC CAG GAGGCAAA	TCTCACTGCTATCCTGTCCAA	60°C	99 pb	1,975
<i>Sumo2</i>	GGACAGGATGGTTCTGTGGT	CCAACTGTGCAGGTGTGTCT	60°C	160 pb	2,055
<i>Dorphen</i>	CTAACTTGTTGGGCGAGAAGG	ATCAGCTGCTGCTCCAGATT	60°C	149 pb	2,031
<i>Ube2i</i>	GAGGCTTGTTCAAGCTACGG	GTGATAGCTGGCCTCCAGTC	60°C	174 pb	1,975
<i>Senp1</i>	CGAAGTCTTTGCCTCGAAAC	GCAGGCTTAATGGGAAATGA	60°C	119 pb	2,008
<i>Senp2</i>	TAAGGTTCTCGGCACCATTC	GGCTGGGATCTCATCAGTGT	60°C	127 pb	2,101
<i>Senp3</i>	AGGTGGACCAAAAATGTGGA	AGAGTTCGCTGGGAGTCAAA	60°C	133 pb	2,134
<i>Senp5</i>	GAGTTGCTGGACCACCCTTA	TCATCCACTGGAGAGGCTTT	60°C	122 pb	2,122
<i>Senp6</i>	CACAGAACTCTGCTGCCAAG	GGCTCACTTTCTTCCTGTGC	60°C	100 pb	1,931
<i>Senp7</i>	AGGGTCAGCAGTCTCAGCAT	ATGGCCGCTTACACATTTTC	60°C	138 pb	1,978
<i>Uhrf2</i>	AACAGCAAGAGGGGGATCTT	CCACGTGAATGTCCATCAGA	60°C	180 pb	2,066
<i>Actine</i>	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	TGATCCACATCTGCTGGAAG	60°C	147 pb	2,007
<i>Gapdh</i>	CTGCACCACCAACTGCTTAG	GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	60°C	108 pb	1,992

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour la qPCR.

Les ARN extraits ont été au préalable traités à la Dnase puis ont subi une transcription inverse suivant le protocole décrit au paragraphe II.1.2. Puis la PCR a été réalisée dans un volume de 10 µL contenant 25 ng d'ADNc, 0,5 µM de chaque amorce (Tableau 6) et 5 µL de Platinum® SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen™). La réaction de PCR a été effectuée grâce au Light-Cycler 480 (Roche Diagnostics) et a consisté en 3 étapes : une étape de pré-incubation de 5 minutes à 95°C puis 45 cycles de 10 secondes à 95°C, 10 secondes à 60°C et 10 secondes à 72°C, et une dernière étape de 5 secondes à 95°C suivi de 1 minutes à 65°C. Les résultats ont été traités de façon relative par rapport à ceux obtenus sur le même matériel biologique pour une amplification utilisant les amorces des gènes de ménage *GAPDH* et *actine*

II. Biologie cellulaire

II.1. Culture NSC34

II.1.1. Culture

Cette lignée cellulaire a été obtenue par fusion de motoneurones et de cellules issues de neuroblastomes murins (Cashman *et al.*, 1982) et ont été fournies par la société Tebu-Bio. Ces cellules ont été cultivées en présence de milieu DMEM supplémenté avec 10 % de SVF

décomplémenté et 100 U/mL de pénicilline/streptomycine dans un incubateur à 37 °C ayant une atmosphère à 5 % de CO₂ et saturée en humidité.

II.1.2. Transfection

Avant chaque transfection, les plaques ont été traitées pendant 2 heures avec de la poly-L-lysine (Sigma) à 50 µg/mL suivi de 2 lavages au PBS. Puis les cellules NSC34 sontensemencées 24h avant transfection. Lors de la transfection, les plasmides et la lipofectamine 2000 (Invitrogen™) ont d'abord été dilués séparément dans du milieu DMEM et laissés à température ambiante pendant 5 minutes. Les solutions contenant les plasmides ont ensuite été ajoutées goutte à goutte aux solutions contenant la lipofectamine et laissées 20 minutes à température ambiante. La solution contenant les plasmides et la lipofectamine a été ajoutée aux cellules goutte à goutte. Au bout de 4 heures, le milieu des cellules est remplacé entièrement par du milieu de culture. Les conditions de chaque transfection ont été résumées dans le tableau suivant :

Plaques	Nombre de cellules	ADN		Lipofectamine 2000	
		quantité d'ADN	volume final de DMEM	quantité de lipofectamine 2000	volume final de DMEM
96 puits	3000	0,25 ng	25 µL	0,5 µL	25 µL
12 puits	200 000	1,6 ng	100 µL	4 µL	100 µL
6 puits	600 000	6 ng	500 µL	15 µL	100 µL
25 cm ²	1 000 000	6 ng	500 µL	15 µL	500 µL

II.1.3. Traitement au peroxyde d'hydrogène, au MG132

48h après transfection, les cellules NSC34 ont été traitées avec 1mM de peroxyde d'hydrogène (Sigma) pendant 3h avant analyse pour mimer un stress oxydatif.

Le MG132 est un inhibiteur de protéasome qui va bloquer les activités enzymatiques des peptidases du protéasome. 16h avant analyse, 0,5 µM de MG132 (Sigma) a été ajouté au milieu de culture des cellules.

II.2. Culture primaire de motoneurones

II.2.1. Dissection des embryons

La culture des motoneurones primaires est obtenue à partir d'embryon de rat à E14. Sous loupe binoculaire, couper la tête et la queue de l'embryon à l'aide de pince et ciseaux. Placer l'embryon sur le ventre, à l'aide d'une pince, retirer le tissu dorsal au-dessus de la

moelle épinière de façon à ouvrir la moelle épinière. Décoller doucement à la moelle épinière du reste du corps. Et à l'aide d'un scalpel, retirer les méninges et les ganglions restés accroché aux côtés de la moelle épinière. Mettre la moelle épinière dans du milieu HBSS sans CaCl_2 et sans MgCl_2 (Gibco) à température ambiante et la découper en douze morceaux.

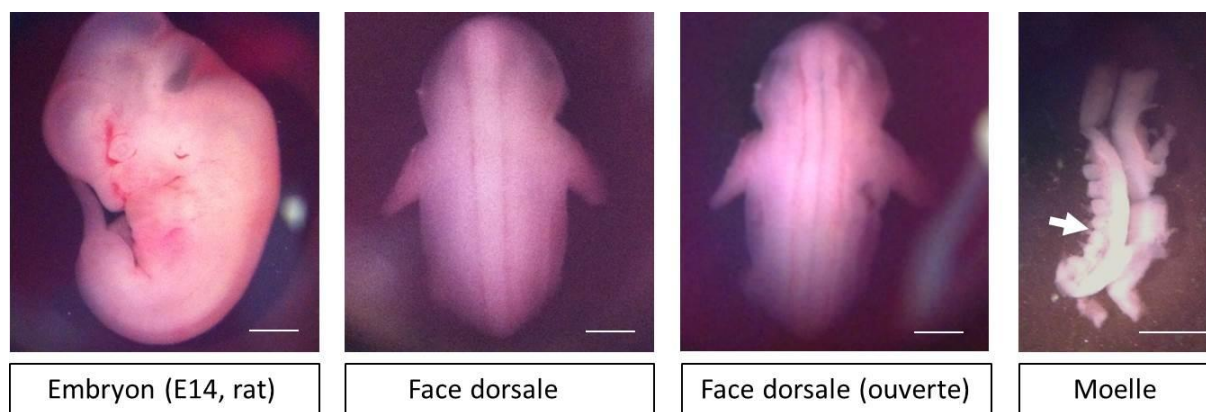


Figure 13: Les différentes étapes de la dissection d'un embryon de rat à E14. La moelle épinière est isolée (tête de flèche) et séparée de ses méninges. Les ganglions spinaux sont supprimés au scalpel (Flèche). Barre d'échelle : 3mm.

II.2.2. Culture

Les fragments de 4 moelles sont transférés dans un tube de 15 mL avec 1 mL de milieu Ham10 (Gibco), 10 μL de trypsine à 2.5% y est ajouté et le tout est incubé à 37°C jusqu'à la formation d'une boule. La boule de moelle est transférée dans 800 μL de milieu L15 complet additionné de 100 μL de BSA à 4% et de 0.1 mg de Dnase. Le tube est agité à la main pour permettre la dissociation des tissus suivi d'une incubation de 2 min pour permettre aux fragments de moelle de redescendre au fond du tube. Le surnageant contenant les cellules sont récupéré dans un nouveau tube. L'expérience est renouvelée jusqu'à dissociation complète des fragments tissulaires. Les surnageants obtenus sont réunis dans un même tube avant d'ajouter au fond du tube et à l'aide d'une pipette pasteur 2mL de BSA 4% (Sigma A 9418). Après centrifugation à 470g 5min, le culot cellulaire est repris dans 1mL de milieu L-15 complet. 4mL de milieu L-15 complet est ensuite ajoutés dans le tube, avant de déposer au fond du tube et à la pipette pasteur 2mL de métrizamide (sc-211905, Santa Cruz). Après une centrifugation à 830g sans frein, le culot cellulaire à l'interface entre le « coussin » de métrizamide (phase inférieure) et le milieu L-15 (phase supérieure) est transféré dans un nouveau tube avant resuspension des cellules dans un volume final de 10mL de milieu L-15. 2mL de BSA 4% est ajouté au fond du tube avant centrifugation de 5 min à 469g. Le culot

est repris dans 200µL de milieu Neurobasal additionné de 2% de B27, 0,5 mM de Glutamine, 25 µM de glutamate, 2% de sérum de cheval et de facteurs de croissance (0,01µg de BDNF, 0,1µg de CNTF, 0,001µg de GDNF).

Après comptage en cellule de Thoma, 10.000 cellules dans 500µL de milieu Neurobasal complet sontensemencées par puits de boîtes 4 puits (Nunc™) préalablement pré-traitées la veille avec 0,1% de poly-ornithine (3mg/mL ; Sigma) puis de la lamine (1mg/mL ; Sigma). Les cellules sont cultivées à 37°C, 5% CO₂.

II.2.3. Transfection

Les transfections sur les motoneurones primaires sont réalisées 24h après ensemencement à l'aide du kit Magnetofectamine Transfection (OZ Biosciences). 1µg de plasmide et 2 µL de lipofectamine 2000 (Invitrogen™) ont d'abord été dilués séparément dans 50 µL de milieu DMEM et laissés à température ambiante pendant 5 minutes. Les solutions contenant les plasmides ont ensuite été ajoutées goutte à goutte aux solutions contenant la lipofectamine et ensuite le mélange est ajouté à un troisième tube contenant 1 µL de CombiMag et laissées 20 minutes à température ambiante. La solution contenant le plasmide, la lipofectamine et le CombiMag est ajoutée aux cellules goutte à goutte et placée sur une plaque magnétique pendant 20 minutes dans l'incubateur. Au bout des 20 minutes, le milieu des cellules est remplacé entièrement par du milieu de culture.

II.3. Test de viabilité et de mortalité

II.3.1. Test de viabilité

Le kit Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories) est un test colorimétrique qui permet d'évaluer les cellules vivantes. 5000 cellules sont ensemencées sur une plaque 96 puits traitées avec de la poly-L-lysine (Sigma) à 50µg/mL pendant 2 heures. 24h après les cellules ont été transfectées par les différents plasmides comme indiqué dans le paragraphe II-1-2. 48h après transfection, 10 µL de solution CCK-8 sont ajoutées dans chaque puits. Au bout de 3h d'incubation, l'absorbance à 450 nm est mesurée par un lecteur à plaque.

II.3.2. Test de mortalité

Le test au bleu de trypan permet d'évaluer la viabilité cellulaire. 48h après transfection, la suspension cellulaire est centrifugée (5min, 2500g) et est ensuite remis en

suspension avec du DMEM. 10 μ L de bleu de trypan (Molecular probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) est ajouté à 10 μ L de la suspension cellulaire et déposé sur une lame (cell counting chamber slide, Invitrogen, Carlsbad, CA). Les cellules vivantes et mortes sont comptées par un compteur de cellules automatisé, Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Carlsbad, CA).

II.4. Immunocytochimie

Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles en verre d'un diamètre de 13 mm. Elles ont été perméabilisées et fixées par 500 μ L de paraformaldéhyde froid par puits d'une plaque 12 puits pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été rincées 3 fois avec du PBS et placées dans 500 μ L d'une solution de blocage des sites non-spécifiques contenant 1 % d'albumine de sérum bovin, 5 % de sérum de cheval et 0,2 % de triton pendant 1 h à température ambiante. Les cellules ont ensuite été marquées par un anticorps primaire dilué au 1/100 dans 500 μ L d'une solution contenant 2,5 % de sérum de cheval et 0,2 % de triton pendant 12 h à 4 °C. Après 2 rinçages avec 500 μ L de PBS par puits, les cellules ont été incubées pendant 1 h à température ambiante avec 250 μ L de solution contenant 2 % de sérum de cheval, 0,1 % de Triton X-100 et un anticorps secondaire couplé à l'alexia 594 dilué au 1/125. Les lamelles ont été montées sur une lame en présence de 10 μ L de ProLong® Gold anti-fade with DAPI (Invitrogen™). L'observation des lames est effectuée au microscope confocal Olympus FV500.

Protéine	Anticorps Primaire	Anticorps secondaire
SOD1	goat polyclonal SOD1 (N-19) sc-8636	Fluoprobes 594 Donkey anti-goat IgG Interchim FP-SD2110
GFP	goat polyclonal GFP (1-16) sc-5385	Fluoprobes 594 Donkey anti-rabbit IgG Interchim FP-SD2110
SUMO1	rabbit polyclonal SUMO1 (FL-101) sc-9060	Fluoprobes 594 Donkey anti-rabbit IgG Interchim FP-SD5110
SUMO2	rabbit polyclonal SUMO2 (FL-103) sc-32873	Fluoprobes 594 Donkey anti-rabbit IgG Interchim FP-SD5110
Ubiquitine	mouse monoclonal Ub (P4D1) sc-8017	Fluoprobes 594 Donkey anti-mouse IgG Interchim FP-SD4110
UHRF2	goat polyclonal UHRF2 (T-18) sc-54252	Fluoprobes 594 Donkey anti-goat IgG Interchim FP-SD2110
UBE2I	goat polyclonal UBE2I (N-15) sc-5231	Fluoprobes 594 Donkey anti-goat IgG Interchim FP-SD2110

Tableau 7: Anticorps utilisés pour les immunocytochimies

II.5. Comptage des agrégats

48H après transfection des NSC34 par les différents plasmides, les cellules sont fixées par 500 μ L de paraformaldéhyde froid par puits d'une plaque 12 puits pendant 30 minutes. Les lamelles sont ensuite montées sur une lame et observé au microscope à fluorescence ANG-EVOSF1. 100 cellules par lamelle ont été comptées dans des champs pris au hasard sur la lamelle. Chaque comptage a été réalisé sur 4 lamelles différentes.

II.6. Quantification de l'intensité de fluorescence par cytomètre de flux

48h après transfection, les cellules NSC-34 sont centrifugées (5 min, 2500g) et le culot cellulaire est resuspendu avec 200 μ L de PBS et 300 μ L de DMEM, soumis au cytomètre en flux (Beckman Coulter). La longueur d'onde d'excitation du laser est de 488 nm et la signal de fluorescence est enregistré après passage d'un filtre de 525 nm. Seules les cellules présentant une fluorescence verte sont comptées et l'intensité moyenne de fluorescence des cellules a été mesurée

II.7. Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM)

Les cellules NSC34 ont étéensemencées sur des lamelles de 25 mn quadrillées et numérotées traitées avec de la poly-L-lysine (Sigma) à 50 μ g/mL pendant 2 heures. Puis les cellules ont été transfectées par les différents plasmides comme indiqué dans le paragraphe II-1-2. 48H après transfection, les cellules ont été observées au microscope confocal Olympus FV500 et quelques cellules par lamelles ont été sélectionnées. Les cellules ont été ensuite préparées pour l'analyse au microscope électronique à transmission par le département des microscopies de la plate forme du PPF Analyse des systèmes biologiques de l'Université de Tours.

II.8. Western blot

II.8.1. Lyse des cellules

L'analyse des protéines a été effectuée 48 h après la transfection des cellules par les plasmides. Les cellules ont d'abord été rincées 2 fois avec du PBS. Elles ont ensuite été lysées par une solution contenant 196 μ L de RIPA (ThermoFischer) et 2 μ L d'EDTA et 2 μ L de cocktail d'inhibiteur de protéase du kit Halt protease Inhibitor cocktail (Thermoscientific) pendant 15 min en agitation dans de la glace. Le surnageant a été récupéré après centrifugation du lysat cellulaire pendant 15 minutes à 14 000 g.

II.8.2. Dosage des protéines

La concentration en protéines du lysat cellulaire a été mesurée par la méthode utilisant l'acide bicinchoninique (kit DC Protein Assay, BioRad). Une gamme étalon (0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 et 1,6 mg/mL) a été réalisée en utilisant comme protéine de l'albumine sérique bovine (BSA, Sigma-Aldrich®). Le dosage des solutions de la gamme étalon a été effectué dans un volume de 230 μ L contenant 5 μ L de la gamme étalon, 25 μ L de solution constituée de la solution S diluée au 1/50 dans la solution A et 200 μ L de la solution B (kit DC Protein Assay Reagent, BioRad). Le dosage des échantillons a également été réalisé dans un volume de 230 μ L constitué de 5 μ L d'échantillon, 25 μ L de solution constituée de la solution S diluée au 1/50 dans la solution A et 200 μ L de la solution B. Ces solutions ont été incubées à température ambiante pendant 15 minutes à l'abri de la lumière. La densité optique des solutions a été mesurée à 750 nm grâce au Nanodrop 2000. A partir de la gamme étalon, la concentration en protéines des échantillons a été déterminée.

II.8.3. Western Blot

Les protéines ont été séparées en fonction de leur poids moléculaire par migration dans un gel précoulé 4-15% mini-Protean TGX (BioRad), 30 μ g de protéines totales préalablement dénaturées ont été déposées dans ce gel. La migration des protéines a été effectuée à un ampérage constant de 50 mA par gel pendant environ 40 minutes. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de 0,2 μ M de polyvinylidène difluoride (PVDF-Biorad) grâce à un système de transfert Transblot turbo (BioRad).

Les sites non-spécifiques de la membrane de PVDF ont été saturés pendant 1 h à température ambiante avec une solution de tampon Tris contenant 0,05 % de Tween 20 et 5 %

de lait écrémé Régilait. Les membranes ont ensuite été incubées toute la nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire dilué au 1/500 dans du TBST avec 2 % de lait écrémé. Les membranes ont ensuite été mises en présence d'une solution de TBST contenant 2 % de lait écrémé et un anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué au 1/2500 pendant 45 minutes sous agitation à température ambiante. La présence des protéines reconnues par les anticorps a ensuite été révélée par incubation des membranes pendant 1 minute dans la solution du kit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology). Afin de s'affranchir d'une différence dans la quantité de protéines totales déposées dans les puits, la quantité de GAPDH présente dans chaque piste a été mesurée par immunomarquage.

Protéine	Anticorps Primaire	Anticorps secondaire
SOD1	goat polyclonal SOD1 (N-19) sc-8636	rabbit anti-Goat IgG HRP conjugué Zymed 81-1620
GFP	goat polyclonal GFP (1-16) sc-5385	rabbit anti-Goat IgG HRP conjugué Zymed 81-1620
SUMO1	rabbit polyclonal SUMO1 (FL-101) sc-9060	anti-rabbit HRP conjugué Promega W401B
SUMO2	rabbit polyclonal SUMO2 (FL-103) sc-32873	anti-rabbit HRP conjugué Promega W401B
Ubiquitine	mouse monoclonal Ub (P4D1) sc-8017	anti-mouse HRP conjugué Promega W402B
UHRF2	goat polyclonal UHRF2 (T-18) sc-54252	rabbit anti-Goat IgG HRP conjugué Zymed 81-1620
UBE2I	goat polyclonal UBE2I (N-15) sc-5231	rabbit anti-Goat IgG HRP conjugué Zymed 81-1620
GAPDH	goat polyclonal GAPDH sc-48166	rabbit anti-Goat IgG HRP conjugué Zymed 81-1621

Tableau 8: Anticorps utilisées pour le western-blot

III. Bio-informatique

III.1. Identification des sites de SUMOylation

Le logiciel SUMOsp (<http://sumosp.biocuckoo.org/down.php>, Ren et al. ; 2009) permet d'identifier à partir de la séquence protéique, les sites potentiels de SUMOylation. Le logiciel prédit les sites à partir du motif ψ KxE/D ; ψ correspondant à un résidu hydrophobe, x à un résidu quelconque et E/D au glutamate ou à l'aspartate respectivement ainsi que les motifs SIMs déjà identifiés (151 motifs identifiés à partir de 80 protéines).

III.2. Logiciel des conséquences de mutation

Le logiciel Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, Adzhubei, 2010) est un outil qui permet de prédire l'impact possible d'une substitution d'acide aminé sur la structure et la fonction d'une protéine. Le logiciel utilise 2 bases de données. HumDiv qui compile 3155 allèles défectueux annoté dans la base de donnée UniProt comme provoquant des maladies mendélienne humaines et affectant la stabilité ou la fonction des protéines ainsi que les différences entre 6321 protéines humaines et leurs homologues mammifères étroitement liés. La seconde base de donnée HumVar3 se compose des 13032 mutations pathogènes d'UniProt et des 8946 non sens SNP (nsSNPs) sans implication dans des maladies donc traités comme non pathogènes.

III.3. Modélisation des protéines

La structure 3D de la protéine SOD1 (PDB : 1PU0) a été déterminé par cristallographie aux rayons X. Nous avons utilisé les coordonnées de cette structure pour modéliser les formes sauvage et mutante de la protéine SOD1 avec le serveur SWISSMODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>). La représentation a été obtenue en utilisant le logiciel PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC).

IV. Statistiques

IV.1. Test de Mann-Withney

Le test de Mann-Whitney permet de tester l'identité de deux échantillons : il porte sur le fait que deux séries de valeurs numériques (ou ordinales) sont issues d'une même distribution.

IV.2. Test de Kruskal & Wallis

Le test de Kruskal & Wallis permet de comparer au moins trois échantillons, et tester l'hypothèse nulle suivant laquelle les différents échantillons à comparer sont issus de la même distribution ou de distributions de même médiane.

RESULTATS

mutations et délétions identifiées au sein de notre cohorte de patients SLA à Tours sont représentées en bleu. Adapté de Valentine et al., 2005.

Dans notre cohorte de patients SLA ($n > 1000$), nous avons identifié 3 nouvelles mutations ponctuelles non décrites dans les bases de données, V31A, V119L et E121G, ainsi que 4 délétions, dont 3 entraînant un codon stop prématuré, I18Stop21, K128Stop131 et K136Stop. Pendant ma thèse j'ai réalisé des analyses fonctionnelles sur 3 d'entre elles, les mutations V31A et E121G présentées dans le paragraphe suivant et la délétion I18Stop21 présentée en annexe.

Nous avons tout d'abord mis au point une stratégie d'étude permettant d'étudier les conséquences fonctionnelles, et donc entre autres pathogènes, de nouvelles mutations du gène SOD1 (Figure 15). Dans un premier temps, nous réalisons une étude bioinformatique au niveau du gène et de la protéine, nous permettant d'évaluer la pathogénicité potentielle de la mutation à l'aide du logiciel PolyPhen et d'étudier la conséquence de la mutation sur la structure 3D de la protéine grâce à l'outil de modélisation Swiss model et à l'outil de visualisation PyMOL. Dans un deuxième temps, nous réalisons diverses études fonctionnelles *in vitro*, comme l'étude de la viabilité cellulaire, de la localisation de la protéine SOD1 mutée, de la formation d'agrégats, entre autres. Cette stratégie d'étude mise en place pour l'analyse des mutations du gène SOD1 est bien sur utilisable également pour des études sur d'autres gènes impliqués dans la SLA.

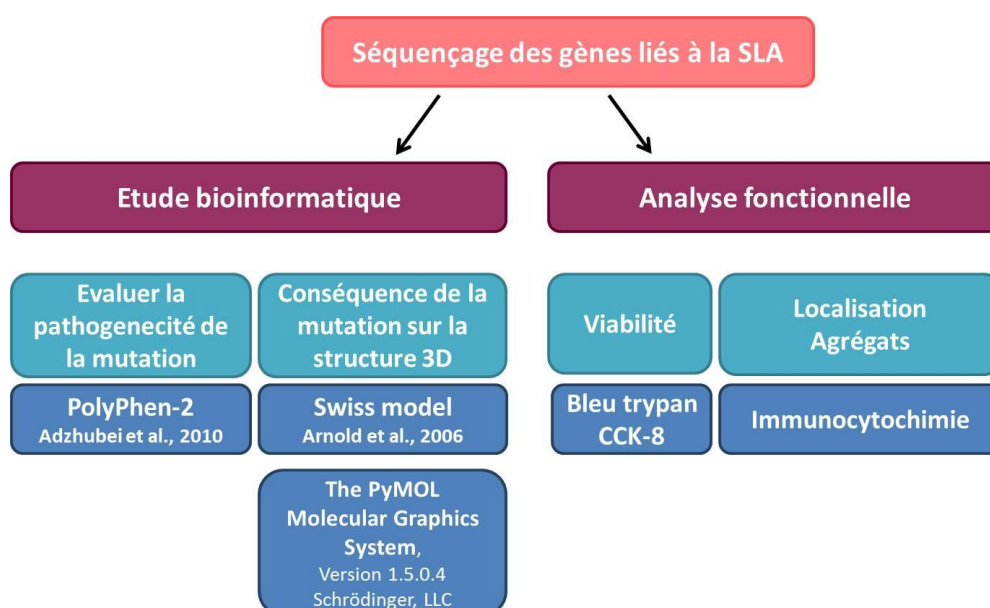


Figure 15: Stratégie développée pour l'étude de nouvelle mutation de gène lié à la SLA.

I.2. Nouvelles mutations identifiées

I.2.1. V31A

A novel *SOD1* mutation p.V31A identified with a slowly progressive form of Amyotrophic Lateral Sclerosis.

A. Dangoumau et al., Neurobiology of Aging, 2014

Un patient d'origine bulgare présentait une détérioration progressive au niveau des membres inférieurs à l'âge de 45 ans. A 53 ans, le patient montrait une atrophie musculaire distale des membres inférieurs. Les examens cliniques ont diagnostiqué une SLA. Onze ans après l'apparition de la maladie, le patient marche à l'aide d'une canne.

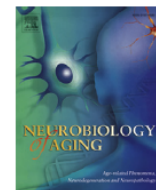
Le séquençage des 5 exons du gène *SOD1* a révélé une mutation hétérozygote d'un nucléotide c.95T>C dans l'exon 2 provoquant un changement d'une valine en alanine à la position 31 de la protéine *SOD1*. La mutation de la valine en position 31 n'avait pas été encore observée dans notre cohorte de patient SLA, ni répertoriée dans la base de données ALSoD. Une étude bioinformatique par le logiciel PolyPhen indiquait que cette variation était « probablement dommageable » avec un score élevé de 0,97 (score entre 0 et 1), supportant l'importance de la valine 31 pour la protéine. Puis nous avons analysé la conséquence de cette mutation sur la conformation 3D de la protéine par modélisation moléculaire. Nous avons observé que cette valine 31 était localisée dans un brin β au sein du baril β de la protéine, proche du centre catalytique de l'enzyme. L'étude du modèle 3D de la protéine *SOD1*V31A, n'a pas suggéré de variation structurelle importante dans la structure de la protéine mutée.

Nous avons ensuite analysé les conséquences fonctionnelles de la mutation V31A. Par mutagenèse dirigée, nous avons produit un plasmide exprimant *SOD1*^{V31A} couplée à la GFP en C-terminal et sous la dépendance d'un promoteur CMV. 48 heures après transfection d'une lignée cellulaire de motoneurones NSC-34 et en présence d'un stress oxydant (3 heures avec 1mM d'H₂O₂), nous avons observé une diminution significative de la viabilité cellulaire des cellules exprimant *SOD1*^{V31A-GFP} comparativement à *SOD1*^{WT} (wild type)-GFP. Ces résultats étaient comparables à ceux obtenus avec le mutant *SOD1*^{G93C} (contrôle positif). Des analyses par microscopie confocale, nous ont ensuite permis d'observer que la protéine *SOD1*^{V31A} présentait une expression nucléo-cytoplasmique comme *SOD1*^{WT-GFP}. En revanche, la présence d'agrégats GFP positifs n'était visible que dans des cellules NSC-34 exprimant *SOD1*^{V31A}. Ces agrégats étaient localisés dans le cytoplasme mais aussi le noyau. Notre

témoin positif, le mutant SOD1^{G93A-GFP} très étudié dans la littérature, montrait quant à lui la présence d'agrégats GFP uniquement dans le cytoplasme.

Ce travail a donc permis d'identifier une nouvelle mutation du gène SOD1, V31A, qui est associée à une SLA à évolution lente, supportant l'idée avancée dans d'autres travaux d'une corrélation entre phénotype et génotype pour les mutations SOD1 dans la SLA. De manière très intéressante, quelques mois après la parution de notre travail, une équipe japonaise est venue confirmer la pathogénicité de cette mutation et le fait que cette mutation soit associée à une forme à évolution lente. Le patient d'origine japonaise présentait toutefois une SLA atypique car le système moteur ne semblait pas le seul affecté (déficits sensoriels,...). L'imagerie par IRM montrait entre autres une atrophie cérébelleuse, ce qui n'était pas le cas chez le patient que nous avons étudié.

Nos travaux sur le mutant SOD1^{V31A} ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Neurobiology of Aging* présentée ci-après.



Brief communication

A novel *SOD1* mutation p.V31A identified with a slowly progressive form of amyotrophic lateral sclerosis

Audrey Dangoumau^a, Annie Verschuere^b, Ellen Hammouche^c, Marie-Amélie Papon^a, Hélène Blasco^{a,c}, Catherine Cherpi-Antar^{a,c}, Jean Pouget^b, Philippe Corcia^{a,d}, Christian R. Andres^{a,c}, Patrick Vourc'h^{a,c,*}

^a UMR INSERM U930, Université François-Rabelais, Tours, PRES Centre – Val de Loire Université, France

^b Centre de référence des maladies neuromusculaires et de la SLA, CHU La Timone, Marseille, France

^c CHRU de Tours, Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire, Tours, France

^d Centre SLA, CHU Bretonneau, Tours, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2013

Received in revised form 2 July 2013

Accepted 15 July 2013

Keywords:

ALS

SOD1

Mutation

ABSTRACT

The *SOD1* gene encoding the superoxide dismutase 1 (*SOD1*) protein is mutated in approximately 15% of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and 3% of sporadic ALS. We identified a novel mutation in *SOD1* in a man who presented at age 49 with lower limb stiffness, and at age 53, a spastic paraparesis with distal muscular atrophy in the lower limbs and fasciculations in the quadriceps. A diagnosis of ALS was established. Eleven years after disease onset his condition continues gradually and slowly to deteriorate. The heterozygous mutation observed in exon 2 resulted in a valine to alanine substitution at position 31 in the β -barrel domain of the *SOD1* protein. Functional analysis in NSC34 cells showed that the overexpression of the mutant form of *SOD1*^{V31A} induced aggregates and decreased cell viability. This mutation is located outside of the regions carrying most of the ALS-related mutations (i.e., the catalytic center, the region of dimerization, and the loops between the β -strands of the β -barrel). In conclusion, we identified a novel *SOD1* mutation in a patient with slow disease progression and supported the idea that different *SOD1* mutations can lead to distinct ALS phenotypes.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult neurodegenerative disease characterized by a progressive paralysis of skeletal muscles because of the degeneration of motor neurons in the central nervous system. ALS is a fatal disease, with median survival of 3–5 years. Five to ten percent of patients report a history of ALS in their family; the others are considered sporadic cases (Turner et al., 2013). Mutations in the *SOD1* gene have been described in familial (15%) and sporadic (approximately 3%) cases (Andersen and Al-Chalabi, 2011; Rosen et al., 1993). More than 150 missense mutations and few deletions have been described to date in the *SOD1* gene in ALS patients (ALSoD: <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>; Abel et al., 2012), with phenotypic variations probably depending of the location of the mutations (Juneja et al., 1997; Radunovic and Leigh, 1996). We identified a novel dominant missense mutation in *SOD1* in an ALS patient with slowly progressing disease.

2. Case report

2.1. Clinics

The patient, a male of Bulgarian origin, developed lower limb stiffness at age 49 years with progressive deterioration. Abnormal nocturnal cramps in his legs were present. The neurological exam at age 53 years showed spastic paraparesis with distal muscular atrophy in his lower limbs, and fasciculations in his quadriceps. Pathological hyperreflexia in his arms and patellar reflex, and bilateral Babinski sign were present, but with absent ankle reflexes. Muscular testing was normal at his upper limbs as were bulbar function and sensory exam. There was no cognitive, cerebellar, or sphincter disturbances. His nerve conduction study was normal. Needle electrode examination showed chronic denervation in 4 lower limb muscles and in both deltoid muscles. Cranial and total spinal magnetic resonance imaging revealed no significant abnormalities. Cerebrospinal analysis was normal including immunoelectrophoresis. According to revised El Escorial criteria, a diagnosis of probable ALS was been established. His condition gradually deteriorated with increased stiffness and weakness in his lower limbs. Eleven years after disease onset, he walked using a walker.

* Corresponding author at: INSERM U930, Equipe Neurogénétique et Neuro-métabolomique, Faculté de Médecine, 10 bd Tonnellé, 37032 Tours, France. Tel.: +33 (0)2 34 37 89 10; fax: +33 (0)2 47 36 61 85.

E-mail address: vourc'h@med.univ-tours.fr (P. Vourc'h).

His upper limb motor function was normal with fasciculation in his deltoid muscles. Bulbar and respiratory functions were normal. The clinical phenotype included predominant upper motor neuron findings on examination with lower motor neuron signs in lower limbs and very slow progression to upper limbs.

2.2. Genetic and bioinformatics analysis

After informed consent was obtained, DNA was extracted from a peripheral blood sample using a standard procedure. The 5 exons and flanking regions of the *SOD1* gene were analyzed using bidirectional sequencing analysis (3130xl Sequencer, Applied Biosystems). We also analyzed other major ALS-related genes using direct sequencing or gene scanning (*TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72*) and the risk factor *SMN1* using genescan analysis (Corcia et al., 2006). Sequencing analysis of exon 2 of *SOD1* was done in 600 French ALS patients. The Swiss-Model protein structure homology-modeling server (<http://swissmodel.expasy.org/>; *SOD1* Protein Data Bank accession number 2C9V) were used to gain insight into the possible consequences of the mutation on the 3-D structure of the protein. The prediction program PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) was used to evaluate the pathogenicity of the mutation.

2.3. Functional analysis

Full-length human *SOD1* cDNA was obtained using reverse transcription polymerase chain reaction on total RNA from leukocytes of a control individual. Mutants *SOD1*^{V31A}-GFP and *SOD1*^{G93C}-GFP (positive control) were generated using Site-Directed Mutagenesis, before insertion into pcDNA6.2/C-EmGFP-Gw/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Plasmids were amplified in TOP10 *Escherichia coli* bacteria, purified, and sequenced. For functional analysis, the mouse motor neuron cell line NSC34 cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) medium were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). A Trypan blue assay was used to evaluate cell viability. Briefly, transfected cells (48 hours after transfection) were trypsinized, centrifuged, and

resuspended in DMEM before addition of Trypan blue (Molecular Probes, Invitrogen) and analysis in a Countess Automated Cell Counter (Invitrogen). Transfected cells immunostained with antibodies against Small Ubiquitin-Like Modifier (SUMO1) and SUMO2/3 (Santa-Cruz Biotechnology, sc-9060 and sc-32873) were observed using a confocal microscope (Olympus FV500).

3. Results

Sequencing analysis indicated a novel heterozygous mutation in exon 2 of the *SOD1* gene in an ALS patient of Bulgarian origin. This transition c.95T>C resulted in an amino acid change from valine to alanine at position 31 (p.V31A). No variation was found in the genes *C9ORF72*, *TARDBP*, or *FUS*, and the copy number of *SMN1* gene (2 copies). The V31A variation was absent in our cohort of 600 ALS patients of French origin and was not reported in the ALSod database. It was also absent in control individuals of the 1000 Genomes database (<http://browser.1000genomes.org>). The prediction program PolyPhen-2 indicated that the p.V31A mutation was "probably damaging" with a high score of 0.97 (range, 0–1) supporting its functional importance. We next analyzed a possible structural modification of the mutated superoxide dismutase 1 (*SOD1*)^{V31A} protein by using the modeling server Swiss-Model (Fig. 1). We first observed that valine 31 was located inside a β strand of the β -barrel of *SOD1*, at distance from the catalytic center of *SOD1* (Fig. 1D; region of the Cu²⁺ and Zn²⁺ ions) and the region of dimerization (Fig. 1D; behind the structure). When the mutation p.V31A was introduced into the model we did not detect important structural variation. However, the shape of a β strand close to the one carrying the mutation might be slightly modified (Fig. 1D; asterisk). To gain insight into the functional consequence of the p.V31A mutation, we transfected the NSC34 motor neuron cell line with plasmids expressing various forms of *SOD1* proteins. We observed that rapidly after transfection (48 hours) NSC34 expressing *SOD1*^{V31A} showed decreased cell viability when exposed to an oxidative stress (H₂O₂ 1 mM for 3 hours). This decrease is similar to that measured in culture of NSC34 cells expressing *SOD1*^{G93C} and exposed to this oxidative

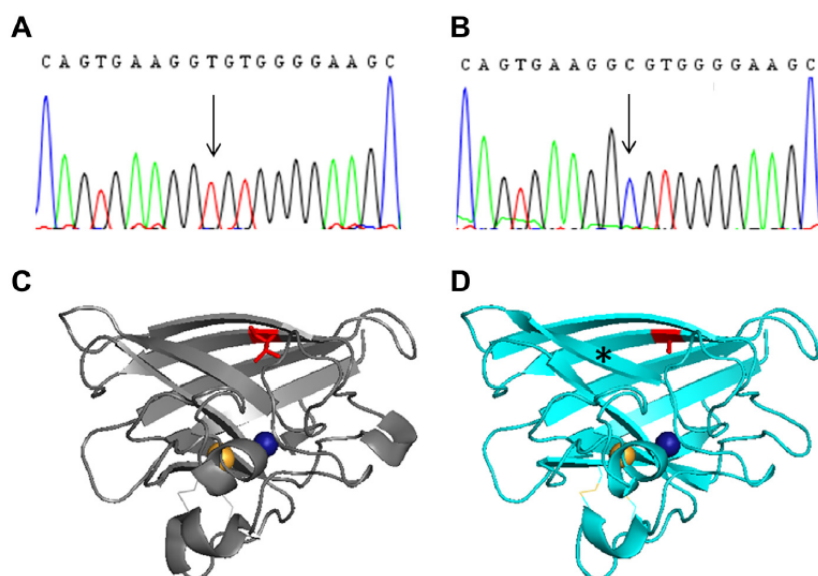


Fig. 1. *SOD1* mutations (wild type [WT] allele [A] and mutated allele [B]) and 3-dimensional structures of the superoxide dismutase 1 protein wild type (C; x-ray structure, PDB 2C9V) and mutated 31A (D; model). The ions Cu²⁺ (yellow) and Zn²⁺ (blue) are indicated by spheres, the amino acids (position and lateral chain), valine and alanine are in red. The asterisk indicates a possible change in the shape of a β -strand in proximity with mutation 31A.

stress (positive control for ALS-related mutation; data not shown). We next analyzed the localization of wild type versus mutant forms of SOD1 proteins in NSC34 transfected cells. SOD1^{WT} type and SOD1^{V31A} were localized in the cytoplasm and nucleus. However, only SOD1^{V31A} showed aggregates (Fig. 2A). Similar to what is known for SOD1^{G93A} (Sau et al., 2007), SOD1^{G93C} was excluded from the nucleus and cells showed aggregates positive for SOD1^{G93C}. We previously observed that aggregates containing SOD1^{G93C} are positive for the small ubiquitin modifier SUMO1 and SUMO2 suspected to be involved in the formation of aggregates (Dangoumau et al., 2013). We showed here that the aggregates containing the novel SOD1^{V31A} mutant were also positive for SUMO1 and SUMO2/3 (Fig. 2B).

4. Discussion

We found a novel heterozygous dominant mutation (p.V31A) in the *SOD1* gene in a 53-year-old Caucasian Bulgarian man with apparent sporadic ALS. However, the patient declared that his

mother (died at 72 years of age) and his 2 brothers (died at approximately 70 years of age) had difficulty walking. The prediction program PolyPhen-2 supported a pathogenic consequence for this mutation. However, no segregation information was available for confirmation because no DNA was available for other members of his family. This novel mutation, SOD1^{V31A}, was observed in a Balkan patient. Further studies will show whether this mutation is specific of this population as hypothesised for other *SOD1* gene mutations, such as p.D90A in northern Europe and p.L144F also in Balkan countries (Corcia et al., 2011; Rabe et al., 2010; Sjölander et al., 1995).

The phenotype of the patient is characterized by a slowly progressive and not aggressive phenotype of the disease. Part of this observation could be explained by our in silico analysis that indicated that the mutation p.V31A could moderately affect the structure of the SOD1 protein and that this position is far from regions carrying ALS-mutations with rapid and aggressive phenotypes (i.e., the catalytic center, the region of dimerization, and the loops between β -strands of the β -barrel such as p.G93C). However, the

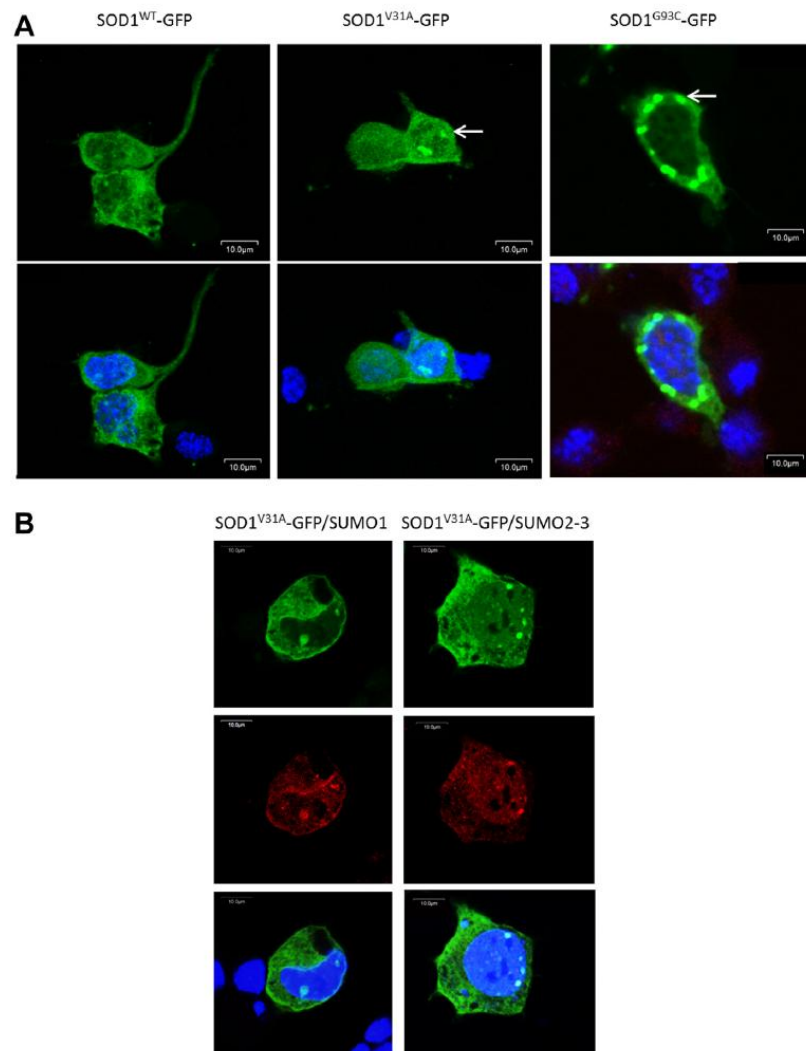


Fig. 2. (A) Localization of SOD1^{WT}-GFP, SOD1^{V31A}-GFP, and SOD1^{G93C}-GFP proteins in NSC34 48 hours after transfection (aggregates are indicated by arrows). (B) Colocalization of SOD1^{V31A}-GFP (green) with SUMO1 and SUMO2/3 (red) in aggregates. DAPI (blue color) is used for nuclear staining. Scale bars, 10 μ m. Abbreviations: DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; GFP, green fluorescent protein; SUMO, Small Ubiquitin-Like Modifier; WT, wild type.

mutation A4V, located inside a β -strand of the β -barrel similar to the mutation p.V31A, is associated with a form of ALS with rapid progression (Cudkowicz et al., 1998; Juneja et al., 1997). Another interesting observation could explain the slowly progressive form of ALS in the patient. The SOD1^{V31A} mutant is present in the cytoplasm and the nucleus of NSC34 cells, similar to SOD1^{wild type}, but in contrast to the ALS mutant SOD1^{G93C}, excluded from the nucleus. However both mutants were associated with aggregates underlying a common pathogenic mechanism.

In conclusion, this novel SOD1^{V31A} mutation in a patient with a slowly progressive form of ALS supports the idea of a genotype-phenotype correlation for distinct SOD1 mutations (Radunović and Leigh, 1996; Tortelli et al., 2013). Our results also support the idea that part of mutant SOD1 toxicity might arise from a reduced nuclear protection from the active SOD1 (Sau et al., 2007).

Disclosure statement

The authors declare no actual or potential conflicts of interest. Patients and family members provided informed written consent in accordance with protocols approved by the academic institutions.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the association ARSLA. M.-A. Papon is supported by a postdoctoral fellowship from the Large-Scale Integrating Project GENCODYS–Genetic and Epigenetic Networks in Cognitive Dysfunction (241995), which is funded by the EU FP7 Health program.

References

Abel, O., Powel, J.F., Andersen, P.M., Al-Chalabi, A., 2012. ALSod: a user-friendly online bioinformatics tool for amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Hum. Mutat.* 9, 1345–1351.

Andersen, P.M., Al-Chalabi, A., 2011. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat. Rev. Neurol.* 7, 603–615.

Corcia, P., Camu, W., Halimi, J.M., Vourc'h, P., Antar, C., Vedrine, S., Giraudeau, B., De Toffol, B., Andres, C.R., 2006. SMN1 gene, but not SMN2, is a risk factor for sporadic ALS. *Neurology* 67, 1147–1150.

Corcia, P., Petiot, P., Stevic, Z., Vourc'h, P., Morales, R., Gordon, P.H., Pageot, N., Andres, C., Camu, W., 2011. Respiratory onset in an ALS family with L144F SOD1 mutation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 82, 747–749.

Cudkowicz, M.E., McKenna-Yasek, D., Chen, C., Hedley-Whyte, E.T., Brown Jr., R.H., 1998. Limited corticospinal tract involvement in amyotrophic lateral sclerosis subjects with the A4V mutation in the copper/zinc superoxide dismutase gene. *Ann. Neurol.* 43, 703–710.

Dangoumau, A., Veyrat-Durebex, C., Blasco, H., Praline, J., Corcia, P., Andres, C.R., Vourc'h, P., 2013. Protein SUMOylation, an emerging pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Int. J. Neurosci.* 123, 366–374.

Juneja, T., Pericak-Vance, M.A., Laing, N.G., Dave, S., Siddique, T., 1997. Prognosis in familial amyotrophic lateral sclerosis: progression and survival in patients with glu100gly and ala4val mutations in Cu, Zn superoxide dismutase. *Neurology* 48, 55–57.

Rabe, M., Felbecker, A., Waibel, S., Steinbach, P., Winter, P., Müller, U., Ludolph, A.C., 2010. The epidemiology of CuZn-SOD mutations in Germany: a study of 217 families. *J. Neurol.* 257, 1298–1302.

Radunović, A., Leigh, P.N., 1996. Cu/Zn superoxide dismutase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis: correlation between genotype and clinical features. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 61, 565–572.

Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.

Sau, D., De Biasi, S., Vitellaro-Zuccarello, L., Riso, P., Guarnieri, S., Porri, M., Simeoni, S., Crippa, V., Onesto, E., Palazzolo, I., Rusmini, P., Bolzoni, E., Bendotti, C., Poletti, A., 2007. Mutation of SOD1 in ALS: a gain of a loss of function. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1604–1618.

Själänder, A., Beckman, G., Deng, H.X., Iqbal, Z., Tainer, J.A., Siddique, T., 1995. The D90A mutation results in a polymorphism of Cu, Zn superoxide dismutase that is prevalent in northern Sweden and Finland. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1105–1108.

Tortelli, R., Conforti, F.L., Cortese, R., D'Errico, E., Distaso, E., Mazzei, R., Ungaro, C., Magariello, A., Gambardella, A., Logroscino, G., Simone, I.L., 2013. Amyotrophic lateral sclerosis: a new missense mutation in the SOD1 gene. *Neurobiol. Aging* 34, 1709.e3–1709.e5.

Turner, M.R., Hardiman, O., Benatar, M., Brooks, B.R., Chio, A., De Carvalho, M., Ince, P.G., Lin, C., Miller, R.G., Mitsumoto, H., Nicholson, G., Ravits, J., Shaw, P.J., Swash, M., Talbot, K., Traynor, B.J., Van den Berg, L.H., Veldink, J.H., Vucic, S., Kiernan, M.C., 2013. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 12, 310–322.

I.2.2. E121G

A novel p.E121G SOD1 mutation in slowly progressive form of Amyotrophic Lateral Sclerosis induces cytoplasmic aggregates in cultured motor neurons and reduces cell viability.

A. Dangoumau et al., soumis Amyotrophic lateral sclerosis and Frontotemporal Degeneration

Une patiente de 74 ans présentant des difficultés de la marche depuis plusieurs années montrait une atrophie musculaire des 4 membres lorsque le diagnostic de SLA a été posé. L'analyse des 5 exons du gène SOD1 a été effectuée. Le séquençage a mis en évidence une mutation d'un nucléotide c.365A>G dans l'exon 5 du gène SOD1. Cette substitution entraîne le changement d'un acide aminé, un acide glutamique en glycine en position 121 de la protéine SOD1 (p.E121G). Cette variation était absente dans les bases de données ALSoD et 1000 genomes project, ainsi que dans notre cohorte de patients SLA d'origine Française.

L'alignement de séquence chez plusieurs espèces de mammifères a montré une forte conservation de la région autour de l'acide glutamique E121, suggérant un rôle important pour cette région. Le logiciel PolyPhen a indiqué avec un score de 0,997 (score entre 0 et 1) prédisant donc que cette mutation était « probablement dommageable ». La modélisation tridimensionnelle de la protéine SOD1E121G n'a pas montré de modification structurale importante. Il était toutefois intéressant d'observer que l'acide aminé E121 est situé à proximité d'une des trois histidines liant le cuivre.

Nos études fonctionnelles ont ensuite montré une réduction de la viabilité des cellules motoneuronales NSC-34 transfectées par un plasmide exprimant SOD1E121G et exposées à un stress oxydant (1mM d'H₂O₂ pendant 3 heures). Cette mutation de SOD1 induisait par ailleurs la formation d'agrégats cytoplasmiques dans les NSC-34. Ces agrégats étaient positifs pour SOD1 et pour l'Ubiquitine. En vue d'améliorer notre stratégie d'études fonctionnelles des gènes mutés dans la SLA, nous avons alors mis en place au laboratoire avec l'aide du Dr Brigitte Pettmann la culture primaire de motoneurones d'embryons de rats. Nous avons transfectés ces cellules par les plasmides exprimant SOD1E121G-GFP ou SOD1WT-GFP. Nous avons ainsi pu montrer la formation d'agrégats cytoplasmiques dans les motoneurones exprimant cette nouvelle forme mutée de SOD1.

Ces travaux sont soumis dans le journal Amyotrophic lateral sclerosis and Frontotemporal Degeneration (ci-après).

A novel p.E121G SOD1 mutation in slowly progressive form of Amyotrophic Lateral Sclerosis induces cytoplasmic aggregates in cultured motor neurons and reduces cell viability.

Audrey Dangoumau¹, Romain Deschamps², Charlotte Veyrat-Durebex¹, Brigitte Pettmann³, Philippe Corcia^{1,5}, Christian R. Andres^{1,4}, Patrick Vourc'h^{1,4,*}

¹ UMR INSERM U930, Université François-Rabelais, Tours, France

² Hôpital Pierre Zobda-Quitman, Service de Neurologie, Fort de France, France

³ Université de la Méditerranée, Institut Méditerranéen de Neurobiologie, INMED, Marseille, France

⁴ CHRU de Tours, Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire, Tours, France

⁵ CHRU de Tours, Service de Neurologie, Centre SLA, Tours, France

Keywords: ALS, SOD1, aggregates, Ubiquitin

ABSTRACT

Mutations in *SOD1* gene encoding the Cu,Zn superoxide dismutase 1 protein are responsible for Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a fatal neurodegenerative disease. To date a large number of mutations have been reported in *SOD1*, but only few of them have been studied and validated by functional studies. We present a novel mutation in *SOD1* in a woman suffering from slowly progressive ALS. This dominant mutation (c.365A>G) in exon 5 resulted in a substitution of a highly conserved amino acid (p.E121G) of the protein. Functional studies in the motor neuronal cell line NSC34 and in primary culture of mouse motor neurons revealed that this mutation p.E121G induced aggregates positive for SOD1 and ubiquitin, as well as reduced cell viability. These findings identified a novel causal mutation in ALS in close proximity with one of the three histidine residues (H120) of SOD1 interacting with copper.

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis is a fatal adult neurodegenerative disorder characterized by the degeneration of motor neurons in the brain and spinal cord, resulting in paralysis of skeletal muscles. Mutation in the Cu-Zn Superoxide dismutase-1 gene (*SOD1*, 21q22.1) in ALS patients was first discovered in 1993 (Rosen et al., 1993a). More than 150 mutations in the homodimeric metalloenzyme SOD1 have been observed covering all 5 exons of the gene

(ALSoD: <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>; (Abel et al., 2012)), and are thought to be responsible for a toxicity in motor neurons (Cozzolino et al., 2009).

Only very few of these mutations have been studied to reinforce their role in the disease and/or to give insight into the mechanism of motor neuronal cell death. The most studied mutations in *SOD1* are A4V, G37R, G85R and G93A(C) (Rakhit et al., 2007; Ray et al., 2005). We present a novel dominant missense mutation of the *SOD1* gene leading to the change of an evolutionary highly conserved amino acid and responsible for a slowly progressive spinal ALS form in a 74 year-old woman without familial ALS history. This mutation is located in the dimerization domain.

CASE REPORT

Clinics

A 74-year-old woman was seen for the first time for a 4-year-history of gait disturbances. She had no personal medical history. At that time she was able to walk 10 m with two crutches. Clinical examination revealed UMN and LMN signs (Upper and Lower Motor Neuron) in the four limbs. There was no bulbar involvement. Cerebral and spinal MRI were normal as were spinal fluid analysis and blood tests. Nerve conduction studies (NCS) were normal at the four limbs and myography revealed neurogenic pattern with active denervation potentials in the four limbs. Disease progressed slowly leading after 96 months of evolution of predominant distal weakness and muscular atrophy at the four limbs with brisk deep tendon reflexes (DTR). The patient complained of dysarthria and choking. There was neither denutrition nor respiratory insufficiency.

Genetic and bioinformatics analysis

Informed consent was obtained and DNA was extracted from peripheral blood sample using a standard protocol. The repeat region of the *C9ORF72* gene and the five exons and flanking regions of *SOD1* gene were analyzed by repeat-primed PCR/Genescan and bidirectional sequencing analysis respectively (3130xl Sequencer, Applied). Sequencing analysis of the exon number 5 of *SOD1* was done on 800 French ALS patients.

PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) was used to predict the pathogenicity of the mutation. Sequence conservation across species was analysed by multiple alignments. The Swiss-model protein structure homology-modeling server (<http://swissmodel.expasy.org/>; SOD1 PDB accession number 2C9V) was used to analyze the

consequences of the mutation on the 3D structure of SOD1. Pymol molecular graphic system was used for protein visualization.

Functional studies

Human *SOD1* cDNA was obtained by RT-PCR on total RNA from leucocytes of a control individual. SOD1^{WT}, mutant SOD1^{E121G} and SOD1^{A4V} (positive control) were generated by site-directed mutagenesis, and inserted in a pcDNA6.2/C-EmGFP-Gw/TOPO plasmid (Invitrogen). Functional studies were done by transfection of mouse motor neuron NSC34 cell line (Cashman et al., 1992) using lipofectamine 2000 (Invitrogen), and of primary culture of rat motor neurons (Cashman et al., 1992; Raoul et al., 2002) using MagnetofectamineTM (OZ Biosciences). For culture of primary motor neurons, dissected spinal cords of E14 rat embryos were first dissociated (trypsin and mechanically). Motor neurons in the suspension were then isolated using Metrizamide (Santa Cruz Biotechnology, sc-211905) and plated on poly-ornithine/laminin-coated wells in Neurobasal medium (Invitrogen) with BDNF 1ng/mL, GDNF 100 pg/mL, CNTF 10 ng/mL, 2% horse serum, B27, L-glutamine 0.05 mM, L-glutamate 25 μ M, and β -mercaptoethanol 25 μ M.

To evaluate cell viability, NSC34 cultured in T25 flasks for 48 hours post-transfection were analyzed using Trypan blue exclusion test with a Countess Automated cell counter (Invitrogen). Transfected cells immunostained with an antibody against Ubiquitin (Santa Cruz Biotechnology, sc-8017) were observed 48 hours post-transfection using a fluorescent microscope (Evos Fl, Advanced Microscopy Group) and a confocal microscope (Olympus FV500).

RESULTS

We first showed that there was no repeat expansion in the *C9ORF72* gene, the most frequent genetic cause of ALS. We next analysed *SOD1*, the second most common mutated gene. Sequencing analysis revealed a novel heterozygous substitution c.365A>G in the exon 5 of the *SOD1* gene (Figure 1A). This transition led to an amino acid change from a glutamic acid to a glycine at position 121 in the SOD1 protein (p.E121G). No familial history of ALS was reported, and no relative were available for genetic studies. This variation was absent in the ALSoD database, in the 1000 genomes project database (<http://browser.1000genomes.org>), and in our cohort of 800 ALS patients of French origin.

Sequence alignments showed that glutamic acid 121 as well as its surrounding region is highly conserved in the SOD1 protein among species (Figure 1B). The p.E121G mutation was predicted by PolyPhen-2 to be “probably damaging” with a score of 0.997 (range, 0-1).

Using the modelling server Swiss-model we observed no significant predicted structural modification in the mutant SOD1^{E121G} (Figure 1C, data not showed). Interestingly this E121 amino acid is located close to one of the three histidine residues (H120) implicated in the interaction with copper. Moreover we observed that E121 is exposed on the external surface of the protein, and consequently could be implicated in an interaction with partners of SOD1. Altogether these bioinformatics analyses supported a functional role for this mutation.

We performed functional analyses on this SOD1^{E121G} mutant. NSC34 motor neuronal cell line transfected by a plasmid expressing SOD1^{E121G} showed significant reduced cell viability when exposed to an oxidative stress (H₂O₂ 1mM during 3 hours) (Figure 1D). We next analyzed the localization of SOD1^{E121G} in transfected cells. Similarly to well-known ALS-related mutants, the expression of the novel mutant SOD1^{E121G} in NSC34 induced cytoplasmic aggregates positive for SOD1 and ubiquitin (Gal et al., 2007) (Figure 1E,F). This observation was confirmed in motor neurons by transfection of primary culture from rat embryos (Figure 1G).

DISCUSSION

We described here an apparently sporadic ALS patient with a new heterozygous missense mutation p.E121G in SOD1 and characterized by a slowly progressive ALS phenotype. Until now this mutation had not been identified in ALS. Further studies will indicate whether this mutation is specific for this population or not.

Bioinformatics analyses strongly supported a functional pathogenic consequence for this mutation in a highly conserved region during evolution. The mutation consists in a substitution of a negatively charged and large residue (glutamic acid) by a neutral and small one (glycine). Our model analysis did not support a consequence on the 3D structure of the protein, nor on its dimerization. Indeed the E121 residue is located outside the dimerization domain (Figure 1 C). However this residue is close to one of the three histidine residues implicated in SOD1 interaction with Copper. The E121G mutation could affect this interaction. Another observation is the exposition of the side chain of the residue 121 at the surface of the protein, suggesting its possible participation in interactions with protein partners of SOD1 (chaperones for example). Unfortunately, we could not infer the pathogenicity of the mutation from segregation analysis.

Thus, we next expressed SOD1^{E121G} in NSC34 cells and primary cultured motor neurons. We observed that the expression of SOD1^{E121G} was associated with reduced cell viability under oxidative stress. This was showed by a decrease in Trypan blue exclusion and

an increased in cytotoxicity evaluated by measuring the activity of dehydrogenases in cells. We next observed that the expression of SOD1^{E121G} in motor neurons was associated with the presence of aggregates in the cytoplasm. Some aggregates were located in dendrites of motor neurons. Cytoplasmic inclusions or aggregates in degenerating motor neurons are the central pathological hallmark in ALS (Blokhuis et al., 2013). SOD1 was the first protein to be identified in aggregates in ALS patients with a mutation in *SOD1* gene (Rosen et al., 1993a). The predominant aggregates in ALS patients are ubiquitinated (Stieber et al., 2000). Our immunocytochemical analysis indicated ubiquitin positive aggregates containing SOD1 in cells expressing SOD1^{E121G}. Altogether these findings consist in strong arguments for a novel causal mutation in ALS.

In conclusion, the identification of a novel p.E121G mutation in SOD1 in a patient with slowly progressive form of ALS provides additional information on the diversity and the common points of SOD1 mutations in SALS (Andersen and Al-Chalabi, 2011a). Further studies on mutations such as p.E121 located in highly conserved domains exposed at the surface of SOD1 could give insight into the biochemical mechanisms of action of protein aggregation in ALS.

Declaration of interest:

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper

This work was funded by the Association ARSla, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université François Rabelais, Tours and the Région Centre. We also thank the platform PPF ASB of the Université François Rabelais for technical help.

REFERENCES

1. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 4 mars 1993;362(6415):59-62.
2. Abel O, Powell JF, Andersen PM, Al-Chalabi A. ALSoD: A user-friendly online bioinformatics tool for amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Hum Mutat*. sept 2012;33(9):1345-1351.

3. Cozzolino M, Pesaresi MG, Amori I, Crosio C, Ferri A, Nencini M, et al. Oligomerization of mutant SOD1 in mitochondria of motoneuronal cells drives mitochondrial damage and cell toxicity. *Antioxid Redox Signal*. juill 2009;11(7):1547-1558.
4. Rakhit R, Robertson J, Vande Velde C, Horne P, Ruth DM, Griffin J, et al. An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. *Nat Med*. juin 2007;13(6):754-759.
5. Ray SS, Nowak RJ, Brown RH Jr, Lansbury PT Jr. Small-molecule-mediated stabilization of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase mutants against unfolding and aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 mars 2005;102(10):3639-3644.
6. Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, et al. Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. juill 1992;194(3):209-221.
7. Raoul C, Estévez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyrière O, Henderson CE, et al. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron*. 12 sept 2002;35(6):1067-1083.
8. Gal J, Ström A-L, Kilty R, Zhang F, Zhu H. p62 accumulates and enhances aggregate formation in model systems of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*. 13 avr 2007;282(15):11068-11077.
9. Blokhuis AM, Groen EJM, Koppers M, van den Berg LH, Pasterkamp RJ. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)*. juin 2013;125(6):777-794.
10. Stieber A, Gonatas JO, Gonatas NK. Aggregation of ubiquitin and a mutant ALS-linked SOD1 protein correlate with disease progression and fragmentation of the Golgi apparatus. *J Neurol Sci*. 1 févr 2000;173(1):53-62.
11. Andersen PM, Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol*. nov 2011;7(11):603-615.

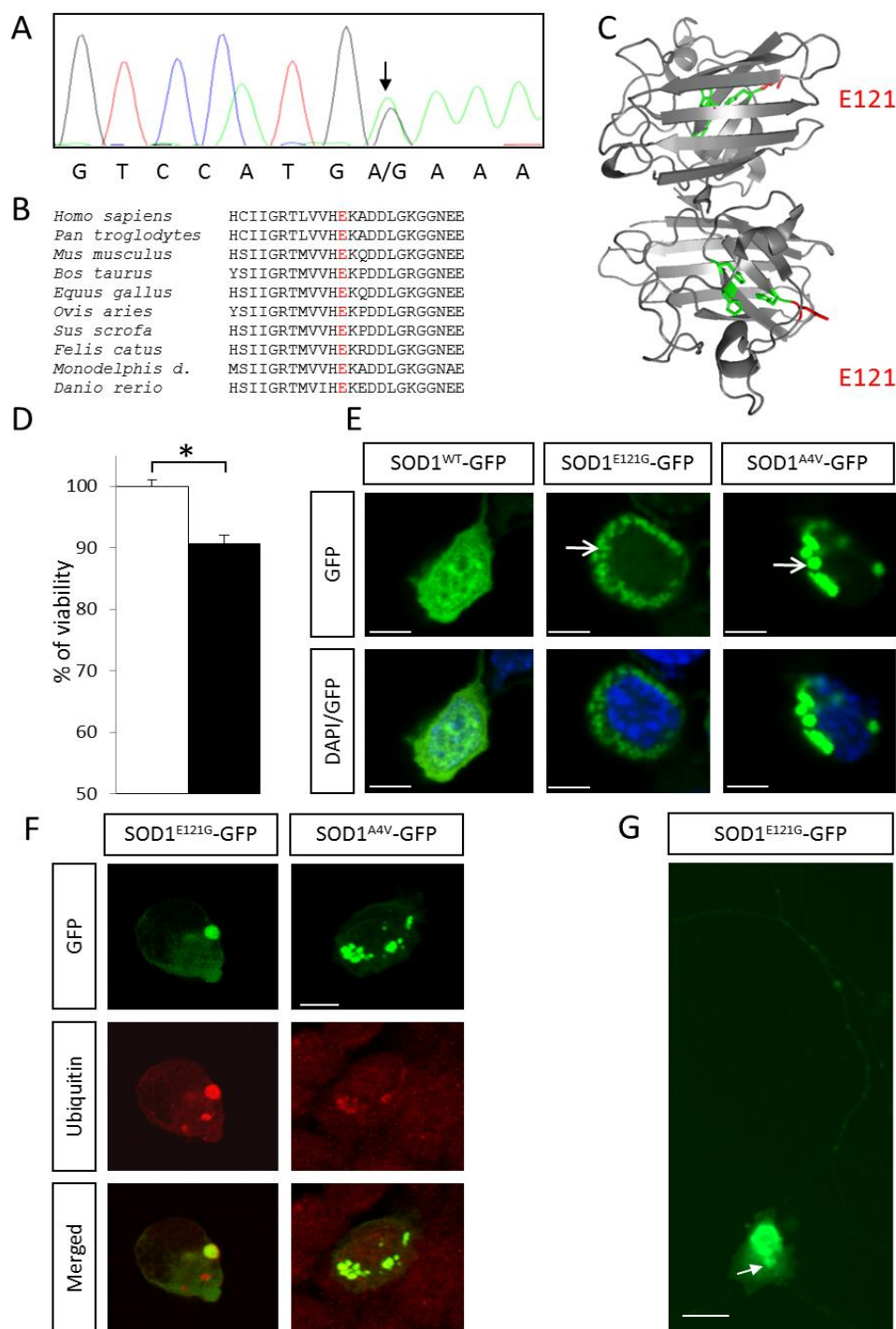


Figure: (A) Heterozygous missense mutation c.365A>G in SOD1 identified by Sanger sequencing (arrow). (B) Sequence alignment of SOD1 protein shows that glutamic acid E121 is highly conserved during species. (C) 3D structures of the homodimer SOD1^{WT} protein (PDB ID: 2C9V); the three histidine residues in interaction with the copper ion are in green; the residue E121 is in red. (D) Cell viability assessed by Trypan blue exclusion method. (E) Localization of SOD1^{WT}-GFP, SOD1^{mutant}-GFP proteins in NSC34 cells 48 hours post-transfection (Arrows indicate aggregates). Scale bars, 10 μm. (F) Co-localization of SOD1^{mutant}-GFP proteins with ubiquitin in aggregates. Scale bars, 10 μm. (G) Presence of SOD1^{E121G}-GFP positive aggregates in motor neuron 48 hours post-transfection (arrow: aggregates). Scale bar, 25 μm.

II. Etude de l'effet combiné du stress oxydant et de la mutation de SOD1 sur les voies Ub/SUMO

Transcriptomic analysis of a cell culture model of SOD1-related Amyotrophic Lateral Sclerosis identifies dysregulations in the ubiquitin (Ub)/Ub like pathways.

Dangoumau et al. soumis

Les causes, encore mal connues, de la dégénérescence des motoneurones dans la SLA impliquent des facteurs environnementaux comme le stress oxydant, et des facteurs génétiques comme la mutation du gène *SOD1* qui code la superoxyde dismutase 1. Le stress oxydatif est une conséquence d'un déséquilibre entre une production des ROS et de la capacité des motoneurones à réduire le niveau de ces ROS, et à réparer les dommages dans les cellules. Plusieurs études ont montré une relation directe entre le stress oxydant et les mutations de SOD1 dans la physiopathologie de la SLA.

Nous avons tout d'abord recherché les gènes dont l'expression varie quand des cultures de cellules motoneuronales sont soumises à un stress oxydant (1 mM d' H_2O_2) pendant une période (3 heures) non associée à une baisse de la viabilité cellulaire. Pour cela nous avons utilisé la technologie de microarrays Agilent (SurePrint G3 Mouse GE 60k Array). Nous avons ainsi identifié 360 sondes associées à des gènes différentiellement exprimés en présence d'un stress oxydant ($p < 0,05$). L'étude de cette liste de gènes a montré un enrichissement en gènes des voies de l'Ubiquitine et de l'Ubiquitin-like SUMO. Ces voies impliquent plus de 729 gènes selon nos études bioinformatiques. 26 de ces gènes montraient une différence d'expression significative dans les NSC-34 exposées à un stress oxydant. Nous avons étudié plus en détail 6 de ces 26 gènes, du fait selon la littérature de leur participation dans la réponse à divers stress ou dans des mécanismes impliqués dans des maladies neurodégénératives. Ces gènes codent les E2 Ube2e1 et Ube2d2, les E3 Trim9, Uhrf2 et Rbx1 et la protéase déSUMOylation des protéines Senp1. Nous avons également sélectionné 5 autres gènes d'intérêt ayant une p value comprise entre 0,05 et 0,06 considérant que certains gènes pertinents dans l'étude pouvaient avoir une expression légèrement plus précoce ou tardive par rapport aux 3h de stress. Ces gènes codent les E3 Ube3b, Birc3, Xaf1, Kdm2b et Siah2.

Nous avons analysé par RT-qPCR l'expression de ces 11 gènes dans des cultures de cellules NSC-34 combinant à la fois une exposition à un stress oxydant (1 mM d' H_2O_2 , 3h) et

l'expression d'une forme mutée du gène *SOD1*, la protéine SOD1^{A4V} identifiée chez des patients SLA. L'exposition au stress oxydant fut réalisé 48h après transfection des NSC-34 par le plasmide SOD1^{A4V}, à savoir à une période où les cellules présentaient des agrégats cytoplasmiques positifs pour SOD1. Cette étude a permis de mettre en évidence un effet combiné additif du stress oxydant et d'un mutant SOD1 sur l'expression de 6 des 11 gènes des voies Ub/SUMO sélectionnés suite à l'étude microarray (stress oxydant seul). L'expression des gènes *Senp1*, *Ube2d2*, *Rbx1*, *Uhrf2* et *Kdm2b* était augmentée, et à l'inverse l'expression de la protéase de Xap1 était diminuée. Ces gènes sont particulièrement intéressants dans le contexte d'une maladie neurodégénérative comme la SLA. Par exemple le gène *Rbx1* code une protéine membre du complexe SCF ubiquitine ligase qui contrôle la protéine Nrf2. Nrf2 participe directement à la réponse au stress oxydant en tant que senseur de stress.

Autre exemple, celui de l'augmentation d'expression d'*Uhrf2*. *Uhrf2* (aussi appelé *Nirf*) code l'E3 ligase Ubiquitin-like with PHD and Ring Finger domains 2 connue pour être exprimée dans le cerveau humain. Cette enzyme est une des rares E3 ligases présentant à la fois une activité Ubiquitine et SUMO ligase. Plusieurs protéines cibles d'*Uhrf2* sont connues, comme par exemple le facteur de transcription Znf131 (Zinc finger protein 131) fortement exprimé lui aussi dans le système nerveux central et ayant potentiellement un rôle dans la protection des motoneurones. Nous avons montré que cet effet combiné du stress oxydant et de SOD1 mutée provoquant une augmentation d'expression d'*Uhrf2* était observable pour les 3 mutants SOD1 testés (SOD1^{A4V}, SOD1^{V31A}, SOD1^{G93C}). Nous avons alors étudié les conséquences d'une baisse d'expression d'*Uhrf2* dans ce modèle *in vitro* par transfection des cellules par un siRNA anti-*Uhrf2*. Nous avons montré que la baisse d'expression d'*Uhrf2* entraîne une diminution d'expression du gène pro-apoptotique *Siva*. Ce gène *Siva* était connu pour être régulée positivement par *Uhrf2* dans la lignée d'ostéosarcome U2OS. Sachant que la sur-expression de SOD1 sous une forme mutée est nécessaire à l'augmentation d'expression d'*Uhrf2*, nous avons ensuite analysé un possible lien entre *Uhrf2* et la formation d'agrégats potentiellement toxiques pour les cellules motoneuronales. Nos analyses effectuées 24h après co-transfection (siRNA anti-*Uhrf2*, plasmide SOD1^{G93C}) indiquent une tendance à la réduction du nombre de cellules contenant des agrégats, quoi que non significative. Cette durée de 24h n'est peut-être pas suffisante pour obtenir un effet significatif sur la réduction du nombre d'agrégats. Ces résultats suggèrent qu'une réduction d'expression d'*Uhrf2* dans des cellules motoneuronales soumises à un stress oxydant et exprimant une forme mutée de SOD1

pourrait peut-être modifier la dynamique de formation des agrégats protéiques toxiques en diminuant leur formation ou favorisant leur dissociation.

Nous avons donc identifié plusieurs modifications d'expression de gènes des voies Ub/Ub-like dans notre modèle *in vitro* de la SLA impliquant un stress environnemental seul, ou combinant un stress environnemental et une mutation génique impliquée dans la SLA. A notre connaissance, il s'agit de la première étude globale d'expression génique dont l'objectif était d'analyser l'effet combiné d'un stress oxydant et de mutations du gène SOD1 identifiées dans des cas de SLA. Nos résultats indiquent que des dérégulations de l'expression d'enzymes particulières des voies Ub/Ub-like pourraient être directement impliquées dans la dégénérescence motoneuronale en cause dans la SLA.

Transcriptomic analysis of a cell culture model of SOD1-related Amyotrophic Lateral Sclerosis identifies dysregulations in the ubiquitin (Ub)/Ub like pathways.

Audrey Dangoumau^{1,#}, Sylviane Marouillat^{1,#}, Roxane Coelho¹, François Wurmser², Christophe Boyce¹, Christelle Makam Fotsing¹, Rose-Anne Thépault¹, Hélène Blasco^{1,3}, Philippe Corcia^{1,3}, Christian R. Andres^{1,3}, Patrick Vourc'h^{1,2,3,*}.

¹ UMR INSERM U930, Université François-Rabelais, Tours, France

² PPF Analyse des Systèmes Biologiques, Université François-Rabelais, Tours, France

³ CHRU de Tours, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Tours, France

⁴ Centre SLA, CHU Bretonneau, Tours, France

participate equally to this work

*Corresponding author P Vourc'h, INSERM U930, Equipe Neurogénétique et Neurométabolomique, Faculté de Médecine, 10 bd Tonnellé, 37032 Tours, France. Tel: 33 (0)2 34 37 89 10; fax: 33 (0)2 47 36 61 85. E-mail address: vourch@med.univ-tours.fr (P. Vourc'h)

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is characterized by a progressive and selective death of motor neurons in brain and spinal cord. Combined effects of environmental factors such as oxidative stress and genetics factors such mutations of SOD1 are implicated in this neurodegenerative disease. We performed a microarray study on motor neuronal cells NSC-34 exposed to oxidative stress (H_2O_2), and observed an enrichment of genes of the Ubiquitin (Ub)/Ub-like pathways in the differentially expressed genes. A hallmark of ALS is the presence of Ub/SUMO positive-aggregates in motor neurons. Eleven of these genes were further studied in NSC-34 exposed to oxidative stress and expressing a mutant SOD1^{A4V}. We observed a combined effect of these factors on the expression of Senp1, Ube2d2, Rbx1, Uhrf2, Kdme2b (all up-regulated), and Xaf1 (down-regulated). We next showed that siRNA-mediated reduction of the Ub/SUMO E3 Uhrf2 results in decreased expression of Siva, a target of p53. Our study indicates that dysregulations in the expression of particular enzymes of the Ub/Ub-like pathways could be implicated in motor neuron degeneration.

1. INTRODUCTION

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is one of the most common adult onset neurodegenerative diseases, caused by the selective death of motor neurons. The aetiologies for sporadic and most familial forms of ALS are unknown, but current knowledge supports the implication of several interacting environmental and genetic factors. 17 genes and loci have been associated with ALS, with mutations in SOD1 (Cu/Zn Superoxide dismutase 1) and C9orf72 (chromosome 9 open reading frame 72) genes consisting in the most frequent genetic causes of ALS (Andersen, 2001; Vucic et al., 2014). Studies of disease physiology suggest roles for oxidative stress, glutamate-mediated excitotoxicity and hypoxia in ALS; how these environmental factors interact with genetic factors in the complex pathophysiology of ALS awaits elucidation.

Oxidative stress is a consequence of an imbalance between a production of reactive oxygen species (ROS) and the ability of motor neurons to reduce the level of ROS, and to repair their damages in cells. Several observations implicated the oxidative stress as an important factor by which motor neuron death occurs in ALS (Barber and Shaw, 2010). Markers for lipid oxidation and DNA oxidation were observed in spinal cord from ALS patients (Fitzmaurice et al., 1996; Shibata et al., 2001). Moreover elevated level of DNA oxidation (such as 8-oxo-2'-deoxyguanosine) and marker of lipid peroxidation (4-hydroxynonenal) was measured in the cerebrospinal fluid (CSF) of ALS patients (Bogdanov et al., 2000; Simpson et al., 2004; Smith et al., 1998). Oxidative damage to DNA, lipid and proteins were also observed in transgenic mice and cell culture models of ALS based on mutant SOD1 (Andrus et al., 1998; Liu et al., 1998a).

Whether oxidative stress is a primary cause or a consequence of some other toxic insults in ALS is still a debate. Several studies indicated for SOD1-related ALS a direct relation between SOD1 mutants and oxidative stress in ALS physiopathology (Barber and Shaw, 2010; Deng et al., 1993). 20% of the familial cases of ALS have been linked to mutations in SOD1 gene (Andersen and Al-Chalabi, 2011; Rosen et al., 1993). SOD1 consists in a crucial enzyme for cellular antioxidant defence mechanisms. It catalyses the disproportionation of superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) to H_2O_2 and O_2 . In ALS its enzymatic activity appears to be preserved in most SOD1 mutants. Moreover SOD1-null mice did not develop motor neuron disease, whereas mice over-expressing mutated forms of SOD1 became

paralyzed (Gurney et al., 1996; Reaume et al., 1996). Thus, a toxic gain of function of mutants SOD1 is considered to be a cause of motor neuron degeneration (Sau et al., 2007). Today, the mechanisms by which these mutants SOD1 cause cell death are still unclear. Various mechanisms have been suggested, such as abnormal free-radical detoxification, abnormal protein aggregation, disrupted axonal transport and mitochondrial dysfunction (Bilsland et al., 2010; Guégan et al., 2001; Liu et al., 1998b; Watanabe et al., 2001).

Here we first used microarrays to study changes in gene expression in the motor neuronal cell line NSC-34 in response to oxidative stress. NSC-34, which consists in a neuroblastoma-spinal cord (NSC) hybrid, is considered the most stable motor neuron cell line model (Veyrat-Durebex et al., 2014). We next focused on genes of the ubiquitin (Ub)/Ub-like pathways because of their enrichment in our microarray results and of their implication in ALS pathogenesis, and studied their expression in cultures exposed to oxidative stress and expressing SOD1 mutants (Cheroni et al., 2009; Dangoumau et al., 2013). We report additive effects of oxidative stress and SOD1 mutations on the expression of several genes of these pathways, such as the Ub/SUMO E3 ligase Ubr1.

2. METHODS

2.1 Cell cultures

NSC-34 cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ incubator in DMEM containing 4.5 g/L glucose, 0.58 g/L L-glutamine and 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich®). For oxidative stress conditions, cultures were treated with various concentrations of H₂O₂ for 1, 3 or 5 hours.

2.2 Cell viability assay

For the trypan blue assay, 48h post-transfection the cells were centrifuged for 5 min at 2500g and resuspended in DMEM, before addition of Trypan blue (0.4% w/v) (Molecular Probes-Invitrogen, Carlsbad, CA). Living and dead cells were accurately counted by a Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Carlsbad, CA).

2.3 Microarray experiments

Total RNAs of NSC-34 cell line cultures were prepared using TRIzol® extraction method (Invitrogen) and further purified using the RNeasy Micro Kit (Qiagen). RNA quality

was assessed by ND-1000 spectrophotometry (NanoDrop Technologies). Samples from four biological replicates of NSC-34 cell line transfected with SOD1^{WT} plasmid were hybridized on SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarrays (Agilent).

The one-color microarray-based gene expression analysis protocol (version 5.7 of the One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis) was used to construct and to fluorescently label cRNA from total RNA extracts. Briefly, probes were prepared by converting an aliquot of 100 ng total RNA from each sample into labeled cRNA, using reagents from the one-colour spike-in kit (Agilent Technologies) and one-color Quick amp labeling kit (catalogue No.5190-0442, Agilent Technologies). Total RNA were reverse transcribed into first and second-strand cDNA, after which first-strand cRNA were constructed using the second-strand cDNA as a template in the presence of Cy3-CTP. Labeled cRNA were purified using the RNeasy mini spin column kit (Qiagen). Labeling efficiency was determined at 550 nm (Cy3) by ND-1000 spectrophotometry (NanoDrop Technologies).

800ng Cy3-labelled cRNA was hybridized on individual 60K array for 17 h at 65 °C. After hybridization, arrays were washed consecutively with Gene expression wash buffers 1 and 2 (Agilent). Slides were scanned immediately following washing in the Agilent Scanner (SureScan) using Scan Control 9.1.7.1 software. The scan resolution was 3µm. Scan data were extracted with Feature Extraction 10.7.3.1 software using the GE1_107_Sep09 protocol. Extracted signal intensities were analyzed using GeneSpring 12.0 software (Agilent) and the datasets were normalized using standard Agilent FE Import 1-color settings. Genes were tested for differential expression using a Student test, and p values were subjected to multiple tests correction (Benjamini-Hochberg False Discovery rate; 0.05). Genes with p value <0.05 were considered to be differentially expressed. Analysis of cellular pathways was done using The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (**DAVID**) v6.7 (Huang et al., 2009).

2.4 Expression vectors and transfections

Full-length human wild type SOD1 cDNA was obtained using reverse transcription polymerase chain reaction on total RNA from leukocytes of a Human individual, before insertion into pcDNA6.2/C-EmGFP-Gw/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Plasmids were amplified in TOP10 *Escherichia coli* bacteria, purified, and sequenced. Three ALS-related SOD1 mutants were generated by Site-Directed Mutagenesis, SOD1^{A4V}, SOD1^{V31A}

and SOD1^{G93C} (Broom et al., 2006; Dangoumau et al., 2014; Régat et al., 2006). 24h after plating NSC-34 cells on poly-D-lysine coated surface (25 µg/mL) transfection of plasmids (1.6µg) or siRNA (1.6µg, Silencer®Select anti-Uhrf2, s99417; Silencer Select negative control, Ambion®) were conducted with Lipofectamine 2000 according to manufacturer's instructions (Invitrogen).

2.5 Western blot analysis

NSC-34 cells were lysed in RIPA (Radio Immunoprecipitation Assay, ThermoFisher) buffer with protease inhibitors (Halt protease Inhibitor cocktail, Thermo scientific). 30 µg of proteins were separated by SDS-PAGE in a 4-15% polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. Membrane was treated with 5% of milk in Tris-buffer containing 0.1% tween-20. Before incubation with a polyclonal goat anti-GFP antibody (sc-5385, 1/200 Santa Cruz Biotechnology® Inc.), overnight at 4°C. Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat antibody (81-1620, 1/2500, Zymed) was used as secondary antibody before chemiluminescence analysis using ECL (Pierce-Thermo Fischer Scientific Inc., Rockford, IL) and quantification by QuantityOne software (BioRad). GAPDH expression was used for normalization using polyclonal goat anti-GAPDH antibody (sc-48166, 1/250, Santa Cruz Biotechnology Inc.) and secondary donkey anti-goat antibody (V8051, 1/2500, Promega).

2.6 Immunocytochemical analysis

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich®) in Phosphate Buffer Saline (PBS) for 45 min at room temperature (RT). After 1h at RT in 1% bovine serum albumin, 5% horse serum and 0.2% triton X-100 in PBS, cells were incubated over night at 4°C with mouse polyclonal antibody against α -3-tubulin (1:200, PRB-435P, Covance), or a polyclonal goat anti-UHRF2 antibody (1:200, sc-54252, Santa Cruz Biotechnology® Inc.). This was followed by an incubation of 1h at RT with FITC labeled antibody against mouse IgG (Jackson Immuno Research, 115-095-205) or Fluoprobes 594 Donkey antibody against goat IgG (Interchim FP-SD2110). Preparations were mounted with Prolong Gold Antifade (InvitrogenTM) and observed under AMG Evos F1 microscope or Olympus Fluoview 500 confocal laser scanning microscope.

2.7 RT-qPCR analysis

Total RNAs were extracted from NSC-34 cells 48 hours after transfection by plasmid expressing SOD1^{WT} or SOD1^{G93C}, using Trizol (Invitrogen). RNAs were treated with 1 µg RNase-free DNase I (Invitrogen). cDNA were synthesized using the SuperScriptTMII RT kit (Invitrogen), and qPCR was performed using 50 ng cDNA as template with SsoAdvancedTM SYBR® Green Supermix (BioRad) reagent. Samples from four biological replicates were analyzed in duplicate in a LightCycler480 (Roche). The $2^{-\Delta\Delta C_p}$ method was used for quantifications. Normalized ratios were obtained for each target gene using the LC480 software (qPCR efficiencies for each genes were used), and *beta-actin* and *Gapdh* as normalization genes.

2.8 Quantification of SOD1 aggregates

Forty-eight hours after transfection NSC-34 cells were observed under AMG Evos F1 microscope. One hundred cells were counted in fields selected at random from different quadrants of the culture well. The assays were carried out in four independent experiments.

2.9 Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm standard errors of the mean (SEM) of four independent experiments. Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test.

3. RESULTS

3.1 Vulnerability of NSC-34 cells to oxidative stress

Oxidative stress has been shown to contribute to motor neurons injury in ALS. We therefore developed an in vitro model of motor neurons injury using the mouse motor neuronal cell line NSC-34 exposed to H₂O₂. Our objective was to study the cellular response to this environmental stress, but not the mechanisms implicated in cell death. NSC-34 cells exposed for 3 hours to 0.1 or 1 mM H₂O₂ showed round shape (stressed) without modification in cell viability (Figure 1A, 1B). Five hours after addition of 0.1 or 1 mM H₂O₂, a significant decrease in cell viability were observed (reduction by 18.3% and 28%, respectively; $p < 0.05$), (Figure 1A). Thus, we chose the condition 1mM H₂O₂ for 3 hours for the microarray study.

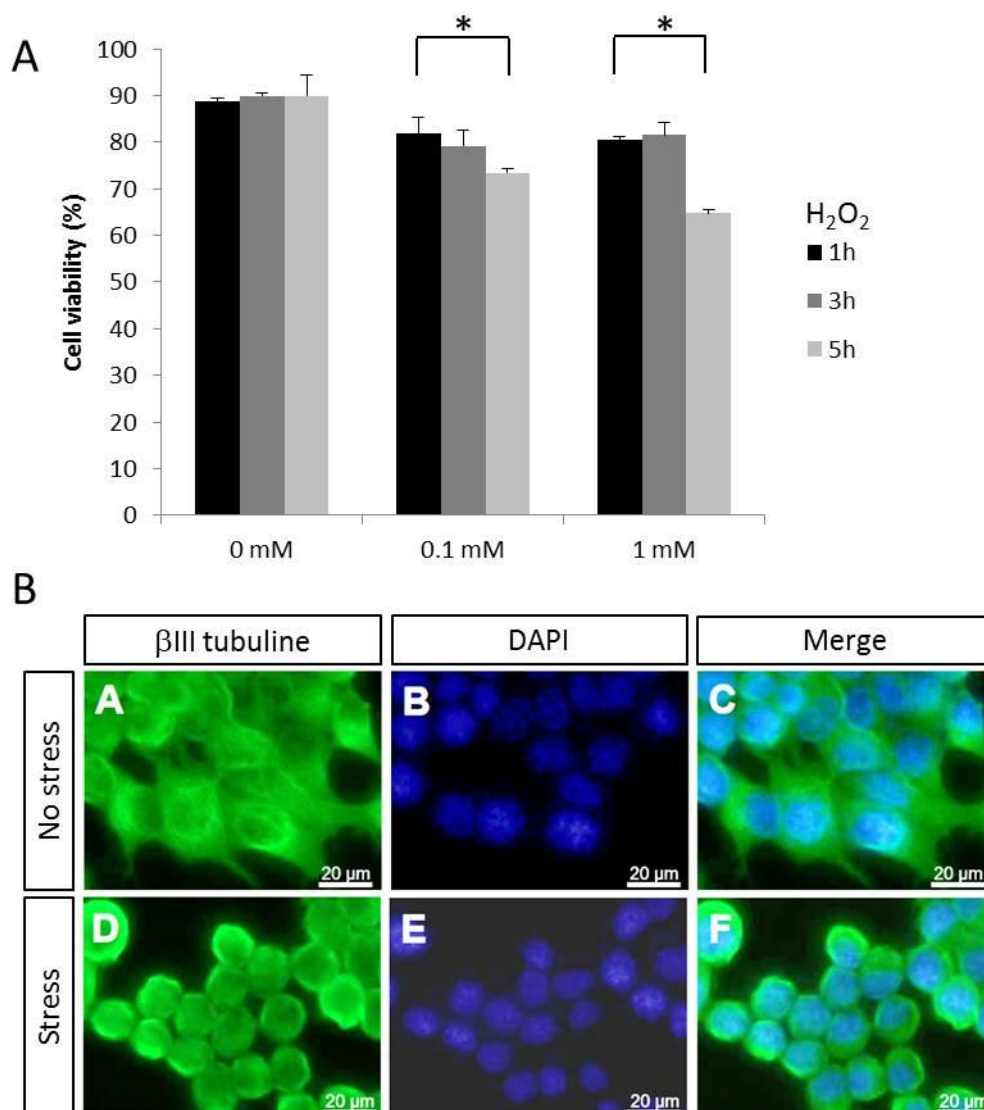


Figure 1: (A) Cell viability of NSC-34 cells in absence or presence of 0.1 or 1mM H₂O₂ for 1, 3 or 5 hours.*p<0.05 Non parametric Mann-Whitney test. (B) Immunocytochemical visualization of βIII-tubulin in NSC-34 cells. NSC-34 cells in absence (A-B-C) or presence (D-E-F) of 1mM H₂O₂ for 3 hours. Scale bar: 20 μm.

3.2 Microarray analyses showed robust gene expression changes

Microarray analyses were performed with RNA samples from NSC-34 cells cultures expressing normal human SOD1 (SOD1^{WT}-GFP) in absence or presence of 1mM H₂O₂ for 3 hours. We used the SurePrint G3 Mouse GE 60K array (Agilent), which contains around 60 000 probes covering 39,430 genes and 16,251 long-non coding RNAs (lcrNAs). Statistical analysis identified 360 probes associated with differentially expressed transcripts (p<0.05) in NSC-34 exposed to oxidative stress, compared to cells cultured in normal

condition. 191 probes were linked to up-regulated genes, and 169 probes to down-regulated genes. The 20 genes showing the highest fold changes (positive and negative) in presence of oxidative stress are listed in Table 1. We found an increased expression of several genes of interest in a context of neurodegenerative disease, such as: Thoc7 (fold change 4.77), a member of the THO complex, an evolutionarily conserved ribonucleoprotein complex that links transcription with nuclear export; Tmem14a (fold change 3.95), a recently identified mitochondria-associated membrane protein which inhibits apoptosis by blocking the mitochondrial permeability transition; Rbx1 (fold change 2.10), a member of the SCF ubiquitin ligase complex controlling the sensor of oxidative stress Nrf2. We also observed a decreased expression of several interesting genes, such as Akap13 (fold change -2.80), a sensor of ER stress.

Gene symbol	Gene name	p value	Fold change
Thoc7	THO complex 7 homolog	0.043	4.77
Tmem14a	Transmembrane protein 14A	0.043	3.95
Rbx1	Rong-box 1	0.043	2.1
Strbp	Spermatid perinuclear RNA binding protein	0.043	1.61
Dkk1	Dickkopf homolog 1	0.043	1.6
Mkl1	Megakaryoblastic leukemia 1	0.043	1.46
Gm8273	predicted gene 8273	0.03	1.39
Acot10	Acyl-CoA thioesterase 10	0.043	1.38
Rbm3	RNA binding motif protein 3	0.043	1.37
Gm14440	predicted gene 14440	0.026	1.34
Hibadh	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	0.026	-1.17
Slmo2	Slowmo homolog 2	0.043	-1.17
Eln	Elastin	0.043	-1.2
Zfp592	Zinc finger protein 592	0.043	-1.36
Rab21	member RAS oncogene family	0.03	-1.45
Prim1	DNA primase, p49 subunit	0.003	-1.69
Cyts	Cytochrome c, somatic	0.043	-1.75
Atf6	Activating transcription factor 6	0.03	-2.71
Pcna	Proliferating cell nuclear antigen	0.043	-2.72
Akap13	A kinases (PRKA) anchor protein 13	0.043	-2.8

Table 1: Genes found to be increased or decreased in NSC-34 expressing SOD1^{WT} in presence of 1mM H₂O₂ during 3 hours.

3.3 Gene expression variation in the Ubiquitin/Ubiquitin-like pathways

Our analysis of microarray data pointed out an enrichment of genes of the Ubiquitin (Ub)/Ub-like pathways. This was encouraging, given the presence of ubiquitinated aggregates as major pathological features in motor neurons in ALS patients, and data supporting a role for the ubiquitin and the SUMO (Small Ubiquitin Modifier) ubiquitin-like pathways in ALS (Bendotti et al., 2012; Dangoumau et al., 2013). To accurately identify all differentially expressed genes of these pathways in the microarray data, we first created a list of all genes known to be implicated in these pathways to date using the databases KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Ensembl, DUDEdb) and the literature (such as Michelle et al., 2009). We generated a list of 729 genes, with a majority of E1 activating enzymes, E2 conjugating enzymes, E3 ligases and peptidases. Using this list we reanalyzed the microarray data and identified 26 genes of the Ub/Ub-like pathways differentially expressed ($p < 0.05$) in NSC-34 exposed to stress vs. cultured in normal condition. These genes are presented in Table 2 according to their enzymatic function. We found an increased expression of 11 genes, such as E2 Ube2r2 and Ube2c, and E3 Fanc1, Uhrf2 and Rnf121 for example. We observed a decreased expression of 15 genes, such as E2 Ube2d1, E3 Trim9 and Rnf31, and SUMO1/sentrin specific peptidase 1 (SEN1), for example

Gene symbol	Gene name	p value	Fold change
<u>E2 conjugating enzymes</u>			
<i>Ube2r2</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2R2	0.0445	1.17
<i>Ube2d2</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D2	0.0267	1.3
<i>Ube2e1</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2E1	0.0486	1.37
<i>Ube2c</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	0.0492	1.39
<i>Ube2d1</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D1	0.0445	-1.87
<u>E3 ligases</u>			
E3 ligases with multipled subunits with RING domain			
subunits with RING domain			
<i>Rbx1</i>	Ring-box 1	0.0267	1.35
Subunits (adaptators)			
<i>Fbxo42</i>	F-box protein 42	0.0267	-1,26
<i>Fbxo46</i>	F-box protein 46	0.027	-1.54
<i>Ccnf</i>	Cyclin F	0.0267	-2.44
<i>Btb9</i>	BTB (POZ) domain containing 9	0.0267	-1.78
<i>Rhobtb2</i>	Rho-related BTB domain containing 2	0.0267	-1.48
<i>Zbtb32</i>	Zinc finger and BTB domain containing 32	0.027	1.41
<i>Klhl21</i>	Kelch-like 21 (Drosophila)	0.0486	-1.33
<i>Klhl29</i>	Kelch-like 29 (Drosophila)	0.0406	-1.61
<i>Spsb4</i>	SplA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 4	0.0445	-1.92
<i>Lrr1</i>	Leucine rich repeat protein 1	0.0445	1.16
<i>Cdc16</i>	CDC16 cell division cycle 16 homolog (S. cerevisiae)	0.0445	1.3
Other E3 ligases			
<i>Trim9</i>	Tripartite motif-containing 9	0.0486	-2.27
<i>Uhrf2</i>	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 2	0.0267	1.49
<i>Sh3rf1</i>	SH3 domain containing ring finger 1	0.0492	-1.95
<i>Rnf31</i>	Ring finger protein 31	0.0267	-1.17
<i>Fancl</i>	Fanconi anemia, complementation group L	0.0267	1.46
<i>Rnf121</i>	Ring finger protein 121	0.0445	1.35
<u>Others</u>			
<i>Senp1</i>	SUMO1/sentrin specific peptidase 1	0.0318	-1.34
<i>Usp44</i>	Ubiquitin specific peptidase 44	0.0267	-2.25
<i>Usp36</i>	Ubiquitin specific peptidase 36	0.0445	-1.7

Table 2: Genes pathways of family of ubiquitin differentially expressed (p-value <0.05) in a condition of oxidative stress (1mM H₂O₂, 3 hours) compared to a control condition in NSC-34 cells expressing SOD1^{WT}.

3.4 Combined effect oxidative stress and mutant SOD1^{A4V}

To increase our understanding of the molecular mechanisms of motor neuron injury in ALS, we next investigated changes in gene expression of the Ub/Ub-like pathways induced by a combined action of oxidative stress and SOD1 mutation. We first selected 6 out of the 26 genes of these pathways identified by the microarray analysis, based on knowledge in the literature: participation in stress responses and in other mechanisms implicated in neurodegenerative diseases, such as ER stress response, apoptosis or mitophagy for example. These genes were Ube2e1, Ube2d2, Trim9, Uhrf2, Rbx1 and Senp1. We also reanalyzed our microarray data searching for genes of the Ub/Ub-like pathways close to significance in a context of oxidative stress ($0.05 \leq p < 0.06$), and that may reach significance by combining environmental and genetic factors. We selected 5 genes in this list, based on knowledge in the literature: Ube3b, Birc3, Xaf1, Kdm2b and Siah2.

These 11 genes of the Ub/Ub-like pathways were analyzed by RT-qPCR in culture of NSC-34 exposed to 1mM H₂O₂ for 3 hours and expressing the protein SOD1^{WT}-GFP or the ALS-related mutant SOD1^{A4V}-GFP. At time of exposition to oxidative stress, NSC-34 expressing SOD1^{A4V} for 48 hours showed GFP positive aggregates in the cytoplasm (Figure 2B, 2C). We used four independent cultures to assess differential expression by RT-qPCR. A combined effect of the ALS-related environmental factor, oxidative stress, and an ALS-related genetic factor, SOD1 mutant, affected the expression of 6 out of the 11 genes selected in the Ub/Ub-like pathways (Figure 2A). NSC-34 expressing SOD1^{A4V} showed a significant increased expression of the E2 Ube2d2, the E3 Rbx1, Uhrf2, Kdm2b, and the peptidase Senp1. In contrast the expression of the X-linked IAP (XIAP)-associated factor 1 (Xaf1) was significantly reduced when NSC-34 expressed SOD1^{A4V} vs. SOD1^{WT}.

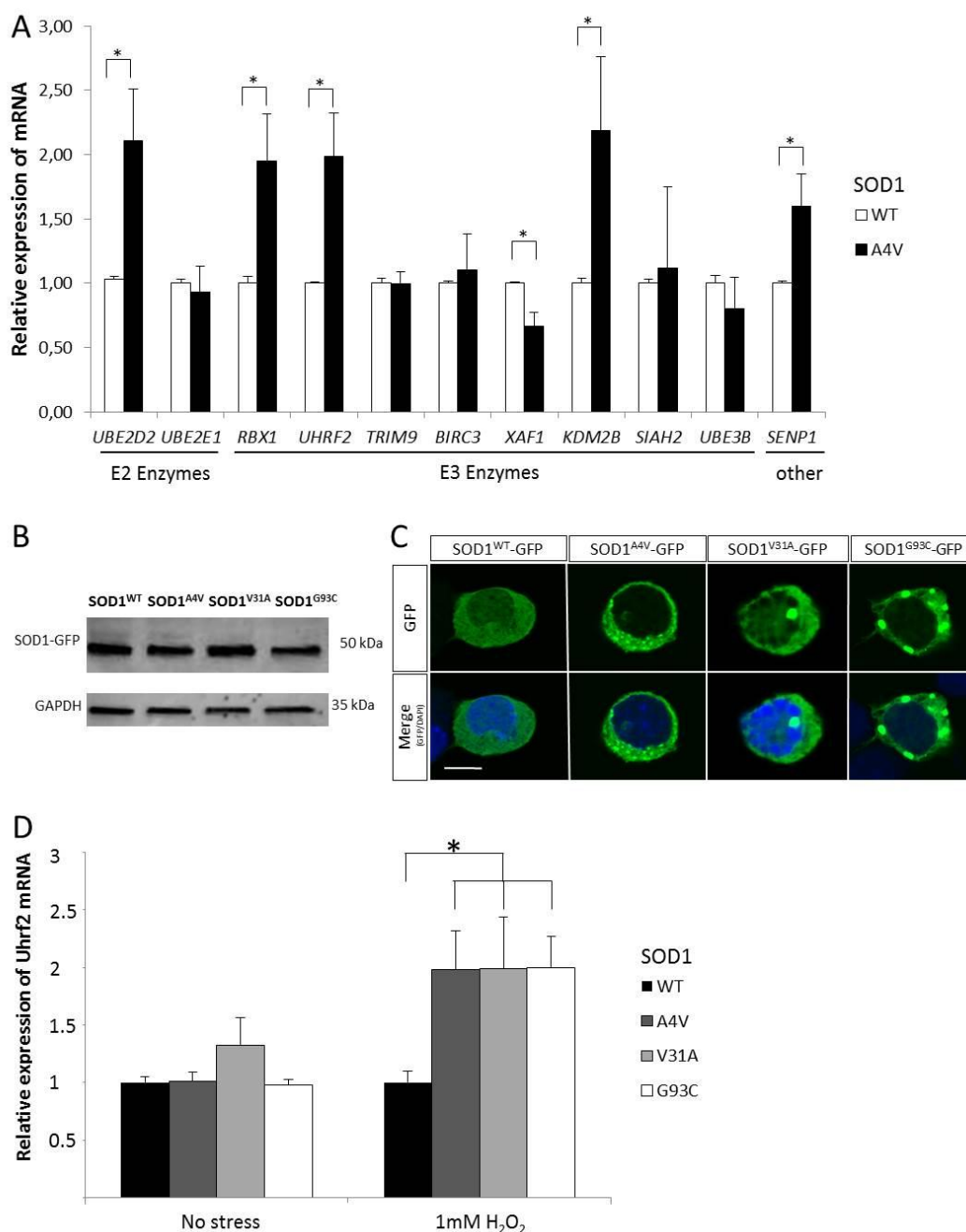
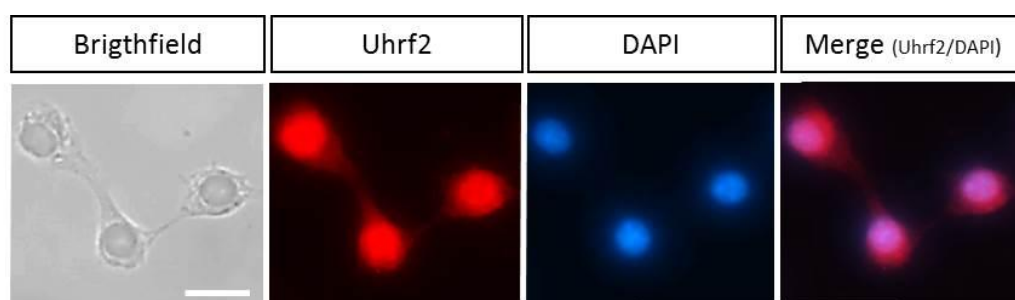


Figure 2: (A) qPCR relative mRNA expression of UBE2D2, UBE2E1, RBX1, UHRF2, TRIM9, BIRC3, XAF1, KDM2b, SIAH2, UBE3B and SENP1 in NSC-34 cells expressing SOD1^{WT} or SOD1^{A4V} in presence of 1mM of H₂O₂ during 3 hours. (B) Western blotting of SOD1-GFP proteins in NSC-34 cells expressing SOD1^{WT}-GFP, SOD1^{A4V}-GFP, SOD1^{V31A}-GFP and SOD1^{G93C}-GFP using antibodies against GFP or GAPDH. (C) Confocal microscopy analysis SOD1^{WT}-GFP or SOD1^{mutant}-GFP in NSC-34 showing aggregates (48 hours post-transfection). Scale bar: 30 μ m. (D) qPCR relative mRNA expression of UHRF2 in NSC-34 cells expressing SOD1^{WT}, SOD1^{A4V}, SOD1^{V31A} and SOD1^{G93C} in absence or presence of 1mM of H₂O₂ during 3 hours.

3.5. E3 Uhrf2 expression is affected by various SOD1 mutants

To begin to examine the function of these differentially expressed genes of the Ub/Ub-like pathway in motor neuron degeneration, we analyzed the consequence of an expression of various SOD1 mutants on one of them, the E3 ligase Ubiquitin-like with PHD and Ring Finger domains 2 (Uhrf2), also known as Np95/ICBP90-like RING finger (NIRF). We chose Uhrf2 because it is expressed in the central nervous system; it is one of the rare E3 enzymes showing both an ubiquitin and SUMO ligase activity (Mori et al., 2004; Oh and Chung, 2013); it is implicated in apoptosis; and it has three known substrates, Huntingtin and ZNF131 (Zinc finger protein 131) highly expressed in the central nervous system, and PCPN (PEST proteolytic signal containing nuclear protein).

We first analyzed the effect of various SOD1 mutations on Uhrf2 gene expression. The three mutants tested, SOD1^{A4V}, SOD1^{V31A} and SOD1^{G93C} expressed in NSC-34 induced the formation of aggregates (Figure 2B,C) and a similar downregulation of Uhrf2 gene expression compared to wild type SOD1 (Figure 2D). Immunocytochemical analysis showed that Uhrf2 protein was mainly nuclear in NSC-34 cells (Figure 3A), and did not co-localize with SOD1^{G93C}-GFP positive aggregates in presence or absence of oxidative stress (Figure 3B, supplementary figure 1A,B). To get insight into the role of Uhrf2, we examined the effect of siRNA-mediated silencing of Uhrf2 expression in NSC-34 cells expressing SOD1^{G93C}-GFP for 24 hours and exposed to oxidative stress for 3 hours (1mH₂O₂). As shown in Figure 3C, the siRNA reduced the expression of Uhrf2 mRNA by 33.3%. A previous study reported that the pro-apoptotic gene Siva is bound at its promoter by Uhrf2 in the U2OS osteosarcoma cell line (Lu and Hallstrom, 2013). SiRNA-mediated reduction of Uhrf2 expression in NSC-34 cells resulted in a significant 37.6% decrease of Siva gene expression (Figure 3D). These data suggest that the increase of Uhrf2 expression induced by the combined effect of mutant SOD1 and oxidative stress could result in modifications in apoptotic pathways. This was not associated with a modification in number of cells containing SOD1-GFP positive aggregates (Figure 3E).



B

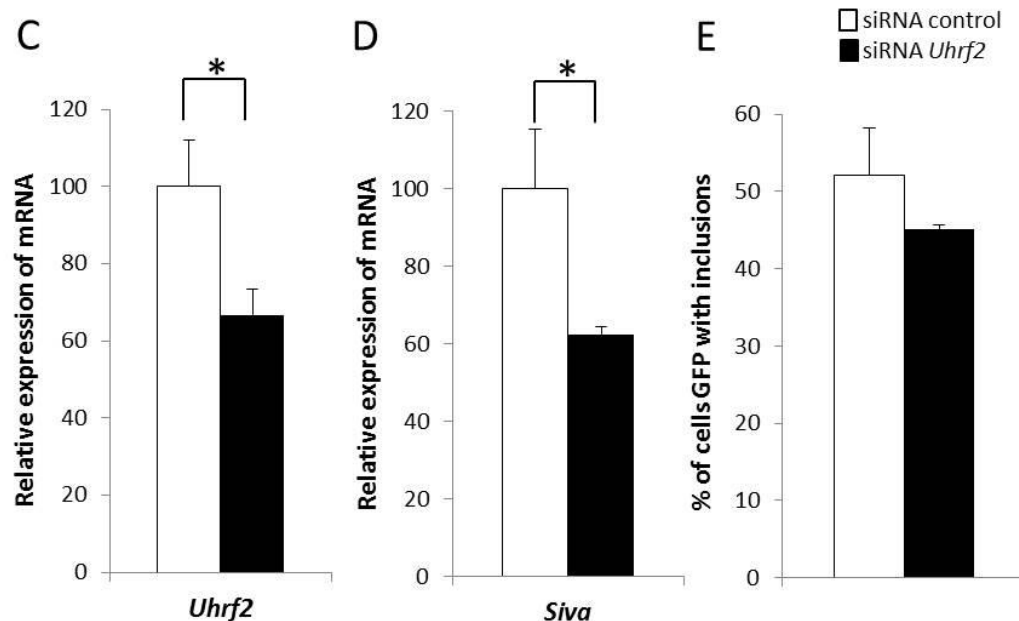
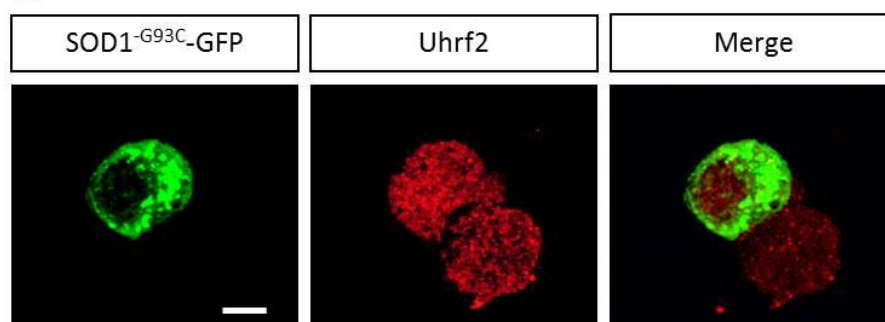


Figure 3: (A) Immunocytochemical visualization of UHRF2 in NSC34 cells. (B) Absence of co-localization of SOD1^{G93C}-GFP proteins with UHRF2 in aggregates confocal microscopy analysis. Scale bar: 10 μ m. (C) qPCR relative mRNA expression of UHRF2 in NSC-34 cells co-expressing SOD1^{G93C} and SiRNA *Uhrf2* or SiRNA control in presence of 1mM of H₂O₂ during 3 hours. (D) qPCR relative mRNA expression of SIVA in NSC-34 cells co-expressing SOD1^{G93C} and SiRNA *Uhrf2* or SiRNA control in presence of 1mM of H₂O₂ during 3 hours. (E) Percentage of GFP-positive cells with aggregates in NSC-34 cells co-expressing SOD1^{G93C} and SiRNA *Uhrf2* or SiRNA control.

4. DISCUSSION

The present study was designed to analyze gene expression variations that accompany the exposition of a motor neuronal cell culture to oxidative stress and mutants SOD1. We examined by microarray and RT-qPCR the effects of oxidative stress and mutants SOD1 on NSC-34 cells, the most stable motor neuron cell line model. NSC-34 exhibits many motor neuron characteristics without addition of inducing agents (Cashman et al., 1992; Durham et al., 1993). It consists in a model of interest to investigate the mechanisms of motor neuron degeneration in ALS associated with SOD1 mutations because NSC-34 can be easily transfected and are not contaminated by astrocytes or other glial cells responsible for dilution effects in microarray studies. Although glial cells, and particularly astrocytes, are implicated in ALS pathogenesis, it has been shown that mutant SOD1 does not increased the toxicity of oxidative stress in glial cells (Williams et al., 2001).

Using this *in vitro* model, we first investigated by microarray changes in global gene expression in NSC-34 exposed to oxidative stress. Interestingly we observed in our list of differentially expressed genes (360 probes) an enrichment of genes of the Ubiquitin (Ub)/Ub-like pathways. Trim9 was one of the genes of these pathways showing an important decrease in expression when motor neuronal cells were exposed to oxidative stress. Interestingly this brain-specific E3 ubiquitin ligase Trim 9 is repressed in affected brain areas of Lewy body disease (Tanji et al., 2010). Interestingly, we observed that the expression of Ube2d2 (also known as UbcH5d), the E2 conjugating enzyme collaborating with the E3 Trim9, was also affected when NSC-34 were exposed to oxidative stress. The only function known to date for Trim9 is a ligase activity promoting SNARE-mediated vesicle fusion and axon branching (Winkle et al., 2014).

On the contrary, Rbx1 gene was one of the genes showing the highest increase in expression with oxidative stress. It encodes the Ring-box protein, a member of the SCF ubiquitin ligase complex controlling the degradation of the transcription factor Nuclear factor like 2 (Nrf2) in cells in basal conditions. In response to oxidative stress, Nrf2 translocates to the nucleus, controls the expression of a list of genes that encode detoxifying enzymes, anti-apoptotic proteins, and proteasomal proteins, and then is exported outside the nucleus for degradation (Kaspar et al., 2009). It is interesting to note that a previous study, which analyzed the gene expression profile of NSC-34 cells expressing SOD1^{G93A}, reported modification of expression of a group of genes with an antioxidant response element in their

promoter which would be activated by Nrf2 (Kirby et al., 2005). We also observed in NSC-34 cells exposed to oxidative stress an increase of expression of Ub2r2 and Fancl, 2 genes of the Ub pathway implicated in the Wnt/ β -catenin pathway. Accumulating evidence indicated that dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling is associated with neurodegenerative disorders. A recent study showed that NSC-34 expressing mutated SOD1 show modifications of transcriptional activity associated with the Wnt/ β -catenin pathway (Pinto et al., 2013).

We next focused on 11 genes out of the 729 genes of the Ub/SUMO pathways. To get insight into a combined effect of oxidative stress and mutant SOD1, we expressed SOD1^{A4V} in NSC-34 cells and then exposed these cells to 1mM H₂O₂ for 3 hours. We observed a combined effect for 6 genes (one E2 enzyme, four E3 enzymes and one peptidase SENP, such as the ubiquitin-E2 Ube2d2 and the SUMO-peptidase Senp1, which regulate the transcription factor p53, and consequently can be linked to p53-mediated apoptosis (Peuget et al., 2014; Saville et al., 2004). Several studies indicated that apoptosis plays a role in motor neuron degeneration (Cookson et al., 2002; Sathasivam et al., 2001). In contrast to previous studies on spinal cord or primary cortical neurons from transgenic mice SOD1^{G93A}, we did not observed in our in vitro model NSC-34 an increase of expression of Ube2i, the unique E2 enzyme of the SUMO pathway (Boutahar et al., 2011; de Oliveira et al., 2013). This increase of expression of Ube2i could result from changes in astrocytes present in these two models, and not in motor neurons. Glial cells are absent in cultures of NSC-34 motor neuronal cells (de Oliveira et al., 2013).

Another interesting change in gene expression observed in our model combining oxidative stress and SOD1^{A4V} was the increase in Uhrf2 expression. Uhrf2, also called Nirf (Np95/ICBP90-like RING finger), encodes the Ubiquitin-like with PHD and Ring Finger domains 2 expressed in human brain (Mori et al., 2002). A recent study showed that UHRF2 is required for the pro-apoptotic activity of E2F1 as well as for the transcription of several genes encoding regulators of apoptosis (Lu and Hallstrom, 2013). UHRF2 is an ubiquitin-E3 ligase for several target proteins. It ubiquitinates the protein PCNP (PEST-containing nuclear protein) of unknown function (Mori et al., 2004), and the protein huntingtin encoded by HTT involved in the neurodegenerative Huntington's disease (Iwata et al., 2009). Interestingly, a recent study showed that UHRF2 is also a SUMO-E3 ligase implicated in the SUMOylation of the transcription factor ZNF131 (Zinc Finger protein 131) highly expressed in the central nervous system (Oh and Chung, 2013; Trappe et al., 2002). ZNF131 is involved in the estrogen receptor pathway, whose activation could have neuroprotective effect on motor

neurons (Das et al., 2011). We showed that siRNA mediated against UHRF2 expression reduced the expression of Siva, an apoptosis-selective p53 target gene implicated in cell death (Jacobs et al., 2007).

In summary, gene expression profiling in our *in vitro* model of ALS has identified several modifications in the Ub/Ub-like pathways. To our knowledge, it is the first global gene expression study that has attempted to analyze changes of motor neuronal cells NSC-34 combining an environmental oxidative stress and ALS-related mutations of SOD1 gene. We showed for particular genes of the Ub/SUMO pathways additive effects of the oxidative stress and SOD1 mutations. Our data support the idea that dysregulations in the Ub/SUMO pathways could affect several protective mechanisms and trigger cell death mechanisms responsible for motor neuron degeneration in ALS.

DISCLOSURE STATEMENTS

The authors declare no actual or potential conflicts of interest.

Patients and family members provided informed written consent in accordance with protocols approved by the academics institutions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported the Association ARSLA. We also would like to thank the Department of Genomics and Department of Microscopy of the PPF ASB, Université François-Rabelais, Tours.

REFERENCES

- Andersen, P.M. (2001). Genetics of sporadic ALS. Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord. 2 *Suppl 1*, S37–41.
- Andersen, P.M., and Al-Chalabi, A. (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? Nat Rev Neurol 7, 603–615.
- Andrus, P.K., Fleck, T.J., Gurney, M.E., and Hall, E.D. (1998). Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurochem. 71, 2041–2048.

Barber, S.C., and Shaw, P.J. (2010). Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 629–641.

Bendotti, C., Marino, M., Cheroni, C., Fontana, E., Crippa, V., Poletti, A., and De Biasi, S. (2012). Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: implication for protein aggregation and immune response. *Prog. Neurobiol.* 97, 101–126.

Bilsland, L.G., Sahai, E., Kelly, G., Golding, M., Greensmith, L., and Schiavo, G. (2010). Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 20523–20528.

Bogdanov, M., Brown, R.H., Matson, W., Smart, R., Hayden, D., O'Donnell, H., Flint Beal, M., and Cudkowicz, M. (2000). Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 652–658.

Boutahar, N., Wierinckx, A., Camdessanche, J.P., Antoine, J.-C., Reynaud, E., Lassabliere, F., Lachuer, J., and Borg, J. (2011). Differential effect of oxidative or excitotoxic stress on the transcriptional profile of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 cultured neurons. *J. Neurosci. Res.* 89, 1439–1450.

Broom, W.J., Russ, C., Sapp, P.C., McKenna-Yasek, D., Hosler, B.A., Andersen, P.M., and Brown, R.H. (2006). Variants in candidate ALS modifier genes linked to Cu/Zn superoxide dismutase do not explain divergent survival phenotypes. *Neurosci. Lett.* 392, 52–57.

Cashman, N.R., Durham, H.D., Blusztajn, J.K., Oda, K., Tabira, T., Shaw, I.T., Dahrouge, S., and Antel, J.P. (1992). Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev. Dyn.* 194, 209–221.

Cheroni, C., Marino, M., Tortarolo, M., Veglianesi, P., De Biasi, S., Fontana, E., Zuccarello, L.V., Maynard, C.J., Dantuma, N.P., and Bendotti, C. (2009). Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 18, 82–96.

Cookson, M.R., Menzies, F.M., Manning, P., Eggett, C.J., Figlewicz, D.A., McNeil, C.J., and Shaw, P.J. (2002). Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) mutations associated with familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) affect cellular free radical release in the presence of oxidative stress. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 3, 75–85.

Dangoumau, A., Veyrat-Durebex, C., Blasco, H., Praline, J., Corcia, P., Andres, C.R., and Vourc'h, P. (2013). Protein SUMOylation, an emerging pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Int. J. Neurosci.* 123, 366–374.

Dangoumau, A., Verschueren, A., Hammouche, E., Papon, M.-A., Blasco, H., Cherpi-Antar, C., Pouget, J., Corcia, P., Andres, C.R., and Vourc'h, P. (2014). Novel SOD1 mutation p.V31A identified with a slowly progressive form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* 35, 266.e1–4.

Das, A., Smith, J.A., Gibson, C., Varma, A.K., Ray, S.K., and Banik, N.L. (2011). Estrogen receptor agonists and estrogen attenuate TNF- α -induced apoptosis in VSC4.1 motoneurons. *J. Endocrinol.* 208, 171–182.

- Deng, H.X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., and Roos, R.P. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261, 1047–1051.
- Durham, H.D., Dahrouge, S., and Cashman, N.R. (1993). Evaluation of the spinal cord neuron X neuroblastoma hybrid cell line NSC-34 as a model for neurotoxicity testing. *Neurotoxicology* 14, 387–395.
- Fitzmaurice, P.S., Shaw, I.C., Kleiner, H.E., Miller, R.T., Monks, T.J., Lau, S.S., Mitchell, J.D., and Lynch, P.G. (1996). Evidence for DNA damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 19, 797–798.
- Guégan, C., Vila, M., Rosoklija, G., Hays, A.P., and Przedborski, S. (2001). Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 21, 6569–6576.
- Gurney, M.E., Cutting, F.B., Zhai, P., Andrus, P.K., and Hall, E.D. (1996). Pathogenic mechanisms in familial amyotrophic lateral sclerosis due to mutation of Cu, Zn superoxide dismutase. *Pathol. Biol.* 44, 51–56.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44–57.
- Iwata, A., Nagashima, Y., Matsumoto, L., Suzuki, T., Yamanaka, T., Date, H., Deoka, K., Nukina, N., and Tsuji, S. (2009). Intracellular degradation of polyglutamine aggregates by the ubiquitin-proteasome system. *J. Biol. Chem.* 284, 9796–9803.
- Jacobs, S.B.R., Basak, S., Murray, J.I., Pathak, N., and Attardi, L.D. (2007). Siva is an apoptosis-selective p53 target gene important for neuronal cell death. *Cell Death Differ.* 14, 1374–1385.
- Kaspar, J.W., Niture, S.K., and Jaiswal, A.K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1304–1309.
- Kirby, J., Halligan, E., Baptista, M.J., Allen, S., Heath, P.R., Holden, H., Barber, S.C., Loynes, C.A., Wood-Allum, C.A., Lunec, J., et al. (2005). Mutant SOD1 alters the motor neuronal transcriptome: implications for familial ALS. *Brain* 128, 1686–1706.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., and Shuai, K. (1998a). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10626–10631.
- Liu, R., Althaus, J.S., Ellerbrock, B.R., Becker, D.A., and Gurney, M.E. (1998b). Enhanced oxygen radical production in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 44, 763–770.
- Lu, H., and Hallstrom, T.C. (2013). The nuclear protein UHRF2 is a direct target of the transcription factor E2F1 in the induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 288, 23833–23843.
- Michelle, C., Vourc'h, P., Mignon, L., and Andres, C.R. (2009). What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *J. Mol. Evol.* 68, 616–628.

- Mori, T., Li, Y., Hata, H., Ono, K., and Kochi, H. (2002). NIRF, a novel RING finger protein, is involved in cell-cycle regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 530–536.
- Mori, T., Li, Y., Hata, H., and Kochi, H. (2004). NIRF is a ubiquitin ligase that is capable of ubiquitinating PCNP, a PEST-containing nuclear protein. *FEBS Lett.* 557, 209–214.
- Oh, Y., and Chung, K.C. (2013). UHRF2, a ubiquitin E3 ligase, acts as a small ubiquitin-like modifier E3 ligase for zinc finger protein 131. *J. Biol. Chem.* 288, 9102–9111.
- De Oliveira, G.P., Alves, C.J., and Chadi, G. (2013). Early gene expression changes in spinal cord from SOD1(G93A) Amyotrophic Lateral Sclerosis animal model. *Front Cell Neurosci* 7, 216.
- Peuget, S., Bonacci, T., Soubeyran, P., Iovanna, J., and Dusetti, N.J. (2014). Oxidative stress-induced p53 activity is enhanced by a redox-sensitive TP53INP1 SUMOylation. *Cell Death Differ.* 21, 1107–1118.
- Pinto, C., Cárdenas, P., Osses, N., and Henríquez, J.P. (2013). Characterization of Wnt/ β -catenin and BMP/Smad signaling pathways in an in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci* 7, 239.
- Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., et al. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 13, 43–47.
- Régál, L., Vanopdenbosch, L., Tilkin, P., Van den Bosch, L., Thijs, V., Sciot, R., and Robberecht, W. (2006). The G93C mutation in superoxide dismutase 1: clinicopathologic phenotype and prognosis. *Arch. Neurol.* 63, 262–267.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., and Deng, H.X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
- Sathasivam, S., Ince, P.G., and Shaw, P.J. (2001). Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 27, 257–274.
- Sau, D., De Biasi, S., Vitellaro-Zuccarello, L., Riso, P., Guarnieri, S., Porrini, M., Simeoni, S., Crippa, V., Onesto, E., Palazzolo, I., et al. (2007). Mutation of SOD1 in ALS: a gain of a loss of function. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1604–1618.
- Saville, M.K., Sparks, A., Xirodimas, D.P., Wardrop, J., Stevenson, L.F., Bourdon, J.-C., Woods, Y.L., and Lane, D.P. (2004). Regulation of p53 by the ubiquitin-conjugating enzymes UbcH5B/C in vivo. *J. Biol. Chem.* 279, 42169–42181.
- Shibata, N., Nagai, R., Uchida, K., Horiuchi, S., Yamada, S., Hirano, A., Kawaguchi, M., Yamamoto, T., Sasaki, S., and Kobayashi, M. (2001). Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res.* 917, 97–104.

Simpson, E.P., Henry, Y.K., Henkel, J.S., Smith, R.G., and Appel, S.H. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* 62, 1758–1765.

Smith, R.G., Henry, Y.K., Mattson, M.P., and Appel, S.H. (1998). Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 44, 696–699.

Tanji, K., Kamitani, T., Mori, F., Kakita, A., Takahashi, H., and Wakabayashi, K. (2010). TRIM9, a novel brain-specific E3 ubiquitin ligase, is repressed in the brain of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurobiol. Dis.* 38, 210–218.

Trappe, R., Buddenberg, P., Uedelhoven, J., Gläser, B., Buck, A., Engel, W., and Burfeind, P. (2002). The murine BTB/POZ zinc finger gene *Znf131*: predominant expression in the developing central nervous system, in adult brain, testis, and thymus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 319–327.

Veyrat-Durebex, C., Corcia, P., Dangoumau, A., Laumonnier, F., Piver, E., Gordon, P.H., Andres, C.R., Vourc'h, P., and Blasco, H. (2014). Advances in cellular models to explore the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurobiol.* 49, 966–983.

Vucic, S., Rothstein, J.D., and Kiernan, M.C. (2014). Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends Neurosci.* 37, 433–442.

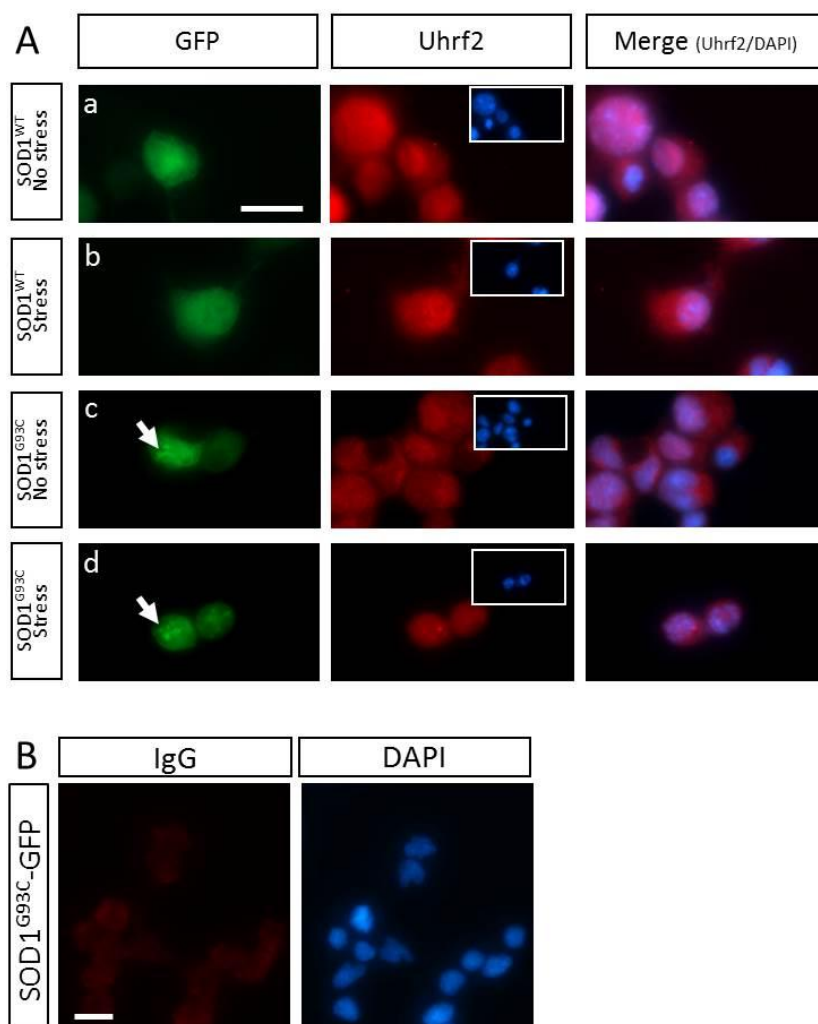
Watanabe, M., Dykes-Hoberg, M., Culotta, V.C., Price, D.L., Wong, P.C., and Rothstein, J.D. (2001). Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol. Dis.* 8, 933–941.

Williams, R.E., Cookson, M.R., Fray, A.E., Manning, P.M., Menzies, F.M., Figlewicz, D.A., and Shaw, P.J. (2001). Cultured glial cells are resistant to the effects of motor neurone disease-associated SOD1 mutations. *Neurosci. Lett.* 302, 146–150.

Winkle, C.C., McClain, L.M., Valtschanoff, J.G., Park, C.S., Maglione, C., and Gupton, S.L. (2014). A novel Netrin-1-sensitive mechanism promotes local SNARE-mediated exocytosis during axon branching. *J. Cell Biol.* 205, 217–232.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Ube2d2</i>	GTCACAATAATGGGGCCAAA	CAACCTTAGGGGGTTTGAAG
<i>Ube2e1</i>	GGTGGAGTATTCTTCCTTGACA	CAAGCAAATAACTCCTTGGCTA
<i>Rbx1</i>	GGCGATGGATGTGGATACC	TCCTGCAGATGGCACAGTTA
<i>Uhrf2</i>	TCCCTGGTATTCTGTTGGA	TCCAGCCAGGACAAGAGAAT
<i>Trim9</i>	GGAGCATGAACACAAGCTGA	CACTGGGGTCGTTCTCCTTA
<i>Birc3</i>	AAGGCCAAGAATTTGTCAGC	TGCGTCTGCATTCTCATCTT
<i>Xaf1</i>	AAACCCGTTGTGATCTTTGC	ATGCAAGGGTTGAAGGAATG
<i>kdm2b</i>	AGAAGCCCCAAGAGCTGAGT	TGAGACTGGATCTCCACCAA
<i>Siah2</i>	TCAGGAACCTGGCTATGGAG	TGCTCTGGTTTCTCTGTATGG
<i>Ube3b</i>	CCGGAACATGGTTATCAAGG	AGCTGTTCGTAGCCGTCCT
<i>Senp1</i>	AAAAGCCACCAGCTGACTGA	GGACTTCATCCTGGTTACCG
<i>Actin</i>	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	TGATCCACATCTGCTGGAAG
<i>Gapdh</i>	CTGCACCACCAACTGCTTAG	GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT

Supplementary table 1: Primers used for qPCR



Supplementary figure 1: (A) Localization of UHRF2 protein in NSC-34 cells expressing SOD1^{WT} (a-b) or SOD1^{G93C} (c-d) in absence (a-c) or presence (b-d) of 1mM of H₂O₂ during 3 hours. Scale bar: 50 μ m (B) Control goat IgG of UHRF2 antibody. Scale bar: 50 μ m

III. Rôle de la SUMOylation dans la SLA associée à des mutations du gène *SOD1*

Reduction in SOD1 mutant aggregation in motor neuronal cells by preventing its posttranslational SUMOylation on lysine 75

A. Dangoumau et al., soumis

20% des cas de SLA familiale sont dûs à des mutations du gène *SOD1* codant la protéine superoxide dismutase 1. Ces mutations sont associées à la formation d'agrégats positifs pour SOD1 qui seraient toxiques pour la cellule. Le mécanisme de formation des agrégats reste mal compris. Les modifications post-traductionnelles des protéines comme l'ubiquitinylation et la SUMOylation pourraient être impliqués dans ce processus. Plusieurs études ont montré que les agrégats étaient positifs pour l'ubiquitine et nous avons montré qu'ils l'étaient également pour SUMO1 (Dangoumau et al., 2013)

Deux études récentes in vitro ont montré que la sur-expression de SUMO-1 ou -3 dans les cellules induisait une SUMOylation de la protéine SOD1 sauvage ou mutante, ceci favorisant la formation d'agrégats positifs pour SOD1 (Fei et al., 2006; Niikura et al., 2014).

Ces deux études ont été réalisées dans des cellules non-neuronales, les lignées CHO et NIH3T3. Sachant que SOD1 est exprimé de manière ubiquiste et que les mutants SOD1 affectent plus spécifiquement les motoneurones, il nous est apparu nécessaire de réaliser nos études dans un contexte motoneuronal. Nous avons choisi de travailler avec les cellules de la lignée motoneuronale NSC-34, hybride neuroblastome-motoneurones de la moelle épinière de souris.

Par ailleurs, les deux études précédentes ont surexprimées SUMO-1 ou-3, or nos résultats préliminaires indiquaient que la concentration en SUMO-1 libre était au contraire réduite dans les cellules NSC-34 exprimant SOD1 mutée (Dangoumau et al, communication affichée, EMBO meeting, Italie, 2013). Nous avons donc choisi de travailler sur des cellules NSC-34 ne sur-exprimant pas de manière artificielle les protéines SUMO-1 ou-3.

Nous avons tout d'abord confirmé que lorsque nous sur-exprimons différents mutants de SOD1 ($SOD1^{A4V}$, $SOD1^{V31A}$ et $SOD1^{G93C}$) dans les NSC-34, une diminution de la concentration cellulaire en protéine SUMO1-libre apparaît après 48 heures. Pour comprendre

cette diminution, nous avons étudié l'expression de plusieurs gènes de la voie de la SUMOylation dans des NSC-34 sur-exprimant SOD1 sauvage ou SOD1 sous une forme mutante décrite chez des patients SLA (SOD1^{G93C}). Nous n'avons pas observé de variation d'expression de SUMO1, de l'unique E2 de la voie de la SUMOylation UBE2I, et des SENPs. Nous avons ensuite observé par microscopie confocale que les agrégats positifs pour mutée SOD1 (SOD1 liée à la protéine reporter Green Fluorescent protein, GFP) étaient également positifs pour SUMO1. La réduction de SUMO-1 libre dans les cellules pourrait donc être la conséquence de sa séquestration dans les agrégats sous une forme libre ou liée à des protéines comme SOD1 par exemple.

Les observations en microscopie confocale montraient des agrégats cytoplasmiques pour les mutants SOD1^{A4V} et SOD1^{G93C}, et également nucléaires pour SOD1^{V31A}. En collaboration avec le Département des microscopies de la plateforme PPF ASB de l'Université François rabelais, nous avons voulu étudier plus en détails les agrégats cellulaires. Grâce à la technique CLEM (correlative light emission microscopy), qui permet de superposer des images de microscopie confocale (fluorescence) et des images de microscopie électronique à transmission (MET), nous avons observé que ces agrégats positifs pour SOD1^{mutée}-GFP n'avaient pas d'organisation particulière, n'étaient pas entourés de membrane, et n'étaient pas périnucléaires comme il avait été suggéré dans des travaux précédents.

Nous avons ensuite cherché à savoir si la SUMOylation de SOD1 pouvait avoir un rôle dans la formation de ces agrégats dans les cellules motoneuronales NSC-34. Pour cela nous avons substitué la lysine 75 (K75), lysine du site de SUMOylation de SOD1, par une arginine. Nous avons tout d'abord vérifié que ce changement de résidu n'était pas pathogène pour les NSC-34 à l'inverse de nombreuses autres substitutions caractérisées comme des mutations de SOD1 en cause dans la SLA. Les cellules exprimant SOD1^{K75R} ne présentaient pas d'agrégats et ne voyaient pas leur viabilité affectée. Après cette vérification, nous avons construit des doubles mutants portant la substitution K75R et des mutations identifiées dans des cas de SLA : SOD1^{A4V-K75R}, SOD1^{V31A-K75R} et SOD1^{G93C-K75R}. Lorsque nous avons fait exprimer ces doubles mutants sans site de SUMOylation par les NSC-34, nous avons observé une réduction très importante du nombre de cellules contenant des agrégats positifs pour SOD1, comparé à des cellules exprimant des mutants avec site de SUMOylation conservé.

Ce travail supporte donc une participation de la voie de la SUMOylation, et en particulier de SUMO-1, dans la formation d'agrégats cytosoliques présents dans les

motoneurones dans la SLA causée par la mutation du gène SOD1. Il suggère également que des changements dans des voies de modifications post-traductionnelles, comme la voie de SUMO-1, pourraient peut-être permettre de réduire la formation d'agrégats considérés comme toxiques pour les motoneurones dans la SLA, et donc d'améliorer leur survie. Des études complémentaires seront donc nécessaires pour mieux identifier le rôle de la SUMOylation dans la formation de ces agrégats et pour en déduire de possibles avancées thérapeutiques.

Inhibition of mutant SOD1 aggregation in motor neuronal cells by prevention of its post-translational SUMOylation on lysine 75

Audrey Dangoumau¹, Sylviane Marouillat¹, Julien Gaillard², Rustein Uzbekov², Charlotte Veyrat-Durebex¹, Christophe Arnoult³, Philippe Corcia^{1,5}, Christian R. Andres^{1,4}, Patrick Vourc'h^{1,2,4*}.

¹ UMR INSERM U930, Université François-Rabelais, Tours, France

² PPF Analyse des Systèmes Biologiques, Université François-Rabelais, Tours, France

³ CNRS UMR 7292, Université François-Rabelais, Tours, France

⁴ CHRU de Tours, Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire, Tours, France

⁵ Centre SLA, CHRU Bretonneau, Tours, France

*Corresponding author P. Vourc'h, INSERM U930, Equipe Neurogénétique et Neurométabolomique, Faculté de Médecine, 10 bd Tonnellé, 37032 Tours, France. Tel: 33 (0)2 34 37 89 10; fax: 33 (0)2 47 36 61 85.

E-mail address: vourch@med.univ-tours.fr (P. Vourc'h)

Abstract

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by a selective death of motor neurons. Mutations in the gene *SOD1* encoding the superoxide dismutase 1 are present in 15% of familial ALS cases and in 2% of sporadic cases. These mutations are associated with the formation of SOD1 positive aggregates. The mechanisms of aggregation remain unknown, but post-translational modifications of SOD1 may be involved. Here, we report that motor neuronal cells NSC-34 expressing SOD1 mutants contained aggregates positive and for Small Ubiquitin Modifier-1 (SUMO-1), and in parallel a reduced level of free-SUMO-1. CLEM analysis, combining Confocal Light and Electron Microscopy, showed non-organized cytosolic aggregates for all mutations tested (SOD1^{A4V}, SOD1^{V31A}, and SOD1^{G93C}). We next show that preventing the SUMOylation of mutants SOD1 by substitution of lysine 75 in a SUMOylation site of SOD1 significantly reduces the number of motor neuronal cells with aggregates. These results support the need for further research the SUMOylation pathways, which may be a potential therapeutic target in ALS.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS, Superoxyde dismutase 1, SUMO, motor neurons

1. Introduction

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease characterized by the death of motor neurons in the spinal cord and brain. It results in progressive paralysis of skeletal muscles and death within 2-5 years after the onset of symptoms. 15% of Familial ALS (FALS) cases are caused by inherited dominant mutations in *SOD1* gene encoding the superoxide dismutase 1 (Andersen and Al-Chalabi, 2011; Deng et al., 1993; Rosen et al., 1993) and 2% in sporadic cases. SOD1 is a ubiquitously expressed homodimeric antioxidant enzyme that catalyzes the disproportionation of superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) to H_2O_2 and O_2 . The fact that SOD1-null mice did not develop motor neuron disease, but that mice over-expressing mutated forms of SOD1 became paralyzed supports a gain of toxic function for mutant SOD1 (Gurney et al., 1996; Reaume et al., 1996). How disease-causing mutations disrupt SOD1 function(s) remains to be determined.

Cytoplasmic aggregates containing mutants SOD1 are a pathological hallmark of FALS (Bruijn et al., 1998). Mutants SOD1 expressed in transgenic mice and in culture cells are associated with the formation of such protein aggregates (Son et al., 2003; Watanabe et al., 2001). *In vitro* studies showed that SOD1 mutants share a reduced conformational stability that supports the formation of insoluble aggregates in cells (Zhang and Zhu, 2006). Based on these observations, it was proposed to include ALS in the group of protein conformational disorders, similarly to Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases (Taylor et al., 2002). This concept proposes that particular mutant proteins can fold into unstable conformation, resulting in their aggregation in cells, leading to stress and possible cell death. Posttranslational modifications of proteins can modulate their conformation, and particular mutations in the protein affecting the level of these modifications can affect their stabilization.

SUMO modification is the covalent attachment of SUMO proteins to specific lysine residues within a target protein. This posttranslational modification can affect the subcellular localization of a protein, its interaction with other proteins, or its stability for example (Gareau and Lima, 2010). The SUMOylation pathway involves several enzymes: a single E1 activating enzyme (SAE1/SAE2), a single E2 conjugating enzyme (UBE2I) and several E3 ligases. SENPs proteases cleave SUMO moieties from target proteins.

Several observations support a role for the SUMOylation pathways in ALS pathogenesis (For review; Dangoumau et al., 2013). *In vitro* studies indicated that the over-expression of SUMO-1 or SUMO-3 in cells result in SUMO modifications of wild type or mutants human SOD1, increasing SOD1-positive aggregates (Fei et al., 2006; Niikura et al., 2014). These studies on aggregates formation were performed in the Human embryonic kidney cell line HEK293 and in the Chinese Hamster Ovary cell line CHO. The fact that SOD1 is ubiquitously expressed and that mutants SOD1 affect mainly motor neuron survival indicates that studies have to be performed in motor neuronal contexts. In these precedent studies SUMO was over-expressed in non-neuronal cells to study protein aggregation (Fei et al., 2006; Niikura et al., 2014). Our preliminary observations indicated a reduction in free SUMO-1 level, not an increase, in NSC-34 cells expressing the mutant SOD1^{G93C} (Dangoumau et al, personal communication, EMBO meeting 2013).

Here, we first showed that mutants SOD1^{G93C} and SOD1^{V31A} are indeed associated with a reduction of free SUMO-1 in the motor neuronal cell line NSC-34. This reduction was not

associated with variation in the expression of the SUMO-1 gene or in genes encoding enzymes of the SUMOylation pathway. This decrease was parallel to an increase in cells containing aggregates positive for mutant SOD1 and SUMO-1, that we analyzed by Correlative light and electron microscopy (CLEM). We next reported for the first time that blocking SUMO modification of mutants SOD1 at lysine 75 by amino acid substitution was associated with a decrease in aggregates formation in motor neuronal cells. Taken together, these results provide a rational to pursue studies on the role the SUMOylation pathway in mechanisms leading to motor neuronal degeneration in ALS, and to study this pathway as a potential novel therapeutical target in ALS.

2. Materials en methods

2.1 Expression vectors

Full-length human SOD1 cDNA was obtained using reverse transcription polymerase chain reaction on total RNA from leukocytes of a control individual. Mutants of SOD1 were generated by Site-Directed Mutagenesis before insertion in pcDNA6.2/C-EmGFP-Gw/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Plasmids were amplified in TOP10 Escherichia coli bacteria, purified, and sequenced.

2.2 Cell cultures and transfection

NSC-34 cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ incubator in DMEM containing 4.5 g/L glucose, 0.58 g/L L-glutamine and 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco®). 24h after plating NSC-34 cells on poly-D-lysine coated surface (25 µg/mL) transfections were conducted with Lipofectamine 2000 according to manufacturer's instructions (Invitrogen™).

2.3 Western blot analysis

NSC-34 cells were lysed in RIPA buffer with protease inhibitors (Halt protease Inhibitor cocktail, Thermo scientific). 30 µg of proteins were separated by SDS-PAGE in a 4-15% polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. Membrane was treated with 5% of milk in Tris buffer saline containing 0.1% tween-20, before incubation with a polyclonal goat anti-GFP antibody (sc-5385, 1/200 Santa Cruz Biotechnology® Inc.), a polyclonal rabbit anti-SUMO1 antibody (sc-9060, 1/200 Santa Cruz

Biotechnology® Inc.), or a polyclonal goat anti-UBE2I (sc-5231, 1/200 Santa Cruz Biotechnology® Inc.) overnight at 4°C. Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat antibody (81-1620, 1/2500, Zymed) or donkey anti-rabbit antibody (W401B, 1/2500, Promega, Charbonnières, France) were used as secondary antibody before chemiluminescence analysis using ECL (Pierce-Thermo Fischer Scientific Inc., Rockford, IL) and quantification by QuantityOne software (BioRad). GAPDH expression was used for normalization using polyclonal goat anti-GAPDH antibody (sc-48166, 1/250, Santa Cruz Biotechnology Inc.) and secondary donkey anti-goat antibody (V8051, 1/2500, Promega).

2.4 Cell viability assay

For the trypan blue assay, 48h post-transfection the cells were centrifuged for 5 min at 2500g and resuspended in DMEM, before addition of one volume of Trypan blue (0.4% w/v) (Molecular Probes-Invitrogen, Carlsbad, CA). Living and dead cells were accurately counted by a Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Carlsbad, CA).

For the Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Laboratories), transfections were conducted 24h after plating NSC-34 cells in 96 well plate treated by poly-D-lysine (5000 cells by well). Forty-eight hours post-transfection, 10 µL of the CCK-8 solution was added to each well of the plates. After incubation of the plate for 3 hours at 37°C, the absorbance at 450 nm was measured in a microplate reader.

2.5 Immunocytochemical analysis

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich®) in Phosphate Buffer Saline (PBS) for 45 min at room temperature (RT). After 1h at RT in 1% bovine serum albumin, 5% horse serum and 0.2% triton X-100 in PBS, cells were incubated over night at 4°C with rabbit polyclonal antibody against SUMO1 (FL-101, sc-9060, Santa-Cruz Biotechnology). This was followed by an incubation of 1h at RT with Fluoprobes 594 Donkey antibody against rabbit IgG (Interchim FP-SD5110). Preparations were mounted with Prolong Gold Antifade (Invitrogen™) and observed under AMG Evos F1 microscope or Olympus Fluoview 500 confocal laser scanning microscope.

2.6 Correlative light and electron microscopy

Transfections were conducted 24h after plating NSC-34 cells on poly-D-lysine treated Circle Gridded Coverslip (EMS Diasum, Hatfield, PA). Forty-eight hours after transfection,

intracellular fluorescent clusters were searched and acquired at 37°C, 5% CO₂ with an Olympus FV500 confocal laser scanning microscope (Tokyo, Japan). Whole coverslips were fixed by incubation for 24 h in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich®), 1% glutaraldehyde (EMS Diasum) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2). Samples were washed in PBS and post-fixed by incubation with 2% osmium tetroxide (EMS Diasum) for 1 h. Samples were then fully dehydrated in a graded series of ethanol and pure propylene oxide solutions (Sigma-Aldrich®). Impregnation occurred by placing the coverslips in a mixture of propylene oxide/Epon Resin (Sigma-Aldrich®) and then overnight in pure resin. Samples were embedded at the surface of a plastic cap using Epon resin which was allowed to polymerize for 48 hours at 60°C. Glass coverslips were removed by heat shock using liquid nitrogen. Cells of interest were retrieved under Nikon Eclipse 80i (Tokyo, Japan) equipped with a DS-Vi1 camera. Blocks were cut with a hard knife and ultra-thin sections (90 nm) were obtained with a Leica EM UC7 ultramicrotome (Wetzlar, Germany). Sections were deposited on formvar/carbon-coated nickel grids and stained with 5% uranyl acetate, 5% lead citrate. Observations were done with a JEOL 1011 transmission electron microscope.

2.7 RT-qPCR analysis

Total RNAs were extracted from NSC-34 cells at 6, 24 and 48 hours after transfection with plasmid constructs (SOD1^{WT} or SOD1^{G93C}). RNA samples were treated with RNase-free DNase I (Invitrogen). cDNA were synthesized using the SuperScriptTMII RT kit (Invitrogen). qPCR was performed using 50 ng cDNA as template with SsoAdvancedTM SYBR® Green Supermix (BioRad) reagent. Samples from four biological replicates were analyzed in duplicate in a LightCycler480 (Roche). Quantifications were carried out by the $2^{-\Delta\Delta C_p}$ method. Normalized ratios were obtained for each target gene using the LC480 software, qPCR efficiencies were considered, *beta-actin* and *Gapdh* were used for normalization.

2.8 Quantification of fluorescence intensity by flow cytometry and of cells with SOD1 aggregates

The fluorescence intensities in SOD1-GFP expressing cells were quantified using flow cytometry. Forty-eight hours after transfection, cells were collected, washed three times with ice-cold PBS and subjected to flow cytometry (Beckman Coulter). The excitation wavelength of the laser was 488 nm and the fluorescence signal was recorded after passing a 525 nm

bandpass filter. Only cells with green fluorescence were counted and the average fluorescence intensity per cells was measured.

Forty-eight hours after transfection of NSC-34, cells were observed under AMG Evos F1 microscope. One hundred cells were counted in fields selected at random from different quadrants of the culture well. The assay was carried out in four experiments.

2.9 Modeling of SOD1 Mutant

The 3D structure of SOD1 protein (PDB 2C9V) has been determined by x-ray crystallography (Lamb et al.; 1999). We used the coordinates of this structure to model the mutant forms of SOD1 protein with SWISSMODEL, (<http://swissmodel.expasy.org>.) a structure homology-modeling server (Arnold et al., 2006). Ribbon representations of the wild-type and mutant forms of SOD1 proteins were obtained using the molecular graphics tool PyMOL v1.3 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC).

2.10 Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm standard errors of the mean (SEM) of four independent experiments. Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests.

3. Results

3.1. Mutants SOD1 decrease free SUMO-1 concentration in NSC-34 cells.

We used the motor neuronal cell line NSC-34 to study the role of SUMOylation in ALS. We analyzed two ALS-related mutants of SOD1, the protein mutated in position G93 extensively studied and the recently described SOD1^{V31A} mutant (Dangoumau et al., 2014). The over-expression of both SOD1^{G93C} and SOD1^{V31A} in NSC-34 reduced by about 50% the concentration in free SUMO-1 in cells compared to SOD1^{WT} (Figure 1A). No variation was observed for the unique E2 enzyme of the SUMO pathway, UBE2I (Figure 1B). To assess the toxicity of mutants SOD1, NSC-34 expressing SOD1^{WT} or SOD1^{G93C} were subjected to cell viability analysis (Figure 1C). No significant difference was observed 48 hours post-transfection, in accordance with previous results (Zhang and Zhu, 2006).

Many studies supported a role for oxidative stress in motor neuron degeneration. The association of SOD1^{G93C} expression and exposure to oxidative stress for 3 hours (1 mM H₂O₂) induced a significant decrease (30%) in cell viability compared to SOD1^{WT} (Figure 1C). Similarly to the normal condition of cell culture, we observed a decrease in free SUMO-1 level without variation in UBE2I in motor neuronal cells expressing SOD1^{G93C} exposed to oxidative stress (data no shown). These data indicated the necessity for studying the SUMOylation pathway in a motor neuronal context without artificial over-expression of SUMO-1 and/or UBE2I.

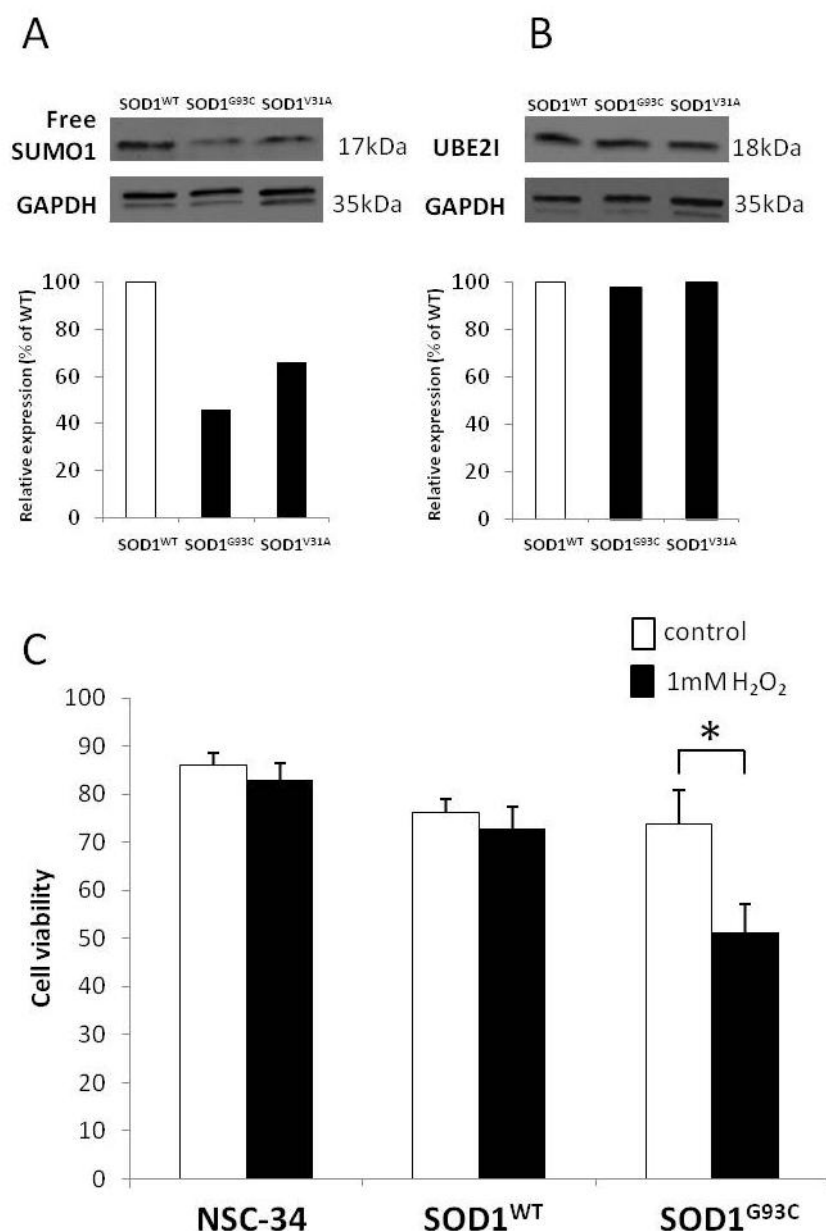


Figure 1: Western blotting of NSC-34 cells transfected with SOD1^{WT}, SOD1^{G93C} and SOD1^{V31A} using antibodies against (A)SUMO1 and GAPDH (B) UBE2I and GAPDH (C) Cell viability of NSC-34 cells expressing SOD1^{WT} or SOD1^{G93C} in absence or presence of 1mM H₂O₂ for 3 hours.

3.2. Reduction in free SUMO-1 concentration is parallel to the formation of mutant SOD1-GFP positive aggregates containing SUMO-1

Reduction in free SUMO-1 concentration in NSC-34 cells expressing mutants SOD1 could have different origins. Previous studies indicated that the expression of ALS-related mutants SOD1 leads to modifications in gene expression in cells (Boutahar et al., 2011; Kirby et al., 2005). We first showed that SOD1^{G93C} did not modify the expression of *SUMO-1* gene (Figure 2A). Moreover it did not affect the gene expression of *UBE2I* and of several *SENPs* implicated in the recycling of SUMO linked to target proteins (Figure 2A; Supplementary figure 1). These results suggested that the observed decrease in free SUMO-1 in NSC-34 expressing mutants SOD1 did not result from modifications in its synthesis, utilization or recycling.

We next assessed whether or not SUMO-1 could be sequestered in formations such as aggregates. Indeed studies showed that several ALS-related mutants of SOD1 form aggregates (Bruijn et al., 1998; Sau et al., 2007). NSC-34 cells expressing SOD1^{WT} or SOD1^{G93C} were analyzed by flow cytometry and confocal microscopy. These SOD1 proteins were linked by their C-terminal amino acid to the reporter green fluorescent protein GFP. Previous analysis showed that SOD1^{WT} protein linked to GFP in C-term is fold properly in living cells (Zhang and Zhu, 2006). The intensity of GFP depends of its correct folding, and the misfolding of a protein linked to GFP affects the fluorescence of the GFP (Pédélec et al., 2002; Waldo et al., 1999). Using flow cytometry we analyzed the fluorescence intensity in cells expressing SOD1^{WT}-GFP or SOD1^{G93C}-GFP proteins for 48 hours. A reduction by 48% in fluorescence intensity was observed in cells expressing SOD1^{G93C} in comparison to SOD1^{WT}, certainly due to altered misfolding of SOD1 when mutated (Figure 2B).

NSC-34 transfected cells were also analyzed by confocal microscopy. In control cultures SOD1^{WT}-GFP and SUMO-1 were expressed in the cytosol and the nucleus (supplementary figure 2). No aggregate was visible. In cultures expressing mutant SOD1, NSC-34 cells contained SOD1^{G93C}-GFP positive aggregates in the cytosol. Immunocytochemistry analysis indicated a co-localization of SOD1^{G93C}-GFP and SUMO-1 in these aggregates (Figure 2C). Thus, the decrease in free SUMO-1 level in NSC-34 expressing mutant SOD1 might be a consequence of SUMO-1 sequestration in aggregates.

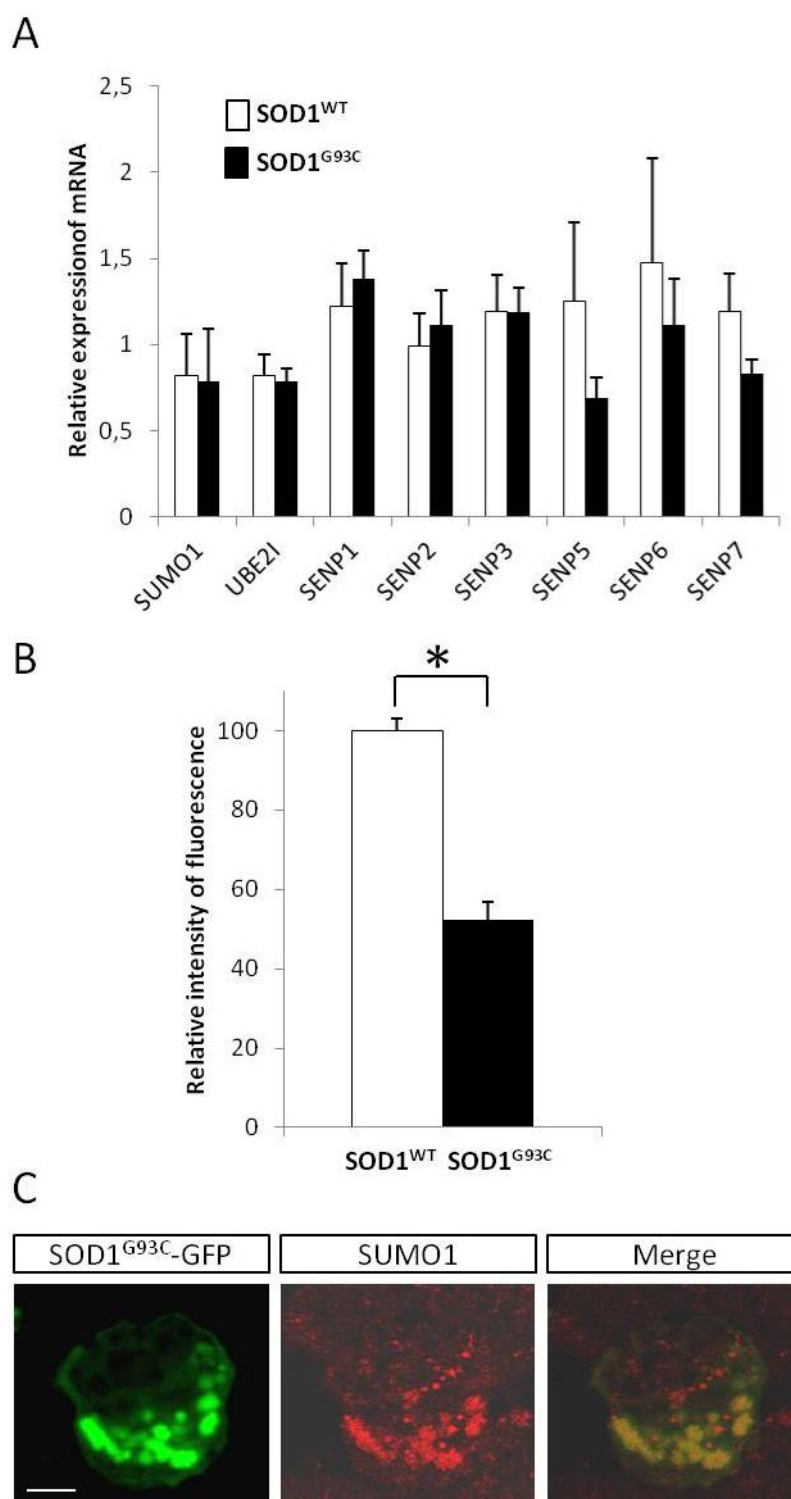


Figure 2: (A) mRNA expression of *SUMO1*, *UBE2I* and *SENPs* genes in NSC-34 cells expressing SOD1^{WT} or SOD1^{G93C} (RT-qPCR). (B) Flow cytometry quantification of GFP intensities in NSC-34 cells expressing SOD1^{WT}-GFP or SOD1^{G93C}-GFP. * $p < 0.05$, non-parametric Mann-Whitney test. (C) Co-localization of SOD1^{G93C}-GFP with SUMO1 in aggregates observed by confocal microscopy. Scale bar: 10 μ m.

3.3. SOD1^{mutant}-GFP containing aggregates are as non-organized cytosolic formations.

SOD1^{G93C}-GFP containing aggregates were present in the cytoplasm of motor neuronal cells NSC-34, but not in the nucleus (Figure 3B). We studied two other ALS-related mutants of SOD1, SOD1^{A4V} and SOD1^{V31A}, associated with a rapid and a slow progression of ALS respectively (Broom et al., 2006; Dangoumau et al., 2014). We first analyzed a possible structural modification of mutated SOD1 proteins by using the modelling server Swiss-Model (Figure 3A). The A4 and V31 residues are located in β -strands of the β -barrel of SOD1, the G93 residue in a turn of the β -barrel. All these amino acids are at distance from the catalytic center (region containing Cu²⁺ and Zn²⁺). Residues G93 and V31 are at distance from the region of dimerization of SOD1, but A4 is inside this region. When the mutations A4V, V31A and G93C were introduced into the model we did not detect important structural variations. All these mutants expressed in NSC-34 cells were present in cytosolic aggregates, except SOD1^{V31A}-GFP that was also present in nuclear aggregates (Figure 3B).

To better analyze the sub-cellular localization of the aggregates Correlative light and electron microscopy (CLEM) was used. CLEM enables the superposition of confocal microscopy images and transmission electronic microscopy images. NSC-34 cells expressing SOD1^{G93C}-GFP (Figure 3C) and SOD1^{A4V}-GFP (supplementary figure 3) were analyzed. The GFP-positive aggregates appeared randomly localized in the cytosol. They were not surrounded by a membrane, and were not localized in structure such as mitochondria or other cytoplasmic organelles. Thus, aggregates containing SOD1^{mutant}s-GFP appeared as non-organized cytosolic formations.

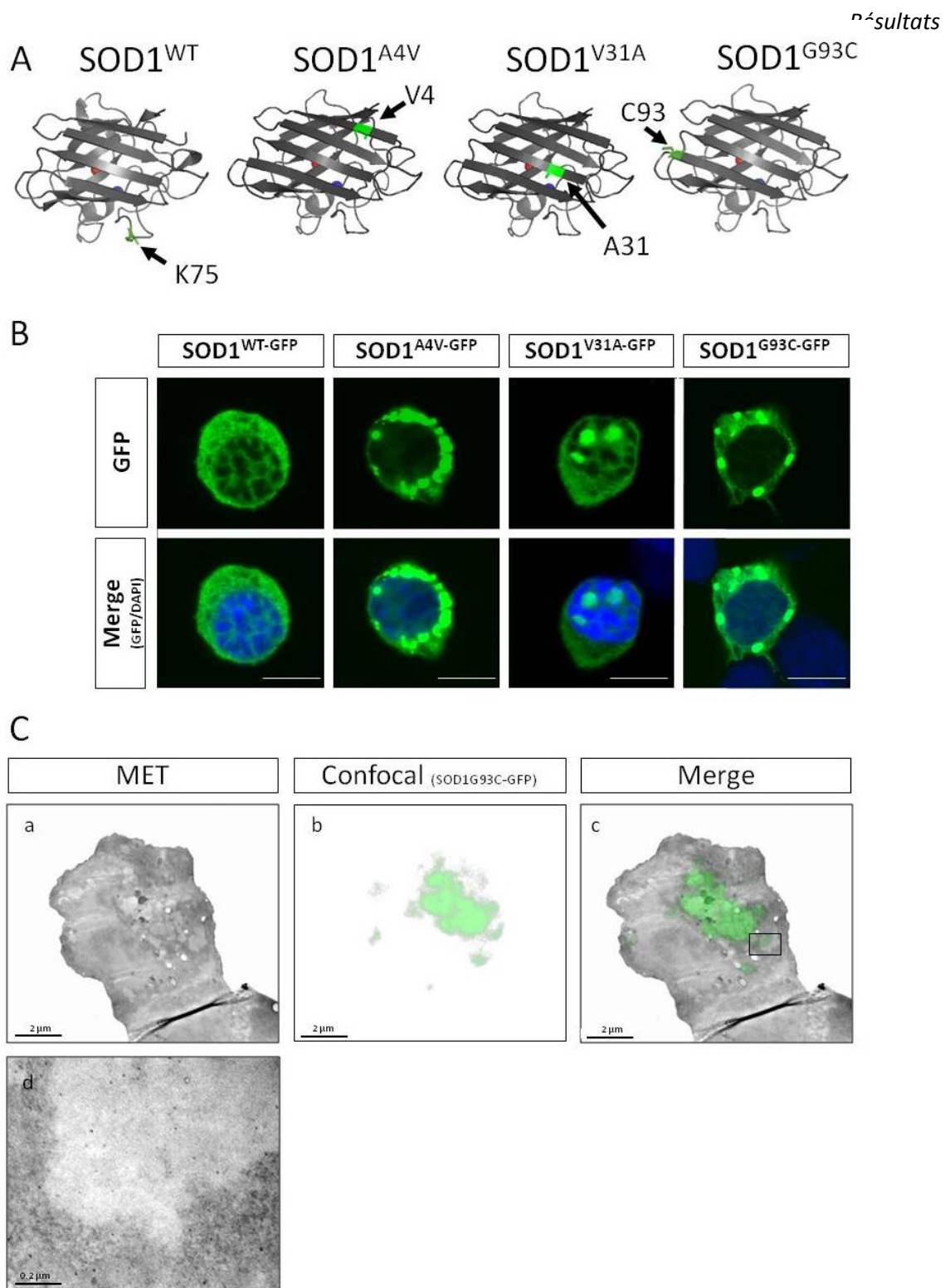


Figure 3: (A) Three-dimensional structure of SOD1^{WT} protein with K75 residue in green. 3D models of SOD1^{A4V}, SOD1^{V31A} and SOD1^{G93C} with mutations indicated by arrows. (B) Confocal microscopy analysis SOD1^{WT}-GFP or SOD1^{mutants}-GFP in NSC-34 showing aggregates 48 hours post-transfection. Scale bar: 30 μ m. (C) Correlative light and electron microscopy (CLEM) analysis of a NSC-34 cell expressing SOD1^{G93C}-GFP. Two magnifications are presented (a-c; d). Box in (c) shows the region presented in (d).

3.4. Absence of the K75 SUMOylation site in mutants SOD1 decreases aggregation

The lysine 75 of the predicted site of SUMOylation PKDE localized at the external surface of SOD1 was shown to be SUMOylated in HEK293 cells (Fei et al., 2006) (Figure 4A). We noted that this residue is not yet reported mutated in ALS patients (ALSoD <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>). To investigate the role of K75 SUMOylation, we substituted this lysine residue with an arginine (Figure 4B-D). NSC-34 cells expressing SOD1^{K75R} did not contain aggregate 48 hours after transfection. Moreover cell viability was not affected (Figure 4E), suggesting that this mutation was not pathogenic.

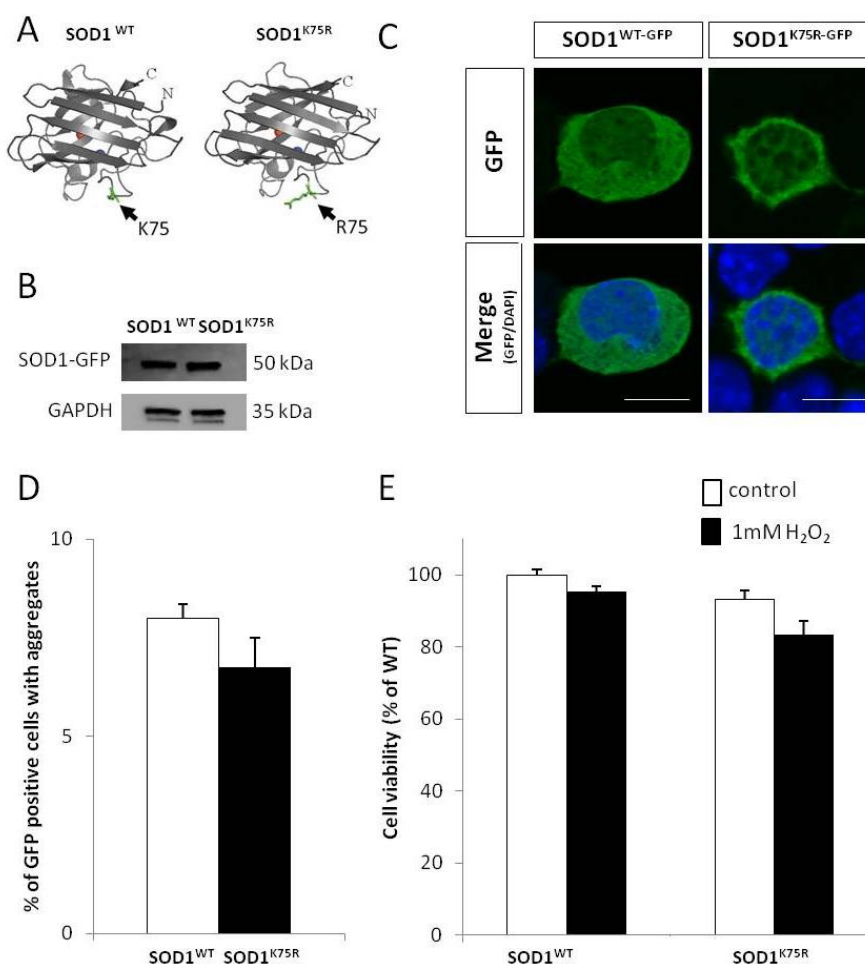


Figure 4: (A) 3D structure of the SOD1^{WT} protein with K75 (green), and SOD1^{K75R} with R75 (green). Cu²⁺ (red) and Zn²⁺ (blue) are indicated by spheres. (B) Western blotting of NSC-34 cells expressing SOD1^{WT}-GFP or SOD1^{K75R}-GFP using an antibody against GFP. (C) Confocal microscopy analysis of NSC-34 cells expressing SOD1^{WT}-GFP or SOD1^{K75R}-GFP, 48 hours post-transfection. Scale bar: 30 μm (D) Percentage of GFP-positive cells with aggregates in NSC-34 expressing SOD1^{WT} or SOD1^{K75R}. (E) Cell viability of NSC-34 expressing SOD1^{WT} or SOD1^{K75R}.

Data in CHO and HEK293 cells suggested that SUMOylation may influence the aggregation of mutants SOD1 (Fei et al., 2006; Niikura et al., 2014). We wondered whether SUMO modification of mutants SOD1 was also involved in aggregates formation in motor neuronal cells. We first observed that cultures of NSC-34 cells expressing mutants SOD1 contained a significantly higher number of cells with aggregates compared to cultures expressing SOD1^{WT} (Figure 5A, 5B; white bars; $p < 0.05$). The viability was not affected 48h post-transfection (Figure 5C). To determine if the SUMOylation of mutants SOD1 could affect the presence of aggregates in motor neuronal cells, double mutants were generated. They contained an ALS-related mutation (A4V, V31A or G93C) and a substitution of the lysine 75 by an arginine in the SUMOylation site of SOD1 (Figure 5B, C; Black bars). The lysine 75 was at distance from the three mutations (Figure 3A). Very interestingly significant reductions of the number of cells with aggregates were observed in cultures of NSC-34 expressing the double SOD1 mutants^{A4V-K75R} (reduction of 50%; $p < 0.05$), SOD1^{V31A-K75R} (reduction of 74%; $p < 0.05$) and SOD1^{G93C-K75R} (reduction of 77%; $p < 0.05$) compared to single ALS-related mutants. The number of cells with aggregates was similar in cultures expressing the double mutants SOD1 or SOD1^{WT}. Cell viability was not modified at 48h. These results indicated an important role for the post-translational modification of the lysine 75 of mutants SOD1 in the formation of aggregates..

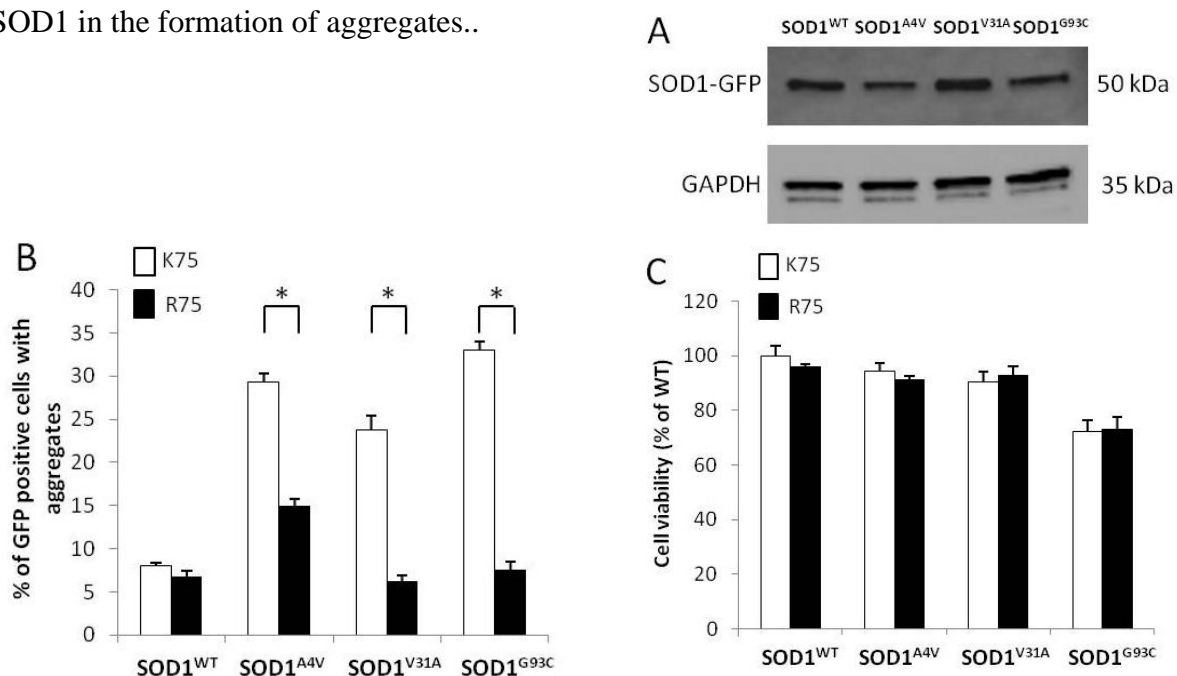


Figure 5: (A) Western blotting of NSC-34 cells expressing SOD1^{WT}-GFP, SOD1^{A4V}-GFP, SOD1^{V31A}-GFP and SOD1^{G93C}-GFP using antibodies against GFP or GAPDH. (B) Percentage of GFP-positive NSC-34 cells with aggregates expressing SOD1^{WT}, SOD1^{A4V}, SOD1^{V31A} and SOD1^{G93C} (whites boxes) or double mutants with an absence of SUMOylation site, SOD1^{WT-K75R}, SOD1^{A4V-K75R}, SOD1^{V31A-K75R} and SOD1^{G93C-K75R} (black boxes). * $p < 0.05$, non-parametric Mann-Whitney test. (C) Cell viability of NSC-34 cells expressing SOD1^{WT}, SOD1^{A4V}, SOD1^{V31A} and SOD1^{G93C} (whites boxes) or double

mutants with an absence of SUMOylation site, SOD1^{WT-K75R}, SOD1^{A4V-K75R}, SOD1^{V31A-K75R} and SOD1^{G963C-K75R} (black boxes).

4. Discussion

Recent data suggested that the SUMOylation pathways may influence aggregation of particular proteins in several neurodegenerative diseases (Kim et al., 2011). The involvement of SUMO modification in the formation of SOD1^{mutant}-positive aggregates observed in Amyotrophic Lateral Sclerosis was already evaluated in non-neuronal CHO and HEK293 cells expressing high concentration of SUMO proteins and of the UBE2I SUMO-conjugating enzyme (Fei et al., 2006; Niikura et al., 2014). Here we report that the expression of several mutated forms of SOD1 in the motor neuronal cells NSC-34 induces the formation of cytosolic and sometimes nuclear aggregates containing the protein SUMO-1. We show for the first time that the formation of these aggregates can be modulated by action on a site of post-translational modification of the mutated proteins SOD1, the K75 SUMOylation site.

Several reviews highlighted importance of the contribution of SUMO to neurodegenerative diseases (Dorval and Fraser, 2007; Krumova and Weishaupt, 2013). They indicated that several disease-causing proteins either co-localize with SUMO proteins, often in aggregates, or are target proteins for SUMO modification. Protein SUMOylation appears as an emerging pathway in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) (Dangoumau et al., 2013). First, several observations support a direct role for SUMOylation in diverse pathogenic mechanisms involved in ALS, such as response to hypoxia, oxidative stress, glutamate excitotoxicity and proteasome impairment. Next SOD1 protein and transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43) are targets of SUMO modifications (Fei et al., 2006; Niikura et al., 2014; Seyfried et al., 2010). Finally, we show here that SUMO is present in aggregates in motor neuronal cells expressing ALS-related SOD1 mutants. It would be of interest to show if this is also true for other mutations. We observe that the formation of aggregates is associated with a reduction of free-SUMO1 level in cells. This reduction is induced by the expression of mutants SOD1 and is independent of the presence of oxidative stress in our cell cultures. This reduction of free-SUMO-1 level in motor neuronal cells expressing mutants SOD1 could impair the normal cellular physiology, participating in motor neuron degeneration. Indeed SUMO-1 post-translational modifications regulate the function and fate of an important number of proteins involved in intracellular transport, cell signalling, transcription and DNA repair for example (Bergink and Jentsch, 2009; Jaafari et al., 2013;

Kirkin and Dikic, 2007). The reduction in free-SUMO1 level in NSC-34 cells expressing mutants SOD1 is not caused by modifications in gene expression of *SUMO1* or enzymes of the SUMOylation pathway. It could be the consequence of its sequestration in aggregates as observed by confocal microscopy analysis.

Several studies have demonstrated that mutants SOD1 share a reduced conformational stability that may contribute to their toxic gain of function (Rodriguez et al., 2002; Williamson et al., 2000). The mutations analyzed by crystallographic studies or modelling predictions indicate that the overall structure of SOD1 is not significantly affected by ALS-related mutations. This is confirmed for the V31A mutation that we have recently described (Dangoumau et al., 2014). We used a SOD1-GFP fusion protein system to analyse the intracellular conformation and localization of wild type and mutants SOD1. This system is based on the concept that if the conformation of a protein is altered by a mutation, the conformation of the GFP-fusion protein would also be altered in a similar way, resulting in a decrease in fluorescence. We observed such a reduction of fluorescence for the mutant SOD1^{G93C} in NSC-34 cells, confirming previous results obtained on SOD1^{G93A} (Zhang and Zhu, 2006). This reduction of intensity was parallel to an increase in number of motor neuronal cells containing aggregates. These aggregates, representing pathological hallmarks of ALS, were analyzed by a technique combining confocal microscopy, to localise NSC-34 cells with SOD1^{mutants}-GFP containing aggregates, and MET, to analyze sub-cellular structures. The aggregates are localized in the cytosol of NSC-34 cells, not in organelles. They appear as non-organized structures. We did not observe a preferred perinuclear localization of these aggregates as previously reported for the A4T or G93R mutants in CHO cells (Niikura et al., 2014). These differences in sub-cellular localization could be due to difference in cell types. It is also interesting to note that SOD1^{V31A}-GFP containing aggregates were also present in the nucleus which may be in relation with a supplementary toxic effect compared to the other mutations.

Studies on SOD1^{WT} indicated that the conversion of lysine 75 to an arginine in the predicted SUMOylation site PKDE completely blocked the SUMOylation of SOD1 (Fei et al., 2006). This K75 residue, which has not been reported as a site of mutation in ALS databases, is localised on an external loop in SOD1 protein. We show that the mutation of this K75 residue is not associated with the formation of cellular aggregates or a reduction in cell viability. Based on the observation that mutant SOD1 proteins can be SUMOylated and that aggregates in motor neuronal cells NSC-34 contained SUMO-1, we analyzed the

consequences of an expression of double mutant proteins carrying both an ALS-related mutation and a substitution of K75. We observed that the lysine 75 was required for the formation of aggregates in cells. Altogether this data suggest that SUMO deficient SOD1 mutant proteins could be less prone to aggregation. How the SUMO-1 modification of mutants SOD1 triggers its aggregation needs to be clarified in future studies. It could affect the three-dimensional structure of mutants SOD1, modifying their solubility or self-interaction. It could also affect the interaction of mutants SOD1 with protecting chaperone proteins, such as HSP70 for example (Novoselov et al., 2013).

The contribution of SUMO to neurodegeneration appears variable depending of the diseases and the proteins. While SUMO appears to be deleterious in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) and Huntington disease (HD) for example, it seems to have a mixed effect in Parkinson's disease (Kim et al., 2011; Krumova and Weishaupt, 2013; Mukherjee et al., 2009; O'Rourke et al., 2013). SUMO-1 modification of SOD1 in Amyotrophic Lateral sclerosis (ALS) also appears to be deleterious (Fei et al., 2006). The work presented here supports a participation of the SUMOylation pathway in ALS, with a role of the lysine 75 in the SUMOylation site of SOD1 in the process of aggregation in motor neuronal cells. These data suggest that manipulation of post-translational modification pathways, such as the SUMO-1 pathway, could reduce protein aggregation in motor neurons, and that may lead to improve motor neuron survival.

Disclosure statement

All authors disclose no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the association ARSLA. We thank Fabienne Arcanger for her technical help (CLEM).

References

- Andersen, P.M., Al-Chalabi, A., 2011. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat. Rev. Neurol.* 7, 603–615.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T., 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 22, 195–201.

- Bergink, S., Jentsch, S., 2009. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* 458, 461–467.
- Boutahar, N., Wierinckx, A., Camdessanche, J.P., Antoine, J.-C., Reynaud, E., Lassabliere, F., Lachuer, J., Borg, J., 2011. Differential effect of oxidative or excitotoxic stress on the transcriptional profile of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 cultured neurons. *J. Neurosci. Res.* 89, 1439–1450.
- Broom, W.J., Russ, C., Sapp, P.C., McKenna-Yasek, D., Hosler, B.A., Andersen, P.M., Brown, R.H., 2006. Variants in candidate ALS modifier genes linked to Cu/Zn superoxide dismutase do not explain divergent survival phenotypes. *Neurosci. Lett.* 392, 52–57.
- Bruijn, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W., Cleveland, D.W., 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281, 1851–1854.
- Dangoumau, A., Verschueren, A., Hammouche, E., Papon, M.-A., Blasco, H., Cherpi-Antar, C., Pouget, J., Corcia, P., Andres, C.R., Vourc'h, P., 2014. Novel SOD1 mutation p.V31A identified with a slowly progressive form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* 35, 266.
- Dangoumau, A., Veyrat-Durebex, C., Blasco, H., Praline, J., Corcia, P., Andres, C.R., Vourc'h, P., 2013. Protein SUMOylation, an emerging pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Int. J. Neurosci.* 123, 366–374.
- Deng, H.X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R.P., 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261, 1047–1051.
- Dorval, V., Fraser, P.E., 2007. SUMO on the road to neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 694–706.
- Fei, E., Jia, N., Yan, M., Ying, Z., Sun, Q., Wang, H., Zhang, T., Ma, X., Ding, H., Yao, X., Shi, Y., Wang, G., 2006. SUMO-1 modification increases human SOD1 stability and aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 406–412.
- Gareau, J.R., Lima, C.D., 2010. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 861–871.
- Gurney, M.E., Cutting, F.B., Zhai, P., Andrus, P.K., Hall, E.D., 1996. Pathogenic mechanisms in familial amyotrophic lateral sclerosis due to mutation of Cu, Zn superoxide dismutase. *Pathol. Biol. (Paris)* 44, 51–56.
- Jaafari, N., Konopacki, F.A., Owen, T.F., Kantamneni, S., Rubin, P., Craig, T.J., Wilkinson, K.A., Henley, J.M., 2013. SUMOylation is required for glycine-induced increases in AMPA receptor surface expression (ChemLTP) in hippocampal neurons. *PloS One* 8, e52345.
- Kim, Y.M., Jang, W.H., Quezado, M.M., Oh, Y., Chung, K.C., Junn, E., Mouradian, M.M., 2011. Proteasome inhibition induces α -synuclein SUMOylation and aggregate formation. *J. Neurol. Sci.* 307, 157–161.

- Kirby, J., Halligan, E., Baptista, M.J., Allen, S., Heath, P.R., Holden, H., Barber, S.C., Loynes, C.A., Wood-Allum, C.A., Lunec, J., Shaw, P.J., 2005. Mutant SOD1 alters the motor neuronal transcriptome: implications for familial ALS. *Brain J. Neurol.* 128, 1686–1706.
- Kirkin, V., Dikic, I., 2007. Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 199–205.
- Krumova, P., Weishaupt, J.H., 2013. Sumoylation in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 2123–2138.
- Mukherjee, S., Thomas, M., Dadgar, N., Lieberman, A.P., Iñiguez-Lluhí, J.A., 2009. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of the androgen receptor attenuates polyglutamine-mediated aggregation. *J. Biol. Chem.* 284, 21296–21306.
- Niikura, T., Kita, Y., Abe, Y., 2014. SUMO3 Modification Accelerates the Aggregation of ALS-Linked SOD1 Mutants. *PloS One* 9, e101080.
- Novoselov, S.S., Mustill, W.J., Gray, A.L., Dick, J.R., Kanuga, N., Kalmar, B., Greensmith, L., Cheetham, M.E., 2013. Molecular chaperone mediated late-stage neuroprotection in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PloS One* 8, e73944.
- O'Rourke, J.G., Gareau, J.R., Ochaba, J., Song, W., Raskó, T., Reverter, D., Lee, J., Monteys, A.M., Pallos, J., Mee, L., Vashishtha, M., Apostol, B.L., Nicholson, T.P., Illes, K., Zhu, Y.-Z., Dasso, M., Bates, G.P., Difiglia, M., Davidson, B., Wanker, E.E., Marsh, J.L., Lima, C.D., Steffan, J.S., Thompson, L.M., 2013. SUMO-2 and PIAS1 modulate insoluble mutant huntingtin protein accumulation. *Cell Rep.* 4, 362–375.
- Pédélecq, J.-D., Pilch, E., Liong, E.C., Berendzen, J., Kim, C.-Y., Rho, B.-S., Park, M.S., Terwilliger, T.C., Waldo, G.S., 2002. Engineering soluble proteins for structural genomics. *Nat. Biotechnol.* 20, 927–932.
- Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., Scott, R.W., Snider, W.D., 1996. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 13, 43–47.
- Rodriguez, J.A., Valentine, J.S., Eggers, D.K., Roe, J.A., Tiwari, A., Brown, R.H., Hayward, L.J., 2002. Familial amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations decrease the thermal stability of distinctly metallated species of human copper/zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 277, 15932–15937.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
- Sau, D., De Biasi, S., Vitellaro-Zuccarello, L., Riso, P., Guarnieri, S., Porrini, M., Simeoni, S., Crippa, V., Onesto, E., Palazzolo, I., Rusmini, P., Bolzoni, E., Bendotti, C., Poletti, A., 2007. Mutation of SOD1 in ALS: a gain of a loss of function. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1604–1618.
- Seyfried, N.T., Gozal, Y.M., Dammer, E.B., Xia, Q., Duong, D.M., Cheng, D., Lah, J.J., Levey, A.I., Peng, J., 2010. Multiplex SILAC analysis of a cellular TDP-43 proteinopathy

model reveals protein inclusions associated with SUMOylation and diverse polyubiquitin chains. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 9, 705–718.

Son, M., Cloyd, C.D., Rothstein, J.D., Rajendran, B., Elliott, J.L., 2003. Aggregate formation in Cu,Zn superoxide dismutase-related proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 14331–14336.

Taylor, J.P., Hardy, J., Fischbeck, K.H., 2002. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296, 1991–1995.

Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J., Terwilliger, T.C., 1999. Rapid protein-folding assay

Watanabe, M., Dykes-Hoberg, M., Culotta, V.C., Price, D.L., Wong, P.C., Rothstein, J.D., 2001. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol. Dis.* 8, 933–941.

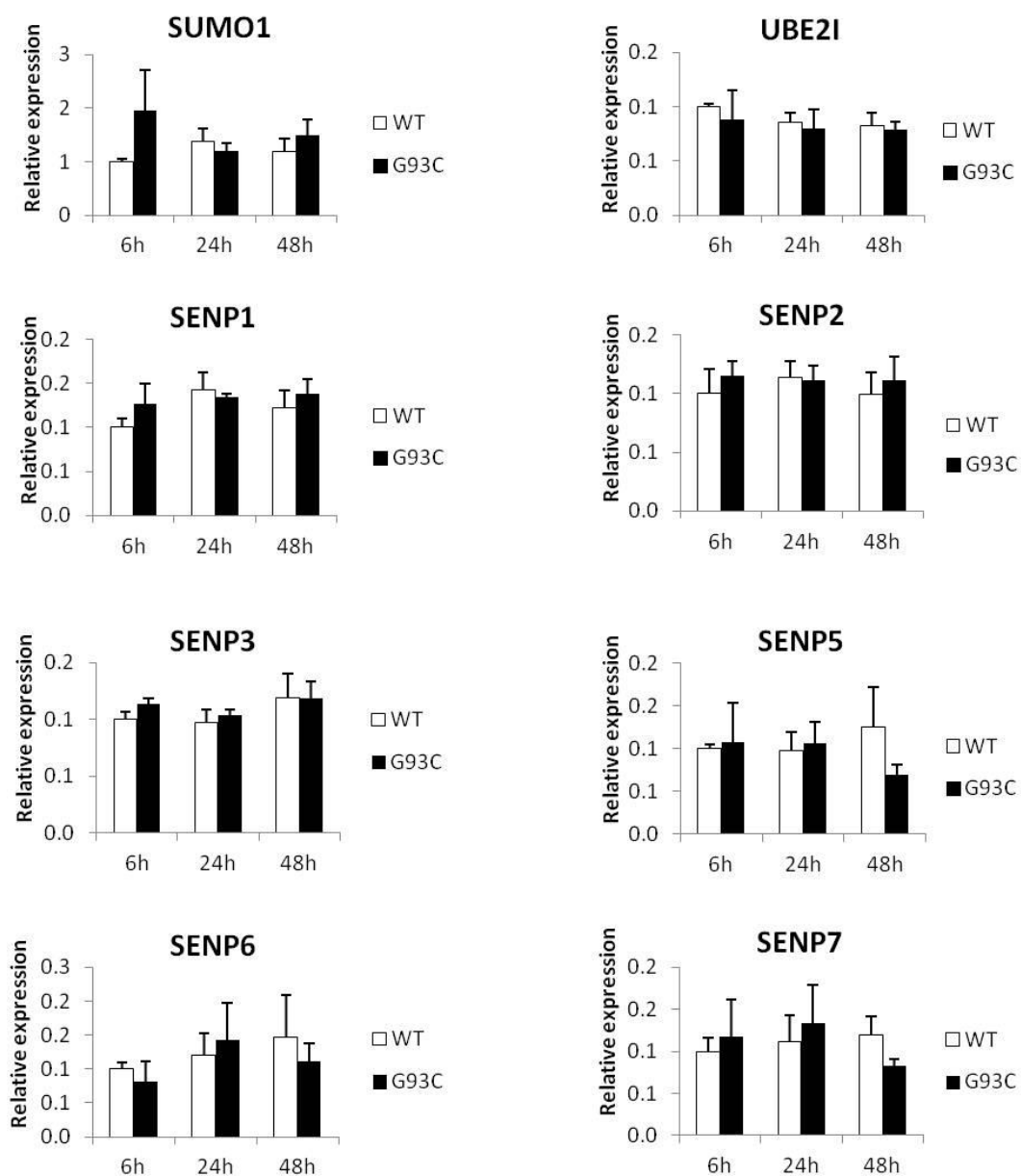
Williamson, T.L., Corson, L.B., Huang, L., Burlingame, A., Liu, J., Bruijn, L.I., Cleveland, D.W., 2000. Toxicity of ALS-linked SOD1 mutants. *Science* 288, 399.

Zhang, F., Zhu, H., 2006. Intracellular conformational alterations of mutant SOD1 and the implications for fALS-associated SOD1 mutant induced motor neuron cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 404–414.

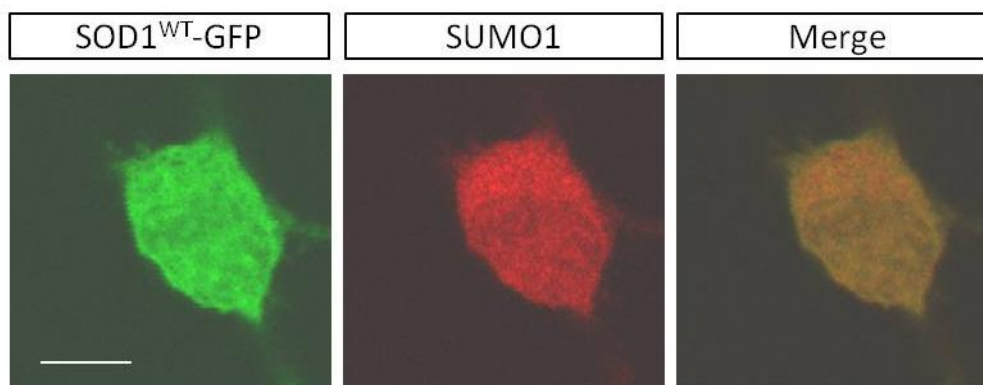
Supplementary data

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Sumo1</i>	ATG TCT GAC CAG GAGGCAAA	TCTCACTGCTATCCTGTCCAA
<i>Ube2i</i>	GAGGCTTGTTCAAGCTACGG	GTGATAGCTGGCCTCCAGTC
<i>Senp1</i>	CGAAGTCTTTGCCTCGAAAC	GCAGGCTTAATGGGAAATGA
<i>Senp2</i>	TAAGGTTCTCGGCACCATTC	GGCTGGGATCTCATCAGTGT
<i>Senp3</i>	AGGTGGACCAAAAATGTGGA	AGAGTTCGCTGGGAGTCAAA
<i>Senp5</i>	GAGTTGCTGGACCAACCTTA	TCATCCACTGGAGAGGCTTT
<i>Senp6</i>	CACAGAACTCTGCTGCCAAG	GGCTCACTTCTTCTCTGTGC
<i>Senp7</i>	AGGGTCAGCAGTCTCAGCAT	ATGGCCGCTTACACATTTTC
<i>Actin</i>	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	TGATCCACATCTGCTGGAAG
<i>Gapdh</i>	CTGCACCACCAACTGCTTAG	GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT

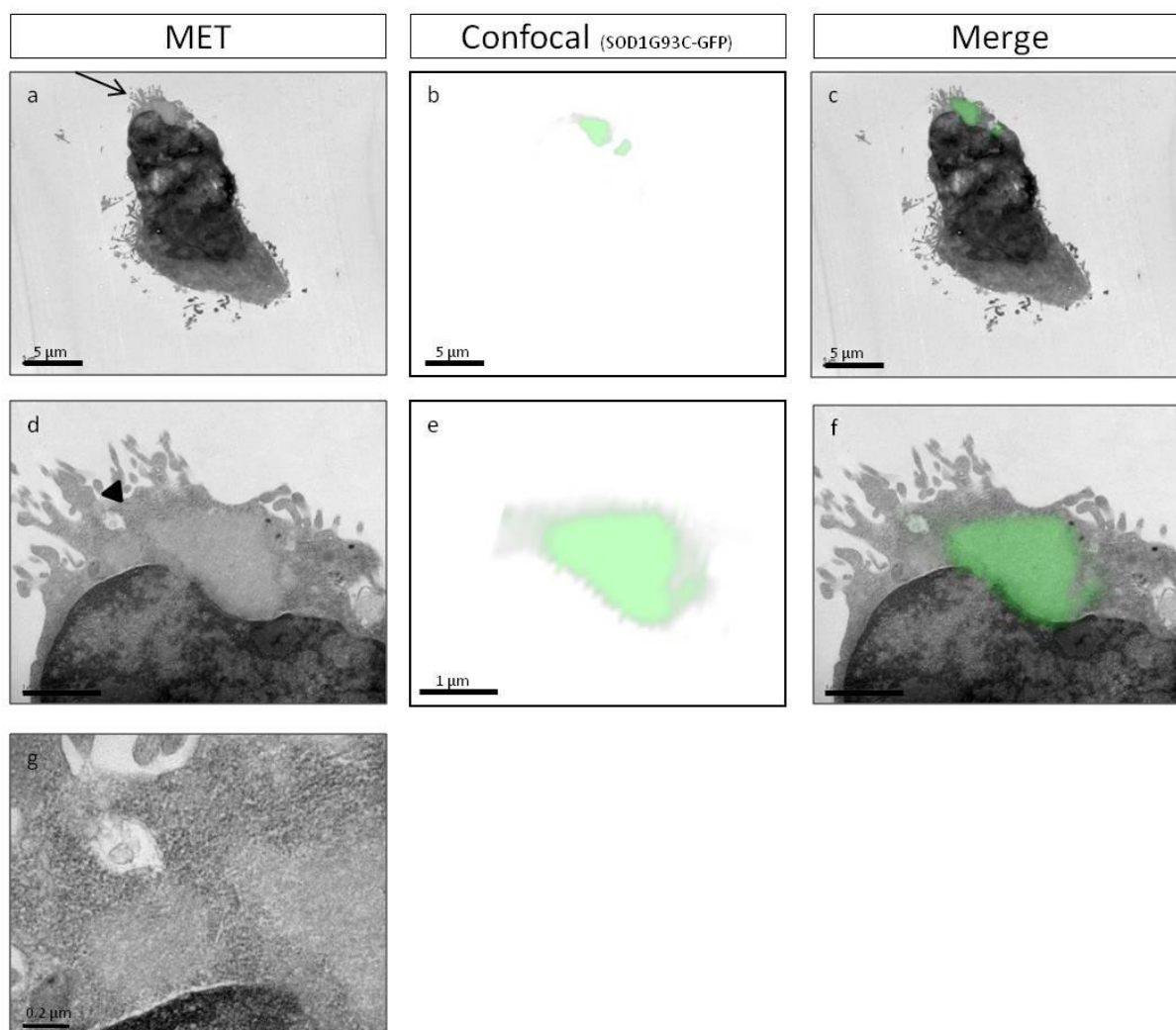
Supplementary Table1: Primers used for qPCR



Supplementary Figure 1: RT-qPCR on RNA extracted from NSC-34 cells expressing SOD1^{WT} or SOD1^{G93C}. Expression of *SUMO1*, *UBE2I* and *SENPs* genes at 6, 24 and 48 hours post-transfection.



Supplementary Figure 2: Immunocytochemistry analysis of SUMO1 in NSC-34 cells expressing SOD1^{WT}-GFP (confocal microscopy). Scale bar: 20 μ m



Supplementary Figure 3: Correlative light (Confocal) and electron microscopy (MET) analysis of a NSC-34 cell expressing SOD1^{A4V}-GFP. Three magnifications are presented (a-c; d-f; g). Arrow in (a) indicates the region observed in (d). Arrowhead in (d) indicates the region observed in (g).

DISCUSSION-CONCLUSION

DISCUSSION-CONCLUSION

La Sclérose Latérale Amyotrophique est une maladie neurodégénérative de l'adulte multifactorielle qui résulterait de l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux. Depuis 1993 et la découverte de mutations du gène *SOD1* dans la SLA, le nombre de gènes liés ou favorisant la survenue de cette maladie n'a cessé de croître. Parmi eux, les 4 gènes *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* et *C9ORF72* sont considérés de façon unanime comme des facteurs génétiques causaux de la SLA. Leurs mutations co-ségrègent avec la maladie dans les formes familiales, avec une transmission dominante le plus fréquemment. Ils sont ainsi en cause dans plus de 50% des formes familiales et moins de 10% des formes sporadiques de SLA.

Les protéines codées par ces gènes de la SLA sont très souvent retrouvées dans des inclusions cytoplasmiques ou agrégats protéiques, une des caractéristiques physiopathologiques de la SLA. Ces agrégats sont visibles dans les motoneurones en dégénérescence et les oligodendrocytes avoisinants dans la moelle épinière de patients SLA porteurs de mutations de ces gènes, mais aussi non-porteurs de ces mutations. On les observe également dans plusieurs régions frontales et temporales du cerveau, dans l'hippocampe et le cervelet (Al-Chalabi et al., 2012). Il apparaît de plus en plus clairement que la formation des sans réponse : comment se forment-ils ? Les protéines mutées, codées par les gènes causaux de la SLA, ont-elles un rôle direct dans leur formation ? Affectent-ils un ou des mécanismes cellulaires ? Ont-ils un rôle direct ou bien indirect dans la dégénérescence des motoneurones ?

Les agrégats protéiques présents dans les motoneurones en dégénérescence sont riches en ubiquitine. La présence d'ubiquitine dans ces agrégats sous-entend un rôle de la voie de l'ubiquitine (Ub)-protéasome dans la physiopathologie de la SLA. La voie de l'Ub-protéasome est un système de contrôle qualité post-traductionnelle qui participe à la régulation de la demi-vie des protéines cellulaires. Cette voie a également d'autres rôles. Elle régule directement la localisation et la fonction de très nombreuses protéines dans les cellules. D'autres modifications post-traductionnelles des protéines pourraient aussi avoir un rôle important dans la physiopathologie de la SLA. Ainsi l'une des voies « ubiquitine-like », la voie de la SUMOylation qui fixe les petites protéines Small Ubiquitin MOdifier (SUMO) à des protéines cellulaires, apparaît très intéressante comme nous l'avons rapporté dans une revue (Dangoumau et al., 2013). Une seconde revue, très récemment publiée, est venue conforter nos hypothèses et suggestions (Foran et al., 2013).

La voie de la SUMOylation est impliquée dans les réponses cellulaires au stress oxydant, à l'hypoxie et à l'excitotoxicité par le glutamate, qui ont été liées à la dégénérescence des motoneurones dans la SLA. Plusieurs gènes mutés dans la SLA, comme *SOD1* et *TARDBP* codent des protéines cibles de cette voie. De plus, le gène *FUS* muté dans 5% des cas familiaux de SLA code une protéine à activité E3 SUMO ligase. Les voies de la SUMOylation et de l'Ub présentent de nombreuses similitudes. Elles font intervenir 3 types d'enzymes : E1 d'activation, E2 de conjugaison, et E3 de liaison. L'E1 est propre à chacune des voies. L'E2 de la voie de la SUMOylation UBE2I est unique, mais elle fait également partie des 37 E2 de la voie de l'Ub (Michelle et al., 2009). Les E3 sont très nombreuses, certaines intervenant dans les deux voies comme UHRF2. La voie de la SUMOylation a été impliquée dans la régulation de la transcription des gènes, dans le contrôle de la localisation subcellulaire ou de la demi-vie des protéines, ceci parfois en entrant en compétition ou en agissant en synergie avec la voie de l'Ub. Plusieurs études ont également montré que la voie de la SUMOylation pouvait affecter la solubilité des protéines (Droescher et al., 2011).

Mon projet de thèse avait pour objectif de mieux comprendre le rôle des voies de l'Ub et de l'Ub-like SUMO dans la physiopathologie de la Sclérose Latérale Amyotrophique liée à la mutation du gène *SOD1*.

Caractérisation de nouvelles mutations du gène SOD1

Il est souvent difficile d'identifier parmi les mécanismes cellulaires impliqués dans la SLA ceux qui appartiennent aux causes ou aux conséquences physiopathologiques. La découverte de nouveaux gènes mutés dans la SLA et de nouvelles mutations dans les gènes causaux, sont autant d'informations à notre disposition pour tenter de comprendre ce qui conduit à l'agrégation des protéines et à la mort des motoneurones.

Mon travail de thèse a donc débuté par la mise en place dans le Laboratoire, en lien avec le Centre SLA de Tours, d'une stratégie d'étude permettant d'analyser le pouvoir pathogène de nouvelles mutations de gènes de la SLA. La première étape consiste en une étude bioinformatique qui évalue la pathogénicité potentielle de la forme mutée de la protéine à l'aide du logiciel PolyPhen, et la conséquence de la mutation sur la structure 3D de la protéine modélisée à l'aide du site Swiss Model (visualisation PyMOL). La seconde étape porte sur des études fonctionnelles *in vitro* permettant d'évaluer les conséquences de la

mutation sur la viabilité cellulaire, la formation d'agrégats et la localisation de la protéine porteuse de la mutation dans les cellules motoneuronales par exemple.

Durant ma thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au gène *SOD1* codant la protéine superoxyde dismutase 1 (SOD1). A ce jour, 88 des 153 résidus d'acides aminés de *SOD1* ont été trouvés mutés de façon ponctuelle (non-sens ou faux-sens) dans la SLA. Le phénotype associé à ces diverses mutations n'est pas constant. L'hétérogénéité phénotypique observée dans les formes familiales de SLA liées à des mutations de *SOD1* est visible au niveau de l'âge de début ou de la durée d'évolution de la maladie, par exemple. Ainsi les mutations *SOD1*^{G93A} ou *SOD1*^{A4V}, beaucoup étudiées, sont associées à une évolution assez rapide de la maladie. Nous avons identifié 2 nouvelles mutations faux-sens, *SOD1*^{V31A} et *SOD1*^{E121G} situées dans des régions différentes de la protéine et présentant une évolution plutôt lente de la maladie. Peu de temps après notre publication de la mutation *SOD1*^{V31A}, une équipe japonaise a rapporté la même mutation chez un patient SLA présentant des symptômes neurologiques similaires avec une évolution lente de la maladie (Sakamoto et al., 2014). Ces résultats confortent l'idée d'une corrélation génotype-phénotype. Nos études *in vitro* sur cette mutation *SOD1*^{V31A} ont permis de montrer la présence d'agrégats cytoplasmiques dans les cellules NSC-34 exprimant la protéine mutée, mais aussi d'agrégats nucléaires, ce qui est rare. Ces agrégats nucléaires auraient-ils aussi un rôle dans la physiopathologie de la SLA ? Une étude récente a montré que la protéine *SOD1* jouerait dans le noyau un rôle de régulation d'expression génique en réponse au stress oxydant (Tsang et al., 2014). La seconde mutation *SOD1*^{E121G} que nous avons rapportée est située dans une région cruciale de la protéine, à proximité d'une des histidines fixant le cuivre. Plusieurs travaux suggèrent que les mutants *SOD1* ayant des difficultés à fixer les ions métalliques auraient une structure 3D déstabilisée présentant une tendance renforcée à l'agrégation (Furukawa et al., 2010). Les cellules motoneuronales NSC-34 exprimant le mutant *SOD1*^{E121G} présentent des agrégats cytoplasmiques et une viabilité réduite en présence de stress oxydant. L'utilisation de cette stratégie d'étude a donné lieu à 3 publications:

“A novel *SOD1* mutation p.V31A identified with a slowly progressive form of Amyotrophic Lateral Sclerosis”, Dangoumau et al., 2014, *Neurobiology of Aging*

“A novel p.E121G *SOD1* mutation in slowly progressive form of Amyotrophic Lateral Sclerosis induces cytoplasmic aggregates in cultured motor neurons and reduces cell viability”, Dangoumau et al., soumis

“Association of paraneoplastic motor neuron disease with anti-Ri antibodies and a novel SOD1 I18del mutation”, Diard-Detoeuf C. Dangoumau A. et al.; 2014, Journal of Neurological Sciences (Annexe 3).

La stratégie d'étude que nous avons mise en place pourra être utilisée pour l'analyse de mutations d'autres gènes liés à la SLA. Elle pourrait bien sûr être améliorée. La mesure de l'activité enzymatique de SOD1 pourrait être étudiée, même si il est connu que la plupart des mutants SOD1 conservent une activité proche de celle de la forme sauvage. Nous pensons qu'une amélioration significative de notre stratégie d'étude serait d'utiliser un autre modèle cellulaire pour les études fonctionnelles, pour nous rapprocher au plus près des motoneurones. Plusieurs modèles *in vitro* de la SLA existent comme nous l'avons décrit dans une revue (Veyrat-Durebex C., Corcia P., Dangoumau A., et al. ; 2013). Nos études ont été réalisées à l'aide de la lignée motoneuronale NSC-34, hybride neuroblastome-motoneurone de moelle épinière de souris. Les cellules NSC-34 sont largement utilisées dans les études sur la SLA. Mais comme toutes lignées, la lignée NSC-34 présente des limites. Ces cellules se multiplient continuellement, alors que les motoneurones sont des cellules quiescentes. Leur métabolisme est donc bien sûr différent de celui de motoneurones. Par ailleurs ces cultures ne comportent pas de cellules gliales, qui dans le système nerveux central sont en contact avec les motoneurones et communiquent avec elles. L'utilisation de cultures primaires enrichies en motoneurones de rongeurs nous paraît donc très intéressante. Pour cela, nous avons donc mis en place au laboratoire la culture primaire de motoneurones de moelle épinière d'embryons de rat à E14. Les deux étapes importantes pour assurer une qualité et une pureté optimale à ces cultures sont, une élimination optimale des méninges et des ganglions spinaux, et l'utilisation d'un coussin de métrizamide.

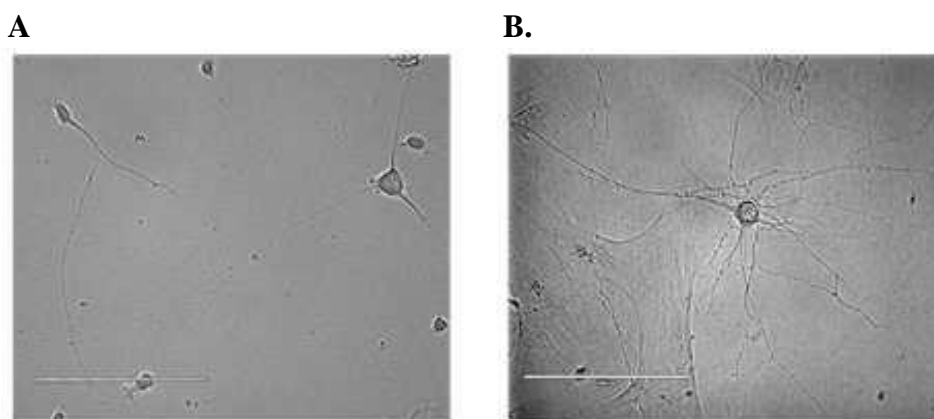


Figure 16: Motoneurones en culture depuis 24h (A) et 8 jours (B). Barre d'échelle : 200 μ m.

Nos premières cultures nous ont permis d'obtenir des motoneurones présentant des corps cellulaires de gros diamètre et longs neurites (Figure 16). Nos premières expériences de transfection des motoneurones par magnétofection ont montré qu'ils peuvent être transfectés et donc exprimer des protéines d'intérêt, comme nous avons pu l'observer lors de l'étude de la mutation SOD1^{E121G}. La quantité de cellules par culture et les taux de transfection faible obtenus sont toutefois des limites du modèle.

Etude des gènes des voies de l'Ubiquitine et Ub-like SUMO dans la SLA

Peu de choses sont connues à ce jour sur les liens entre les facteurs génétiques et les facteurs environnementaux impliqués dans la SLA. Plusieurs études ont indiqués que le stress oxydatif est un facteur environnemental important dans l'étiologie de cette maladie. Une relation directe pourrait exister entre le stress oxydant et la SLA liée à la mutation du gène SOD1. SOD1 est en effet une enzyme cruciale de défense anti-oxydante. Les mutations de SOD1 identifiées à ce jour conservent toutefois pour la plupart l'activité anti-oxydante de la protéine comme nous l'avons indiqué précédemment. Par ailleurs les souris invalidées pour SOD1 ne présentent pas de troubles moteurs, tandis que les souris exprimant une forme mutée de la protéine SOD1 développent une paralysie des membres. Les mécanismes par lesquels les mutants SOD1 induisent la mort des motoneurones ne sont donc pas encore clairement compris : détoxification anormale des radicaux libres générés par le stress oxydant ? Agrégation protéique séquestrant des protéines ou d'autres composés cellulaires importants ? Anomalie de transport axonal ? Anomalies du fonctionnement mitochondrial ?

La seconde partie du projet de thèse a donc consisté en l'étude de l'effet combiné d'un stress oxydant et de l'expression de diverses formes mutées de la protéine SOD1. Nous avons ainsi observé que lorsque nous sur-exprimions les mutants SOD1^{A4V}, SOD1^{V31A} et SOD1^{G93C} dans les cellules motoneuronales NSC-34, leur viabilité n'était affectée qu'en présence d'un stress oxydant. Nous avons dans un premier temps montré par une étude microarray que les cellules NSC-34 soumises au stress oxydant de 1mM d'H₂O₂ pendant 3h ont leur transcriptome fortement modifié. De manière intéressante nous avons observé une modification d'expression de plusieurs gènes des voies de l'ubiquitine et des Ub-like SUMO. Ainsi sur les 729 gènes que nous avons dénombrés dans ces voies, 26 gènes avaient une expression qui variait significativement avec le stress oxydant. Nous en avons sélectionné 6 en nous basant sur les connaissances disponibles dans la littérature sur leurs fonctions et leurs

implications dans des processus physiopathologiques intéressants dans le cadre de maladies neurodégénératives. Ces gènes codent des E2 comme Ube2e1 et Ube2d2, des E3 comme Trim9, Uhrf2, Rbx1 ou des protéases comme Senp1. Nous avons aussi sélectionné 5 gènes dont l'expression était proche de la significativité et dont les fonctions connues pouvaient être d'intérêt dans le cadre de la SLA: Ube3b, Birc3, Xaf1, Kdm2b et Siah2. Nous avons alors analysé par RT-qPCR comment variaient l'expression de ces 11 gènes si nous ajoutions au facteur environnemental qu'est le stress oxydant un facteur génétique, la mutation du gène SOD1. Nous avons alors observé des différences significatives d'expression pour les gènes codant l'E2 Ube2d2, les E3 Rbx1, Uhrf2, Kdm2b, Xaf1 et la peptidase Senp1 entre les cellules exprimant SOD1 sauvage ou SOD1^{A4V}. Nous nous sommes ensuite intéressés plus particulièrement au gène codant l'E3 Uhrf2. Cette protéine a la particularité de présenter à la fois une activité d'Ubiquitine ligase et de SUMO ligase. Peu d'E3 ligases possèdent cette double activité. Nous avons observé que l'expression de ce gène était augmentée significativement dans notre modèle *in vitro* en présence de stress oxydant et de SOD1 mutée, et ce quel que soit la mutation de SOD1 exprimée : SOD1^{A4V}, SOD1^{V31A} et SOD1^{G93C}. L'utilisation d'ARN anti-sens a ensuite permis de montrer que si l'on réduisait l'augmentation d'expression d'Uhrf2 provoquée par la combinaison stress oxydant – mutation de SOD1, l'expression du gène pro-apoptotique Siva était réduite. Siva est connu pour être régulé positivement par Uhrf2 dans la lignée d'ostéosarcome U2OS (Lu and Hallstrom, 2013). Nous avons également analysé un possible lien entre Uhrf2 et la formation d'agrégats générés par l'expression de mutants SOD1 et potentiellement toxiques pour les motoneurones. Nos analyses réalisées 24h après co-transfection (si-RNA anti-Uhrf2, plasmide SOD1^{G93C}) montraient une tendance à la réduction du nombre de cellules contenant des agrégats. Une réduction d'expression d'Uhrf2 sur 24h n'était peut-être pas suffisante pour obtenir un effet significatif sur la réduction du nombre d'agrégats. Des expériences par multi-transfection du si-RNA ou par utilisation de shRNA anti-Uhrf2 permettront d'étudier ce point plus en détail. Nous avons toutefois déjà pu observer que la protéine Uhrf2 ne co-localise pas avec les agrégats dans les cellules exprimant SOD1 mutée. Cela pourrait indiquer que, si Uhrf2 a un lien avec la formation des agrégats, son action a lieu dans les premières étapes du processus de formation des agrégats. Uhrf2 pourrait aussi avoir un rôle dans la physiopathologie de la SLA via son action sur le facteur de transcription Znf131. Uhrf2 est l'E3 SUMO ligase de Znf131. La SUMOylation de Znf131 est associée à une réduction de l'activité intracellulaire de la voie du récepteur à l'œstrogène, une voie neuroprotectrice pour les motoneurones (Oh and Chung, 2013). L'augmentation d'expression d'Uhrf2 observée dans notre modèle en

combinant stress oxydant et mutation de SOD1 pourrait donc être associée à une SUMOylation de Znf131 et par conséquent la réduction d'une action neuroprotectrice. Il serait intéressant d'étudier par immunoprécipitation le degré de SUMOylation de Znf131 dans notre modèle. L'ensemble de ces résultats font l'objet d'une publication:

“Transcriptomic analysis of a cell culture model of SOD1-related Amyotrophic Lateral Sclerosis identifies dysregulations in the ubiquitin (Ub)/Ub like pathways”. Dangoumau et al., soumis à *Neurobiology of aging*

Rôle de la SUMOylation dans la SLA associée à la mutation du gène SOD1

Comme nous l'avons précédemment indiqué l'Ubiquitinylation et la SUMOylation sont des modifications post-traductionnelles qui permettent de contrôler la stabilité, la localisation et l'activité de très nombreuses protéines intracellulaires. Plusieurs travaux ont montré l'implication des voies de l'Ub et de l'Ub-like SUMO dans diverses maladies neurodégénératives. Pour exemple l'Ubiquitinylation et la SUMOylation de la protéine huntingtin, dont le gène est impliqué dans la maladie de Huntington, réduiraient la présence d'agrégats protéiques intracellulaires (Steffan and Thompson, 2003). Dans la SLA, la formation d'agrégats intracellulaires pourrait être au cœur des processus physiopathologiques entraînant la mort des motoneurones. Dans ces agrégats on retrouve la présence de protéines comme l'ubiquitine, p62, et des protéines codées par des gènes mutés dans la SLA comme SOD1, TAR-DNA binding protein (TDP-43), Fused in sarcoma (FUS), Optineurin (OTN), Ubiquilin-2 (UBQLN2) et Ataxin-2 (ATXN2) (Table 9).

	Ub	p62	SOD1	TDP-43	FUS	OPTN	UBQLN2	ATXN2	C9ORF72
SLAs	+	+	-	+	+/-	+	+	+	-
SLA SOD1	+	+	+	-	-	+/-	+	NR	+
SLA VCP	NR	NR	NR	+	NR	NR	NR	NR	NR
SLA VAPB	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
SLA TDP-43	+	+	-	+	+	+	+	NR	-
SLA FUS	+	+	-	+/-	+	+/-	+	+	-
SLA OPTN	+	+	-	+	NR	+/-	NR	NR	NR
SLA UBQLN2	+	+	-	+	+	+	+	NR	NR
SLA ATXN2	+	+	-	NR	NR	NR	NR	+	NR
SLA C9ORF72	+	+	-	+	NR	+	+	NR	-

Table 9 : Composition moléculaire des agrégats présents dans les motoneurones de patients SLA (D'après Blokhuis, 2013). NR : non reporté, + agrégats positifs, - agrégats négatifs. SLAs : SLA sporadique ; SLA gène : SLA avec mutation de ce gène

La troisième partie du projet de thèse a donc porté sur le rôle de la SUMOylation dans l'agrégation protéique observée dans les cellules motoneuronales exprimant des formes mutées du gène SOD1. La protéine SOD1 était connue pour être SUMOylable au niveau de sa lysine 75 (Fei et al., 2006). Fait intéressant, nous avons observé que cette lysine 75 ne figure pas dans la liste des 88 acides aminés mutés dans la protéine SOD1 (taille de 153 acides aminés) dans la SLA. Nous avons également montré que les agrégats contenant les protéines SOD1 mutées contiennent aussi la protéine SUMO-1. Deux études, dont l'une parue cet été 2014, ont montré que lorsque l'on sur-exprime SUMO-1 ou SUMO-3 avec l'unique E2 de la voie de la SUMOylation Ube2i, on favorise la SUMOylation de SOD1 et induit la formation d'agrégats (Fei et al., 2006; Niikura et al., 2014). Ces études ont été réalisées dans des cellules non neuronales. Or, sachant la dégénérescence spécifique des motoneurons dans la SLA en présence de mutations d'une protéine ubiquiste comme SOD1, il nous paraît très important de se placer dans un environnement motoneuronal, ou au moins neural, pour ce genre d'étude. Nous avons donc choisi de travailler avec la lignée motoneuronale NSC-34.

La première observation intéressante que nous avons faite est que la présence de différents mutants de SOD1, SOD1^{A4V}, SOD1^{V31A} et SOD1^{G93C}, est associée à une diminution de la concentration intracellulaire en protéine SUMO-1 libre, à savoir non fixée aux protéines cibles. Nous avons observé une diminution similaire en présence de stress oxydant (1mM d'H₂O₂, 3h). Cette observation suggère qu'il ne faut pas sur-exprimer les protéines SUMO dans les modèles d'étude comme l'ont fait les deux études précédentes publiées sur le sujet. Pour tenter de comprendre l'origine de cette diminution en protéine SUMO-1 libre, nous avons étudié par RT-qPCR l'expression de plusieurs gènes de la voie de la SUMOylation dans des cellules NSC-34 exprimant SOD1^{WT} ou le mutant SOD1^{G93C}. L'expression des gènes codant SUMO-1, UBE2I et les SENPs était similaire dans les conditions SOD1^{WT} et SOD1^{G93C}. Ce résultat indique que la diminution observée de SUMO-1 libre n'était pas la conséquence d'une réduction d'expression des gènes SUMO-1 et/ou SENPs (déSUMOylation des protéines cibles), ni d'une augmentation d'expression de l'unique E2 UBE2I. Nous proposons que la diminution de protéine SUMO-1 libre observée dans les NSC-34 exprimant des mutants de SOD1 soit la conséquence d'une séquestration de SUMO-1 dans les agrégats protéiques. La séquestration dans les agrégats de nombreuses protéines d'importance pour la physiologie cellulaire pourrait en effet être un des mécanismes pathogènes clefs dans la SLA (Blokhuys et al., 2013). Il est par exemple connu que FUS et TDP-43 présents dans les agrégats interagissent et colocalisent avec de nombreuses protéines importantes pour la

physiologie des motoneurones, comme par exemple la protéine SMN1 (Survival motor neuron 1) codée par un gène facteur de risque de la SLA (Corcia et al., 2002). La séquestration de SUMO-1 dans les agrégats, et donc sa moindre disponibilité pour participer aux processus physiologiques et aux défenses cellulaires (réponses au stress oxydant par exemple), pourrait avoir un lien direct avec la neurodégénérescence des motoneurones dans la SLA. Des expériences utilisant par exemple un siRNA anti-SUMO-1 dans des NSC-34 en présence ou en absence de stress oxydant permettraient de tester cette hypothèse.

Nous avons voulu observer au plus près ces agrégats cellulaires. Pour cela nous avons utilisé la technique Correlative Light Electron Microscopy (CLEM) qui permet de superposer une image de microscopie confocale (agrégats SOD1^{mutant}-GFP positifs) à une image de microscopie électronique à transmission. Nous avons remarqué que ces agrégats ne sont pas entourés de membrane et qu'ils n'ont pas d'organisation particulière. Nous n'avons pas observé de lysosomes autour des agrégats, suggérant que la voie de dégradation par les lysosomes n'agit pas sur ces agrégats. Ces agrégats ressemblent aux structures nommées agrésomes qui se forment quand la cellule n'a plus la capacité de dégrader les protéines mal repliées (Johnston et al., 1998). Ishigaki et collaborateurs (2007) ont observé de telles structures dans des cellules de la lignée Neuro2a exprimant SOD1^{G85R}-GFP. Des études réalisées sur d'autres modèles, comme par exemple des lignées surexprimant CFTR (Cystic fibrosis conductance regulator impliqué dans la mucoviscidose), ont montré que les agrésomes s'entourent de filaments intermédiaires riches en protéine vimentine (Johnston et al., 1998; Kopito, 2000). Il serait intéressant d'étudier par immunocytochimie l'organisation du cytosquelette, et plus particulièrement la localisation des neurofilaments, dans nos NSC-34 exprimant des mutants SOD1. (Kopito, 2000)

Des travaux précédents ont montré que plusieurs protéines sont ubiquitinylées dans les agrégats dans les motoneurones de patients SLA. Devant cette observation il a été suggéré que ces protéines sont ubiquitinylées pour être dégradées, mais que comme la voie de l'Ubiquitine-protéasome ne peut pas répondre correctement aux besoins, des agrégats protéiques se forment. Le fait que l'ubiquitylation de ces protéines semblent commencer avant la formation des agrégats supporte cette idée (Giordana et al., 2010). Le fait qu'une inhibition de l'activité du protéasome soit toxique pour les motoneurones va également dans ce sens. Ainsi une inactivation spécifique de la sous-unité Rpt3 du protéasome chez la souris entraîne une mort des motoneurones spinaux et des anomalies locomotrices (Tashiro et al., 2012). Dans notre modèle *in vitro* les agrégats sont immunoréactifs pour l'Ubiquitine mais

aussi pour la protéine SUMO-1. Qu'en est-il alors de la participation de la voie de la SUMOylation dans la formation des agrégats ? Une étude précédente a montré que la SUMOylation de SOD1 portait sur sa lysine 75. Sachant que la mutation de cet acide aminé n'a pas été reportée à ce jour chez les patients SLA, nous avons tout d'abord étudié la pathogénicité potentielle d'une substitution de cette lysine 75 par une arginine. L'expression du mutant SOD1^{K75R} dans les cellules motoneuronales NSC-34 n'est ni associée à une formation d'agrégats cellulaires, ni à une réduction de la viabilité cellulaire en présence d'un stress oxydant (1mM d'H₂O₂, 3h). Devant cette observation nous avons émis l'idée d'une participation de cet acide aminé, et donc de la SUMOylation, dans la formation des agrégats associées à la mutation de SOD1. Nous avons alors généré des doubles mutants, à savoir des protéines SOD1 présentant une mutation identifiée chez des patients SLA et une substitution de la lysine K75: SOD1^{A4V-K75R}, SOD1^{V31A-K75R} et SOD1^{G93C-K75R}. De manière très intéressante nous avons observé que l'expression de ces doubles mutants dans les cellules NSC-34 n'entraîne plus la formation d'agrégats observés lors d'une expression des simples mutants (SOD1^{A4V}, SOD1^{V31A} et SOD1^{G93C}). Cette étude supporte l'idée que la voie de la SUMOylation participerait à la formation des agrégats présents dans les motoneurons de patients SLA porteurs de mutations du gène SOD1. Mon hypothèse est que la SUMOylation de la protéine SOD1^{mutée} (par SUMO-1) viendrait en compétition avec son ubiquitinylation, ce qui empêcherait la dégradation de SOD1^{mutée} via le protéasome. La protéine SOD1^{mutée} étant toujours produite par la cellule, il y aurait une accumulation de la protéine sous forme d'agrégats. Quand nous supprimons le site de SUMOylation (K75) de la protéine SOD1 mutée, l'ubiquitine pourrait se fixer et ainsi la dégradation par le protéasome de la protéine SOD1^{mutée}-ubiquitinylée serait possible. Il serait donc intéressant de co-transfecter dans des NSC-34, un vecteur d'expression de la protéine SOD1 mutée et un siRNA anti-SUMO-1. Cette expérience nous permettrait de voir si réduire la SUMOylation de la protéine SOD1 permet de réduire le nombre d'agrégats. L'ensemble de ce travail fait l'objet d'une publication soumise.

“Inhibition of mutated SOD1 aggregation in motor neuronal cells by prevention of its post-translational SUMOylation on lysine 75”. Dangoumau et al., Soumis

Conclusion

Les mécanismes physiopathologiques en cause dans la SLA comprennent entre autres une augmentation de la capacité des protéines liées à la SLA (SOD1, TDP-43, FUS, ...) à

former des agrégats cellulaires, et une participation des voies Ub et Ub-like. Mieux comprendre le fonctionnement de ces mécanismes permettra de mieux comprendre la SLA, mais aussi d'imaginer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour une pathologie sans traitement curatif à ce jour. Le traitement actuel de la SLA a pour objectif de maintenir au mieux la qualité de vie du patient. Le seul traitement médicamenteux existant aujourd'hui passe par l'effet neuroprotectif modeste du riluzole, un antagoniste du glutamate. Plusieurs études suggèrent que les thérapies par remplacement cellulaire seraient prometteuses (exemple, transplantation autologue de cellules iPSCs induites dans la voie de différenciation motoneuronale). Ces stratégies auront toutefois à faire face au fait que la SLA est une pathologie relativement diffuse dans le système nerveux central, et qu'elle ne touche pas que les motoneurones. L'importance des cellules gliales a en effet été montrée. D'autres stratégies thérapeutiques sont à l'étude comme celles ayant pour objectif de moduler l'expression de certains gènes par des approches anti-sens, comme le gène SOD1 ou encore le gène NOGO impliqué dans le transport axonal (Dupuis et al., 2002; Miller et al., 2013). La présence d'agrégats dans les motoneurones en dégénérescence suggère aussi que la voie de l'Ub/protéasome pourrait être une cible thérapeutique intéressante à étudier dans la SLA. Si l'idée d'un rôle toxique des agrégats était clairement démontrée, la voie de l'Ub/protéasome pourrait être ciblée en activant l'ubiquitinylation de protéines mutées comme SOD1 ou TDP43, ou bien plus généralement en activant le protéasome (par des activateurs endogènes ou synthétiques du protéasome). L'idée serait bien sûr de réduire la formation des agrégats dans les motoneurones. Vu l'importance de la voie de la SUMOylation pour la physiologie normale des cellules, il paraît par ailleurs difficile d'envisager une stratégie anti-sens anti-SUMO-1 dans la SLA. Toutefois cette stratégie pourrait être envisageable sur les enzymes de la voie de la SUMOylation, qui apporte une spécificité de substrat. Il faudrait pouvoir tester une stratégie thérapeutique qui empêche la SUMOylation de SOD1^{mutée} sans bloquer la voie de la SUMOylation en générale. Aujourd'hui 4 enzymes E3 ont été identifiées comme participant à l'Ubiquitinylation de SOD1^{mutée}. Il faudrait identifier une E3 de SUMOylation de SOD1^{mutée} qui pourrait alors être ciblée par un anti-sens. Cette enzyme fait peut-être partie des enzymes dont l'expression était significativement modifiée lors de l'étude microarray sur notre modèle cellulaire. Etant donné la nature multifactorielle de la SLA, il paraît toutefois probable qu'au final la stratégie thérapeutique efficace soit une stratégie précoce qui cible non pas un mécanisme pathogène mais plusieurs à la fois.

SOD1 n'est pas la seule protéine liée à la SLA. Nous avons rapporté dans notre revue sur le rôle émergent de la voie de la SUMOylation dans la SLA que d'autres protéines liées à la SLA et que l'on trouve dans les agrégats (comme TDP-43) présentent un ou des sites potentiels de SUMOylation. Le domaine d'étude des voies de la SUMOylation et de l'Ubiquitinylation dans la SLA et de leurs rôles dans l'étiologie de cette maladie reste encore largement à explorer. La poursuite des recherches est encouragée par ces premiers résultats sur le sujet qui apparaissent prometteurs.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abel, O., Powell, J.F., Andersen, P.M., and Al-Chalabi, A. (2012). ALSoD: A user-friendly online bioinformatics tool for amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Hum. Mutat.* 33, 1345–1351.
- Ackerley, S., Grierson, A.J., Banner, S., Perkinton, M.S., Brownlees, J., Byers, H.L., Ward, M., Thornhill, P., Hussain, K., Waby, J.S., et al. (2004). p38alpha stress-activated protein kinase phosphorylates neurofilaments and is associated with neurofilament pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Cell. Neurosci.* 26, 354–364.
- Almer, G., Guégan, C., Teismann, P., Naini, A., Rosoklija, G., Hays, A.P., Chen, C., and Przedborski, S. (2001). Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 49, 176–185.
- Almer, G., Teismann, P., Stevic, Z., Halaschek-Wiener, J., Deecke, L., Kostic, V., and Przedborski, S. (2002). Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. *Neurology* 58, 1277–1279.
- Andersen, P.M., and Al-Chalabi, A. (2011a). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat. Rev. Neurol.* 7, 603–615.
- Andersen, P.M., and Al-Chalabi, A. (2011b). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat. Rev. Neurol.* 7, 603–615.
- Andersen, P.M., Sims, K.B., Xin, W.W., Kiely, R., O'Neill, G., Ravits, J., Pioro, E., Harati, Y., Brower, R.D., Levine, J.S., et al. (2003). Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Amyotroph. Lateral Scler. Mot. Neuron Disord. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 4, 62–73.
- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., et al. (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 602–611.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 22, 195–201.
- Ash, P.E.A., Bieniek, K.F., Gendron, T.F., Caulfield, T., Lin, W.-L., Dejesus-Hernandez, M., van Blitterswijk, M.M., Jansen-West, K., Paul, J.W., 3rd, Rademakers, R., et al. (2013). Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 77, 639–646.
- Azuma, Y., Tan, S.H., Cavenagh, M.M., Ainsztein, A.M., Saitoh, H., and Dasso, M. (2001). Expression and regulation of the mammalian SUMO-1 E1 enzyme. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15, 1825–1827.

- Di Bacco, A., Ouyang, J., Lee, H.-Y., Catic, A., Ploegh, H., and Gill, G. (2006). The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4489–4498.
- Backx, L., Seuntjens, E., Devriendt, K., Vermeesch, J., and Van Esch, H. (2011). A balanced translocation t(6;14)(q25.3;q13.2) leading to reciprocal fusion transcripts in a patient with intellectual disability and agenesis of corpus callosum. *Cytogenet. Genome Res.* 132, 135–143.
- Banerjee, R., Mosley, R.L., Reynolds, A.D., Dhar, A., Jackson-Lewis, V., Gordon, P.H., Przedborski, S., and Gendelman, H.E. (2008). Adaptive immune neuroprotection in G93A-SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. *PloS One* 3, e2740.
- Basso, M., Massignan, T., Samengo, G., Cheroni, C., De Biasi, S., Salmona, M., Bendotti, C., and Bonetto, V. (2006). Insoluble mutant SOD1 is partly oligoubiquitinated in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J. Biol. Chem.* 281, 33325–33335.
- Bawa-Khalife, T., Cheng, J., Wang, Z., and Yeh, E.T.H. (2007). Induction of the SUMO-specific protease 1 transcription by the androgen receptor in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 282, 37341–37349.
- Beck, J., Poulter, M., Hensman, D., Rohrer, J.D., Mahoney, C.J., Adamson, G., Campbell, T., Uphill, J., Borg, A., Fratta, P., et al. (2013). Large C9orf72 hexanucleotide repeat expansions are seen in multiple neurodegenerative syndromes and are more frequent than expected in the UK population. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 345–353.
- Beers, D.R., Henkel, J.S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A.A., Siklos, L., McKercher, S.R., and Appel, S.H. (2006). Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 16021–16026.
- Benaroudj, N. (2005). [Proteasome, a cellular machinery for protein degradation]. *Médecine Sci. MS* 21, 115–116.
- Benatar, M., Kurent, J., and Moore, D.H. (2009). Treatment for familial amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD006153.
- Bendotti, C., Atzori, C., Piva, R., Tortarolo, M., Strong, M.J., DeBiasi, S., and Migheli, A. (2004). Activated p38MAPK is a novel component of the intracellular inclusions found in human amyotrophic lateral sclerosis and mutant SOD1 transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 113–119.
- Bergink, S., and Jentsch, S. (2009). Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* 458, 461–467.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J., and Lima, C.D. (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* 108, 345–356.
- Bilsland, L.G., Sahai, E., Kelly, G., Golding, M., Greensmith, L., and Schiavo, G. (2010). Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20523–20528.

- Björkblom, B., Padzik, A., Mohammad, H., Westerlund, N., Komulainen, E., Hollos, P., Parviainen, L., Papageorgiou, A.C., Iljin, K., Kallioniemi, O., et al. (2012). c-Jun N-terminal kinase phosphorylation of MARCKSL1 determines actin stability and migration in neurons and in cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 32, 3513–3526.
- Blankenship, J.W., Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A.V., Kirkpatrick, D.S., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Arnott, D., Aghajan, M., Zobel, K., et al. (2009). Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *Biochem. J.* 417, 149–160.
- Blasco, H., Corcia, P., Moreau, C., Veau, S., Fournier, C., Vourc'h, P., Emond, P., Gordon, P., Pradat, P.-F., Praline, J., et al. (2010). 1H-NMR-based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis. *PloS One* 5, e13223.
- Blasco, H., Corcia, P., Pradat, P.-F., Bocca, C., Gordon, P.H., Veyrat-Durebex, C., Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Moreau, C., Devos, D., et al. (2013). Metabolomics in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an untargeted approach via high-resolution mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 12, 3746–3754.
- Blokhuys, A.M., Groen, E.J.N., Koppers, M., van den Berg, L.H., and Pasterkamp, R.J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 125, 777–794.
- Boggio, R., Passafaro, A., and Chiocca, S. (2007). Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation. *J. Biol. Chem.* 282, 15376–15382.
- Bohren, K.M., Nadkarni, V., Song, J.H., Gabbay, K.H., and Owerbach, D. (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, 27233–27238.
- Van Bokhoven, H. (2011). Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu. Rev. Genet.* 45, 81–104.
- Bosco, D.A., Morfini, G., Karabacak, N.M., Song, Y., Gros-Louis, F., Pasinelli, P., Goolsby, H., Fontaine, B.A., Lemay, N., McKenna-Yasek, D., et al. (2010). Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat. Neurosci.* 13, 1396–1403.
- Boutahar, N., Reynaud, E., Lassabliere, F., and Borg, J. (2008). Timing differences of signaling response in neuron cultures activated by glutamate analogue or free radicals. *Brain Res.* 1191, 20–29.
- Boutahar, N., Wierinckx, A., Camdessanche, J.P., Antoine, J.-C., Reynaud, E., Lassabliere, F., Lachuer, J., and Borg, J. (2011). Differential effect of oxidative or excitotoxic stress on the transcriptional profile of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 cultured neurons. *J. Neurosci. Res.* 89, 1439–1450.
- Brooks, B.R., Miller, R.G., Swash, M., Munsat, T.L., and World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Mot. Neuron Disord. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 1, 293–299.

- Broom, W.J., Russ, C., Sapp, P.C., McKenna-Yasek, D., Hosler, B.A., Andersen, P.M., and Brown, R.H. (2006). Variants in candidate ALS modifier genes linked to Cu/Zn superoxide dismutase do not explain divergent survival phenotypes. *Neurosci. Lett.* 392, 52–57.
- Bruderer, R., Tatham, M.H., Plechanovova, A., Matic, I., Garg, A.K., and Hay, R.T. (2011). Purification and identification of endogenous polySUMO conjugates. *EMBO Rep.* 12, 142–148.
- Bruijn, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L., et al. (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18, 327–338.
- Bruijn, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W., and Cleveland, D.W. (1998). Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281, 1851–1854.
- Brzovic, P.S., and Klevit, R.E. (2006). Ubiquitin transfer from the E2 perspective: why is UbcH5 so promiscuous? *Cell Cycle Georget. Tex* 5, 2867–2873.
- Buday, L., and Tompa, P. (2010). Functional classification of scaffold proteins and related molecules. *FEBS J.* 277, 4348–4355.
- Byrne, S., Heverin, M., Elamin, M., Walsh, C., and Hardiman, O. (2014). Intermediate repeat expansion length in C9orf72 may be pathological in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 15, 148–150.
- Camu, W., Khoris, J., Moulard, B., Salachas, F., Briolotti, V., Rouleau, G.A., and Meininger, V. (1999). Genetics of familial ALS and consequences for diagnosis. French ALS Research Group. *J. Neurol. Sci.* 165 Suppl 1, S21–26.
- Dal Canto, M.C., and Gurney, M.E. (1995). Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res.* 676, 25–40.
- Dal Canto, M.C., and Gurney, M.E. (1997). A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 93, 537–550.
- Cashman, N.R., Durham, H.D., Blusztajn, J.K., Oda, K., Tabira, T., Shaw, I.T., Dahrouge, S., and Antel, J.P. (1992). Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 194, 209–221.
- Casoni, F., Basso, M., Massignan, T., Gianazza, E., Cheroni, C., Salmona, M., Bendotti, C., and Bonetto, V. (2005). Protein nitration in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis: possible multifunctional role in the pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 16295–16304.
- Al-Chalabi, A., Andersen, P.M., Chioza, B., Shaw, C., Sham, P.C., Robberecht, W., Matthijs, G., Camu, W., Marklund, S.L., Forsgren, L., et al. (1998). Recessive amyotrophic lateral

sclerosis families with the D90A SOD1 mutation share a common founder: evidence for a linked protective factor. *Hum. Mol. Genet.* 7, 2045–2050.

Al-Chalabi, A., Fang, F., Hanby, M.F., Leigh, P.N., Shaw, C.E., Ye, W., and Rijsdijk, F. (2010). An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81, 1324–1326.

Al-Chalabi, A., Jones, A., Troakes, C., King, A., Al-Sarraj, S., and van den Berg, L.H. (2012). The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 339–352.

Chang, Y., Kong, Q., Shan, X., Tian, G., Ilieva, H., Cleveland, D.W., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Wong, P.C., and Lin, C.-L.G. (2008). Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. *PloS One* 3, e2849.

Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., and Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576–1583.

Cheah, B.C., Vucic, S., Krishnan, A.V., and Kiernan, M.C. (2010). Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Med. Chem.* 17, 1942–1199.

Chen, Y., Lu, J., Pan, H., Zhang, Y., Wu, H., Xu, K., Liu, X., Jiang, Y., Bao, X., Yao, Z., et al. (2003). Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann. Neurol.* 54, 239–243.

Chen, Y.-Z., Bennett, C.L., Huynh, H.M., Blair, I.P., Puls, I., Irobi, J., Dierick, I., Abel, A., Kennerson, M.L., Rabin, B.A., et al. (2004). DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am. J. Hum. Genet.* 74, 1128–1135.

Cheroni, C., Peviani, M., Cascio, P., Debiassi, S., Monti, C., and Bendotti, C. (2005). Accumulation of human SOD1 and ubiquitinated deposits in the spinal cord of SOD1G93A mice during motor neuron disease progression correlates with a decrease of proteasome. *Neurobiol. Dis.* 18, 509–522.

Chi, L., Ke, Y., Luo, C., Gozal, D., and Liu, R. (2007). Depletion of reduced glutathione enhances motor neuron degeneration in vitro and in vivo. *Neuroscience* 144, 991–1003.

Chiò, A. (2000). Risk factors in the early diagnosis of ALS: European epidemiological studies. *Amyotroph. Lateral Scler. Mot. Neuron Disord. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 1 Suppl 1, S13–18.

Chiò, A., Borghero, G., Pugliatti, M., Ticca, A., Calvo, A., Moglia, C., Mutani, R., Brunetti, M., Ossola, I., Marrosu, M.G., et al. (2011). Large proportion of amyotrophic lateral sclerosis cases in Sardinia due to a single founder mutation of the TARDBP gene. *Arch. Neurol.* 68, 594–598.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.

- Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A.L., and Hershko, A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 1365–1368.
- Ciechanover, A., Heller, H., Katz-Etzion, R., and Hershko, A. (1981). Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 761–765.
- Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., and Hershko, A. (1982). “Covalent affinity” purification of ubiquitin-activating enzyme. *J. Biol. Chem.* 257, 2537–2542.
- Cleveland, D.W., and Rothstein, J.D. (2001). From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 806–819.
- Colasante, G., Simonet, J.C., Calogero, R., Crispi, S., Sessa, A., Cho, G., Golden, J.A., and Broccoli, V. (2013). ARX Regulates Cortical Intermediate Progenitor Cell Expansion and Upper Layer Neuron Formation Through Repression of Cdkn1c. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991.
- Corcia, P., Mayeux-Portas, V., Khoris, J., de Toffol, B., Autret, A., Müh, J.-P., Camu, W., Andres, C., and French ALS Research Group. Amyotrophic Lateral Sclerosis (2002). Abnormal SMN1 gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 51, 243–246.
- Côté, F., Collard, J.F., and Julien, J.P. (1993). Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell* 73, 35–46.
- Couillard-Després, S., Zhu, Q., Wong, P.C., Price, D.L., Cleveland, D.W., and Julien, J.P. (1998). Protective effect of neurofilament heavy gene overexpression in motor neuron disease induced by mutant superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9626–9630.
- Cozzolino, M., Ferri, A., and Carrì, M.T. (2008). Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 405–443.
- Cozzolino, M., Pesaresi, M.G., Amori, I., Crosio, C., Ferri, A., Nencini, M., and Carrì, M.T. (2009). Oligomerization of mutant SOD1 in mitochondria of motoneuronal cells drives mitochondrial damage and cell toxicity. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1547–1558.
- Crippa, V., Sau, D., Rusmini, P., Boncoraglio, A., Onesto, E., Bolzoni, E., Galbiati, M., Fontana, E., Marino, M., Carra, S., et al. (2010). The small heat shock protein B8 (HspB8) promotes autophagic removal of misfolded proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Hum. Mol. Genet.* 19, 3440–3456.
- Crow, J.P., Ye, Y.Z., Strong, M., Kirk, M., Barnes, S., and Beckman, J.S. (1997). Superoxide dismutase catalyzes nitration of tyrosines by peroxynitrite in the rod and head domains of neurofilament-L. *J. Neurochem.* 69, 1945–1953.
- Cudkovicz, M.E., and Brown, R.H. (1996). An update on superoxide dismutase 1 in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 139 Suppl, 10–15.
- Cudkovicz, M.E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.E., Chin, W., Geller, B., Hayden, D.L., Schoenfeld, D.A., Hosler, B.A., Horvitz, H.R., and Brown, R.H. (1997). Epidemiology of

mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 41, 210–221.

Dai, R.M., and Li, C.C. (2001). Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat. Cell Biol.* 3, 740–744.

Dangoumau, A., Veyrat-Durebex, C., Blasco, H., Praline, J., Corcia, P., Andres, C.R., and Vourc'h, P. (2013). Protein SUMOylation, an emerging pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Int. J. Neurosci.* 123, 366–374.

Dangoumau, A., Verschuere, A., Hammouche, E., Papon, M.-A., Blasco, H., Cherpi-Antar, C., Pouget, J., Corcia, P., Andres, C.R., and Vourc'h, P. (2014). Novel SOD1 mutation p.V31A identified with a slowly progressive form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* 35, 266.e1–4.

Daoud, H., Valdmanis, P.N., Kabashi, E., Dion, P., Dupré, N., Camu, W., Meininger, V., and Rouleau, G.A. (2009). Contribution of TARDBP mutations to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Med. Genet.* 46, 112–114.

Davies, G.C., Ettenberg, S.A., Coats, A.O., Mussante, M., Ravichandran, S., Collins, J., Nau, M.M., and Lipkowitz, S. (2004). Cbl-b interacts with ubiquitinated proteins; differential functions of the UBA domains of c-Cbl and Cbl-b. *Oncogene* 23, 7104–7115.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., et al. (2011a). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245–256.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., et al. (2011b). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245–256.

Van Den Bosch, L., Tilkin, P., Lemmens, G., and Robberecht, W. (2002). Minocycline delays disease onset and mortality in a transgenic model of ALS. *Neuroreport* 13, 1067–1070.

Deng, H.X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., and Roos, R.P. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261, 1047–1051.

Deng, H.-X., Shi, Y., Furukawa, Y., Zhai, H., Fu, R., Liu, E., Gorrie, G.H., Khan, M.S., Hung, W.-Y., Bigio, E.H., et al. (2006). Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7142–7147.

Deng, H.-X., Chen, W., Hong, S.-T., Boycott, K.M., Gorrie, G.H., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H., et al. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477, 211–215.

Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A.P. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 399–434.

- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T. (1998). SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol. Cell* 2, 233–239.
- Devos, D., Moreau, C., Lassalle, P., Perez, T., De Seze, J., Brunaud-Danel, V., Destée, A., Tonnel, A.B., and Just, N. (2004). Low levels of the vascular endothelial growth factor in CSF from early ALS patients. *Neurology* 62, 2127–2129.
- Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., et al. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218–1221.
- Dorval, V., and Fraser, P.E. (2007). SUMO on the road to neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 694–706.
- Droescher, M., Begitt, A., Marg, A., Zacharias, M., and Vinkemeier, U. (2011). Cytokine-induced paracrystals prolong the activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) and provide a model for the regulation of protein solubility by small ubiquitin-like modifier (SUMO). *J. Biol. Chem.* 286, 18731–18746.
- Duffy, L.M., Chapman, A.L., Shaw, P.J., and Grierson, A.J. (2011). Review: The role of mitochondria in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37, 336–352.
- Duncan, M.W., Kopin, I.J., Crowley, J.S., Jones, S.M., and Markey, S.P. (1989). Quantification of the putative neurotoxin 2-amino-3-(methylamino)propanoic acid (BMAA) in cycadales: analysis of the seeds of some members of the family Cycadaceae. *J. Anal. Toxicol.* 13, suppl A–G.
- Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.-L., di Scala, F., Rene, F., de Tapia, M., Pradat, P.-F., Lacomblez, L., Seihlan, D., Prinjha, R., Walsh, F.S., et al. (2002). Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 10, 358–365.
- Durham, H.D., Roy, J., Dong, L., and Figlewicz, D.A. (1997). Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 523–530.
- Eckle, V.-S., Shcheglovitov, A., Vitko, I., Dey, D., Yap, C.C., Winckler, B., and Perez-Reyes, E. (2013). Mechanisms by which a CACNA1H mutation found in epilepsy patients increase seizure susceptibility. *J. Physiol.*
- Eletr, Z.M., Huang, D.T., Duda, D.M., Schulman, B.A., and Kuhlman, B. (2005). E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 933–934.
- Eleuteri, S., Polazzi, E., and Contestabile, A. (2008). Neuroprotection of microglia conditioned media from apoptotic death induced by staurosporine and glutamate in cultures of rat cerebellar granule cells. *Neurosci. Lett.* 448, 74–78.
- Eytan, E., Ganoth, D., Armon, T., and Hershko, A. (1989). ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7751–7755.

- Ezzi, S.A., Urushitani, M., and Julien, J.-P. (2007). Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J. Neurochem.* 102, 170–178.
- Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J.P., Tiwari, S., and Weissman, A.M. (2001). The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14422–14427.
- Fei, E., Jia, N., Yan, M., Ying, Z., Sun, Q., Wang, H., Zhang, T., Ma, X., Ding, H., Yao, X., et al. (2006). SUMO-1 modification increases human SOD1 stability and aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 406–412.
- Ferrante, R.J., Browne, S.E., Shinobu, L.A., Bowling, A.C., Baik, M.J., MacGarvey, U., Kowall, N.W., Brown, R.H., and Beal, M.F. (1997). Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 69, 2064–2074.
- Flicek, P., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S., et al. (2014). Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res.* 42, D749–755.
- Foran, E., Rosenblum, L., Bogush, A.I., and Trotti, D. (2013). Sumoylation of critical proteins in amyotrophic lateral sclerosis: emerging pathways of pathogenesis. *Neuromolecular Med.* 15, 760–770.
- Fray, A.E., Ince, P.G., Banner, S.J., Milton, I.D., Usher, P.A., Cookson, M.R., and Shaw, P.J. (1998). The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2481–2489.
- Froyen, G., Corbett, M., Vandewalle, J., Jarvela, I., Lawrence, O., Meldrum, C., Bauters, M., Govaerts, K., Vandeleur, L., Van Esch, H., et al. (2008). Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 432–443.
- Fujita, Y., and Okamoto, K. (2005). Golgi apparatus of the motor neurons in patients with amyotrophic lateral sclerosis and in mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 25, 388–394.
- Furukawa, Y., Fu, R., Deng, H.-X., Siddique, T., and O'Halloran, T.V. (2006). Disulfide cross-linked protein represents a significant fraction of ALS-associated Cu, Zn-superoxide dismutase aggregates in spinal cords of model mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7148–7153.
- Furukawa, Y., Kaneko, K., Yamanaka, K., and Nukina, N. (2010). Mutation-dependent polymorphism of Cu,Zn-superoxide dismutase aggregates in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 285, 22221–22231.
- Gajdusek, D.C., and Salazar, A.M. (1982). Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonian syndromes in high incidence among the Auyu and Jakai people of West New Guinea. *Neurology* 32, 107–126.

- Gal, J., Ström, A.-L., Kilty, R., Zhang, F., and Zhu, H. (2007). p62 accumulates and enhances aggregate formation in model systems of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 282, 11068–11077.
- Galanty, Y., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Polo, S., Miller, K.M., and Jackson, S.P. (2009). Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature* 462, 935–939.
- Gareau, J.R., and Lima, C.D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 861–871.
- Garruto, R.M., Yanagihara, R., and Gajdusek, D.C. (1985). Disappearance of high-incidence amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam. *Neurology* 35, 193–198.
- Gavin, J.M., Chen, J.J., Liao, H., Rollins, N., Yang, X., Xu, Q., Ma, J., Loke, H.-K., Lingaraj, T., Brownell, J.E., et al. (2012). Mechanistic studies on activation of ubiquitin and di-ubiquitin-like protein, FAT10, by ubiquitin-like modifier activating enzyme 6, Uba6. *J. Biol. Chem.* 287, 15512–15522.
- Gendron, T.F., Belzil, V.V., Zhang, Y.-J., and Petrucelli, L. (2014). Mechanisms of toxicity in C9FTLD/ALS. *Acta Neuropathol. (Berl.)*.
- Gérus, M., Bonnard, C., Caizergues-Ferrer, M., Henry, Y., and Henras, A.K. (2010). Evolutionarily conserved function of RRP36 in early cleavages of the pre-rRNA and production of the 40S ribosomal subunit. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1130–1144.
- Gijssels, I., Van Langenhove, T., van der Zee, J., Sleegers, K., Philtjens, S., Kleinberger, G., Janssens, J., Bettens, K., Van Cauwenberghe, C., Pereson, S., et al. (2012). A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *Lancet Neurol.* 11, 54–65.
- Giordana, M.T., Piccinini, M., Grifoni, S., De Marco, G., Vercellino, M., Magistrello, M., Pellerino, A., Buccinnà, B., Lupino, E., and Rinaudo, M.T. (2010). TDP-43 redistribution is an early event in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 20, 351–360.
- Di Giorgio, F.P., Carrasco, M.A., Siao, M.C., Maniatis, T., and Eggan, K. (2007). Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat. Neurosci.* 10, 608–614.
- Gómez-del Arco, P., Koipally, J., and Georgopoulos, K. (2005). Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2688–2697.
- Gonatas, N.K., Stieber, A., Mourelatos, Z., Chen, Y., Gonatas, J.O., Appel, S.H., Hays, A.P., Hickey, W.F., and Hauw, J.J. (1992). Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Pathol.* 140, 731–737.
- Gong, L., and Yeh, E.T.H. (2006). Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J. Biol. Chem.* 281, 15869–15877.

- Greenway, M.J., Andersen, P.M., Russ, C., Ennis, S., Cashman, S., Donaghy, C., Patterson, V., Swingler, R., Kieran, D., Prehn, J., et al. (2006). ANG mutations segregate with familial and “sporadic” amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* 38, 411–413.
- Gregori, L., Poosch, M.S., Cousins, G., and Chau, V. (1990). A uniform isopeptide-linked multiubiquitin chain is sufficient to target substrate for degradation in ubiquitin-mediated proteolysis. *J. Biol. Chem.* 265, 8354–8357.
- Grönholm, J., Vanhatupa, S., Ungureanu, D., Väliäho, J., Laitinen, T., Valjakka, J., and Silvennoinen, O. (2012). Structure-function analysis indicates that sumoylation modulates DNA-binding activity of STAT1. *BMC Biochem.* 13, 20.
- Gros-Louis, F., Gaspar, C., and Rouleau, G.A. (2006). Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 956–972.
- Gross, M., Liu, B., Tan, J., French, F.S., Carey, M., and Shuai, K. (2001). Distinct effects of PIAS proteins on androgen-mediated gene activation in prostate cancer cells. *Oncogene* 20, 3880–3887.
- Grossman, A.B., Woolley-Levine, S., Bradley, W.G., and Miller, R.G. (2007). Detecting neurobehavioral changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 8, 56–61.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., and Deng, H.X. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772–1775.
- Gurney, M.E., Cutting, F.B., Zhai, P., Andrus, P.K., and Hall, E.D. (1996). Pathogenic mechanisms in familial amyotrophic lateral sclerosis due to mutation of Cu, Zn superoxide dismutase. *Pathol. Biol. (Paris)* 44, 51–56.
- Haas, A.L., Bright, P.M., and Jackson, V.E. (1988). Functional diversity among putative E2 isozymes in the mechanism of ubiquitin-histone ligation. *J. Biol. Chem.* 263, 13268–13275.
- Haeusler, A.R., Donnelly, C.J., Periz, G., Simko, E.A.J., Shaw, P.G., Kim, M.-S., Maragakis, N.J., Troncoso, J.C., Pandey, A., Sattler, R., et al. (2014). C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature* 507, 195–200.
- Hafezparast, M., Klocke, R., Ruhrberg, C., Marquardt, A., Ahmad-Annuar, A., Bowen, S., Lalli, G., Witherden, A.S., Hummerich, H., Nicholson, S., et al. (2003). Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 300, 808–812.
- Haidet-Phillips, A.M., Hester, M.E., Miranda, C.J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M.J., Foust, K.D., et al. (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat. Biotechnol.* 29, 824–828.
- Hall, E.D., Andrus, P.K., Oostveen, J.A., Fleck, T.J., and Gurney, M.E. (1998). Relationship of oxygen radical-induced lipid peroxidative damage to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *J. Neurosci. Res.* 53, 66–77.
- Hang, J., and Dasso, M. (2002). Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J. Biol. Chem.* 277, 19961–19966.

- Hannich, J.T., Lewis, A., Kroetz, M.B., Li, S.-J., Heide, H., Emili, A., and Hochstrasser, M. (2005). Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280, 4102–4110.
- Hans, F., Fiesel, F.C., Strong, J.C., Jäckel, S., Rasse, T.M., Geisler, S., Springer, W., Schulz, J.B., Voigt, A., and Kahle, P.J. (2014). UBE2E Ubiquitin-conjugating Enzymes and Ubiquitin Isopeptidase Y Regulate TDP-43 Protein Ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 289, 19164–19179.
- Hatakeyama, S., and Nakayama, K.I. (2003). U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 635–645.
- Haverkamp, L.J., Appel, V., and Appel, S.H. (1995). Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain J. Neurol.* 118 (Pt 3), 707–719.
- Hayashi, T., Seki, M., Maeda, D., Wang, W., Kawabe, Y., Seki, T., Saitoh, H., Fukagawa, T., Yagi, H., and Enomoto, T. (2002). Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp. Cell Res.* 280, 212–221.
- He, X.-H., Lin, F., and Qin, Z.-H. (2010). Current understanding on the pathogenesis of polyglutamine diseases. *Neurosci. Bull.* 26, 247–256.
- Heath, P.R., and Shaw, P.J. (2002). Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26, 438–458.
- Henkel, J.S., Engelhardt, J.I., Siklós, L., Simpson, E.P., Kim, S.H., Pan, T., Goodman, J.C., Siddique, T., Beers, D.R., and Appel, S.H. (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann. Neurol.* 55, 221–235.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., and Rose, I.A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 1783–1786.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* 258, 8206–8214.
- Hetz, C., Thielen, P., Matus, S., Nassif, M., Court, F., Kiffin, R., Martinez, G., Cuervo, A.M., Brown, R.H., and Glimcher, L.H. (2009). XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev.* 23, 2294–2306.
- Hicke, L. (2001). A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106, 527–530.
- Hietakangas, V., Ahlskog, J.K., Jakobsson, A.M., Hellesuo, M., Sahlberg, N.M., Holmberg, C.I., Mikhailov, A., Palvimo, J.J., Pirkkala, L., and Sistonen, L. (2003). Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2953–2968.
- Higgins, C.M.J., Jung, C., Ding, H., and Xu, Z. (2002). Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, RC215.

- Hirano, A. (1996). Neuropathology of ALS: an overview. *Neurology* 47, S63–66.
- Hochstrasser, M. (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107, 5–8.
- Hodges, J. (2012). Familial frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis associated with the C9ORF72 hexanucleotide repeat. *Brain J. Neurol.* 135, 652–655.
- Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., et al. (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1604–1609.
- Hoyer, J., Ekici, A.B., Endeley, S., Popp, B., Zweier, C., Wiesener, A., Wohlleber, E., Dufke, A., Rossier, E., Petsch, C., et al. (2012). Haploinsufficiency of ARID1B, a member of the SWI/SNF-a chromatin-remodeling complex, is a frequent cause of intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 565–572.
- Huang, D.T., and Schulman, B.A. (2005). Expression, purification, and characterization of the E1 for human NEDD8, the heterodimeric APPBP1-UBA3 complex. *Methods Enzymol.* 398, 9–20.
- Huang, J., Yan, J., Zhang, J., Zhu, S., Wang, Y., Shi, T., Zhu, C., Chen, C., Liu, X., Cheng, J., et al. (2012). SUMO1 modification of PTEN regulates tumorigenesis by controlling its association with the plasma membrane. *Nat. Commun.* 3, 911.
- Huang, L., Kinnucan, E., Wang, G., Beaudenon, S., Howley, P.M., Huibregtse, J.M., and Pavletich, N.P. (1999). Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science* 286, 1321–1326.
- Huang, T.T., Wuerzberger-Davis, S.M., Wu, Z.-H., and Miyamoto, S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell* 115, 565–576.
- Husnjak, K., and Dikic, I. (2012). Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 291–322.
- Ilzecka, J., and Stelmasiak, Z. (2002). Brain-derived neurotrophic factor is not altered in the serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 22, 473–474.
- Ilzecka, J., Stelmasiak, Z., and Dobosz, B. (2002). Transforming growth factor-Beta 1 (tgf-Beta 1) in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Cytokine* 20, 239–243.
- Ince, P.G., Tomkins, J., Slade, J.Y., Thatcher, N.M., and Shaw, P.J. (1998). Amyotrophic lateral sclerosis associated with genetic abnormalities in the gene encoding Cu/Zn superoxide dismutase: molecular pathology of five new cases, and comparison with previous reports and 73 sporadic cases of ALS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 895–904.
- Ince, P.G., Evans, J., Knopp, M., Forster, G., Hamdalla, H.H.M., Wharton, S.B., and Shaw, P.J. (2003). Corticospinal tract degeneration in the progressive muscular atrophy variant of ALS. *Neurology* 60, 1252–1258.

- Ishigaki, S., Niwa, J. ichi, Ando, Y., Yoshihara, T., Sawada, K. ichi, Doyu, M., Yamamoto, M., Kato, K., Yotsumoto, Y., and Sobue, G. (2002). Differentially expressed genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis spinal cords--screening by molecular indexing and subsequent cDNA microarray analysis. *FEBS Lett.* 531, 354–358.
- Ishigaki, S., Niwa, J., Yamada, S., Takahashi, M., Ito, T., Sone, J., Doyu, M., Urano, F., and Sobue, G. (2007). Dofin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiol. Dis.* 25, 331–341.
- Ishigaki, S., Hishikawa, N., Niwa, J., Iemura, S., Natsume, T., Hori, S., Kakizuka, A., Tanaka, K., and Sobue, G. (2004). Physical and functional interaction between Dofin and Valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J. Biol. Chem.* 279, 51376–51385.
- Itahana, Y., Yeh, E.T.H., and Zhang, Y. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling modulates activity and ubiquitination-dependent turnover of SUMO-specific protease 2. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4675–4689.
- Ito, H., Fujita, K., Nakamura, M., Wate, R., Kaneko, S., Sasaki, S., Yamane, K., Suzuki, N., Aoki, M., Shibata, N., et al. (2011). Optineurin is co-localized with FUS in basophilic inclusions of ALS with FUS mutation and in basophilic inclusion body disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 121, 555–557.
- Jaafari, N., Konopacki, F.A., Owen, T.F., Kantamneni, S., Rubin, P., Craig, T.J., Wilkinson, K.A., and Henley, J.M. (2013). SUMOylation is required for glycine-induced increases in AMPA receptor surface expression (ChemLTP) in hippocampal neurons. *PloS One* 8, e52345.
- Jackson, P.K. (2001). A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev.* 15, 3053–3058.
- Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I., and Rape, M. (2008). Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell* 133, 653–665.
- Johnson, E.S., and Blobel, G. (1997). Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J. Biol. Chem.* 272, 26799–26802.
- Johnson, J.O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Gibbs, J.R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., et al. (2010). Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 68, 857–864.
- Johnston, J.A., Dalton, M.J., Gurney, M.E., and Kopito, R.R. (2000). Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12571–12576.
- Johnston, J.A., Ward, C.L., and Kopito, R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* 143, 1883–1898.
- Jonsson, P.A., Ernhill, K., Andersen, P.M., Bergemalm, D., Brännström, T., Gredal, O., Nilsson, P., and Marklund, S.L. (2004). Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J. Neurol.* 127, 73–88.

- Julien, J.P., and Beaulieu, J.M. (2000). Cytoskeletal abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: beneficial or detrimental effects? *J. Neurol. Sci.* *180*, 7–14.
- Just, N., Moreau, C., Lassalle, P., Gosset, P., Perez, T., Brunaud-Danel, V., Wallaert, B., Destée, A., Defebvre, L., Tonnel, A.B., et al. (2007). High erythropoietin and low vascular endothelial growth factor levels in cerebrospinal fluid from hypoxemic ALS patients suggest an abnormal response to hypoxia. *Neuromuscul. Disord.* *NMD 17*, 169–173.
- Kabashi, E., Agar, J.N., Taylor, D.M., Minotti, S., and Durham, H.D. (2004). Focal dysfunction of the proteasome: a pathogenic factor in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* *89*, 1325–1335.
- Kabuta, T., Suzuki, Y., and Wada, K. (2006). Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant Cu,Zn-superoxide dismutase proteins by macroautophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* *281*, 30524–30533.
- Kagey, M.H., Melhuish, T.A., and Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* *113*, 127–137.
- Kahyo, T., Nishida, T., and Yasuda, H. (2001). Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol. Cell* *8*, 713–718.
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H.P., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E.T. (1998). Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J. Biol. Chem.* *273*, 11349–11353.
- Kang, J.S., Saunier, E.F., Akhurst, R.J., and Derynck, R. (2008). The type I TGF-beta receptor is covalently modified and regulated by sumoylation. *Nat. Cell Biol.* *10*, 654–664.
- Kato, S. (2008). Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *115*, 97–114.
- Kawahara, Y., and Mieda-Sato, A. (2012). TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3347–3352.
- Kawamata, T., Akiyama, H., Yamada, T., and McGeer, P.L. (1992). Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am. J. Pathol.* *140*, 691–707.
- Keller, B.A., Volkening, K., Droppelmann, C.A., Ang, L.C., Rademakers, R., and Strong, M.J. (2012). Co-aggregation of RNA binding proteins in ALS spinal motor neurons: evidence of a common pathogenic mechanism. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *124*, 733–747.
- Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M., and Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* *12*, 996–1006.
- Kiaei, M., Kipiani, K., Calingasan, N.Y., Wille, E., Chen, J., Heissig, B., Rafii, S., Lorenzl, S., and Beal, M.F. (2007). Matrix metalloproteinase-9 regulates TNF-alpha and FasL expression in neuronal, glial cells and its absence extends life in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* *205*, 74–81.

- Kieran, D., Hafezparast, M., Bohnert, S., Dick, J.R.T., Martin, J., Schiavo, G., Fisher, E.M.C., and Greensmith, L. (2005). A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *J. Cell Biol.* *169*, 561–567.
- Kim, J.H., and Baek, S.H. (2009). Emerging roles of desumoylating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* *1792*, 155–162.
- Kim, J., Cantwell, C.A., Johnson, P.F., Pfarr, C.M., and Williams, S.C. (2002). Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation. *J. Biol. Chem.* *277*, 38037–38044.
- Kim, Y.M., Jang, W.H., Quezado, M.M., Oh, Y., Chung, K.C., Junn, E., and Mouradian, M.M. (2011). Proteasome inhibition induces α -synuclein SUMOylation and aggregate formation. *J. Neurol. Sci.* *307*, 157–161.
- Kirby, J., Halligan, E., Baptista, M.J., Allen, S., Heath, P.R., Holden, H., Barber, S.C., Loynes, C.A., Wood-Allum, C.A., Lunec, J., et al. (2005). Mutant SOD1 alters the motor neuronal transcriptome: implications for familial ALS. *Brain J. Neurol.* *128*, 1686–1706.
- Kirby, J., Goodall, E.F., Smith, W., Highley, J.R., Masanzu, R., Hartley, J.A., Hibberd, R., Hollinger, H.C., Wharton, S.B., Morrison, K.E., et al. (2010). Broad clinical phenotypes associated with TAR-DNA binding protein (TARDBP) mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics* *11*, 217–225.
- Kirkin, V., and Dikic, I. (2007). Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 199–205.
- Klivenyi, P., Ferrante, R.J., Matthews, R.T., Bogdanov, M.B., Klein, A.M., Andreassen, O.A., Mueller, G., Wermer, M., Kaddurah-Daouk, R., and Beal, M.F. (1999). Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Med.* *5*, 347–350.
- Komander, D., and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 203–229.
- Kong, J., and Xu, Z. (2000). Overexpression of neurofilament subunit NF-L and NF-H extends survival of a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* *281*, 72–74.
- Kopito, R.R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* *10*, 524–530.
- Kriz, J., Nguyen, M.D., and Julien, J.-P. (2002). Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* *10*, 268–278.
- Krumova, P., and Weishaupt, J.H. (2013). Sumoylation in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 2123–2138.
- Kumar, A., Bala, L., Kalita, J., Misra, U.K., Singh, R.L., Khetrapal, C.L., and Babu, G.N. (2010). Metabolomic analysis of serum by (1) H NMR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *411*, 563–567.

- Kurland, L.T., and Mulder, D.W. (1955). Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. 2. Familial aggregations indicative of dominant inheritance. I. *Neurology* 5, 182–196.
- Kwiatkowski, T.J., Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., et al. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323, 1205–1208.
- Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P.N., Guillet, P., Powe, L., Durrleman, S., Delumeau, J.C., and Meininger, V. (1996). A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS. ALS/Riluzole Study Group-II. *Neurology* 47, S242–250.
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2010). TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 19, R46–64.
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Hutt, K.R., Vu, A.Q., Baughn, M., Huelga, S.C., Clutario, K.M., Ling, S.-C., Liang, T.Y., Mazur, C., et al. (2012). Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat. Neurosci.* 15, 1488–1497.
- Lambrechts, D., Storkebaum, E., Morimoto, M., Del-Favero, J., Desmet, F., Marklund, S.L., Wyns, S., Thijs, V., Andersson, J., van Marion, I., et al. (2003). VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat. Genet.* 34, 383–394.
- Lapenta, V., Chiurazzi, P., van der Spek, P., Pizzuti, A., Hanaoka, F., and Brahe, C. (1997). SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. *Genomics* 40, 362–366.
- Lariviere, R.C., and Julien, J.-P. (2004). Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J. Neurobiol.* 58, 131–148.
- Lee, I., and Schindelin, H. (2008). Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes. *Cell* 134, 268–278.
- Lee, M., Hyun, D.H., Halliwell, B., and Jenner, P. (2001). Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative stress and cell death induced by hydrogen peroxide, 4-hydroxynonenal or serum deprivation: potentiation of injury by ALS-related mutant superoxide dismutases and protection by Bcl-2. *J. Neurochem.* 78, 209–220.
- Leigh, P.N., Whitwell, H., Garofalo, O., Buller, J., Swash, M., Martin, J.E., Gallo, J.M., Weller, R.O., and Anderton, B.H. (1991). Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain J. Neurol.* 114 (Pt 2), 775–788.
- Levine, J.B., Kong, J., Nadler, M., and Xu, Z. (1999). Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia* 28, 215–224.
- Levine, T.P., Daniels, R.D., Gatta, A.T., Wong, L.H., and Hayes, M.J. (2013a). The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29, 499–503.

- Levine, T.P., Daniels, R.D., Gatta, A.T., Wong, L.H., and Hayes, M.J. (2013b). The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29, 499–503.
- Li, L., Zhang, X., and Le, W. (2008). Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy* 4, 290–293.
- Li, S.-J., and Hochstrasser, M. (2003). The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity. *J. Cell Biol.* 160, 1069–1081.
- Li, X.S., Trojer, P., Matsumura, T., Treisman, J.E., and Tanese, N. (2010). Mammalian SWI/SNF--a subunit BAF250/ARID1 is an E3 ubiquitin ligase that targets histone H2B. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1673–1688.
- Ligon, L.A., LaMonte, B.H., Wallace, K.E., Weber, N., Kalb, R.G., and Holzbaur, E.L.F. (2005). Mutant superoxide dismutase disrupts cytoplasmic dynein in motor neurons. *Neuroreport* 16, 533–536.
- Lim, S., Sala, C., Yoon, J., Park, S., Kuroda, S., Sheng, M., and Kim, E. (2001). Sharpin, a novel postsynaptic density protein that directly interacts with the shank family of proteins. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 385–397.
- Lin, C.L., Bristol, L.A., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Crawford, T., Clawson, L., and Rothstein, J.D. (1998). Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20, 589–602.
- Lin, X., Sun, B., Liang, M., Liang, Y.-Y., Gast, A., Hildebrand, J., Brunnicardi, F.C., Melchior, F., and Feng, X.-H. (2003). Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol. Cell* 11, 1389–1396.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., and Shuai, K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10626–10631.
- Liu, J., Lillo, C., Jonsson, P.A., Vande Velde, C., Ward, C.M., Miller, T.M., Subramaniam, J.R., Rothstein, J.D., Marklund, S., Andersen, P.M., et al. (2004). Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* 43, 5–17.
- Liu, Y., Hao, W., Dawson, A., Liu, S., and Fassbender, K. (2009). Expression of amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutant increases the neurotoxic potential of microglia via TLR2. *J. Biol. Chem.* 284, 3691–3699.
- Lois, L.M., and Lima, C.D. (2005). Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1. *EMBO J.* 24, 439–451.
- Long, J., Wang, G., He, D., and Liu, F. (2004). Repression of Smad4 transcriptional activity by SUMO modification. *Biochem. J.* 379, 23–29.
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S., and Weissman, A.M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11364–11369.

- Lu, H., and Hallstrom, T.C. (2013). The nuclear protein UHRF2 is a direct target of the transcription factor E2F1 in the induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 288, 23833–23843.
- 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. *Nat. Neurosci.* 16, 562–570.
- Mackenzie, I.R., Rademakers, R., and Neumann, M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol.* 9, 995–1007.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97–107.
- Mahajan, S.S., Thai, K.H., Chen, K., and Ziff, E. (2011). Exposure of neurons to excitotoxic levels of glutamate induces cleavage of the RNA editing enzyme, adenosine deaminase acting on RNA 2, and loss of GLUR2 editing. *Neuroscience* 189, 305–315.
- Majounie, E., Renton, A.E., Mok, K., Dopper, E.G.P., Waite, A., Rollinson, S., Chiò, A., Restagno, G., Nicolaou, N., Simon-Sanchez, J., et al. (2012). Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 11, 323–330.
- Martin, L.J. (1999). Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 459–471.
- Martin, S. (2009). [Extranuclear functions of protein sumoylation in the central nervous system]. *Médecine Sci. MS* 25, 693–698.
- Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., et al. (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465, 223–226.
- Mastrandrea, L.D., You, J., Niles, E.G., and Pickart, C.M. (1999). E2/E3-mediated assembly of lysine 29-linked polyubiquitin chains. *J. Biol. Chem.* 274, 27299–27306.
- Matic, I., Schimmel, J., Hendriks, I.A., van Santen, M.A., van de Rijke, F., van Dam, H., Gnad, F., Mann, M., and Vertegaal, A.C.O. (2010). Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Mol. Cell* 39, 641–652.
- Matsumoto, G., Stojanovic, A., Holmberg, C.I., Kim, S., and Morimoto, R.I. (2005). Structural properties and neuronal toxicity of amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu/Zn superoxide dismutase 1 aggregates. *J. Cell Biol.* 171, 75–85.
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M.F., and Manfredi, G. (2002). Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 277, 29626–29633.

- Matunis, M.J., Wu, J., and Blobel, G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* *140*, 499–509.
- McClatchey, A.I., Trofatter, J., McKenna-Yasek, D., Raskind, W., Bird, T., Pericak-Vance, M., Gilchrist, J., Arahata, K., Radosavljevic, D., and Worthen, H.G. (1992). Dinucleotide repeat polymorphisms at the SCN4A locus suggest allelic heterogeneity of hyperkalemic periodic paralysis and paramyotonia congenita. *Am. J. Hum. Genet.* *50*, 896–901.
- McCombe, P.A., and Henderson, R.D. (2010). Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gend. Med.* *7*, 557–570.
- McNamara, R.K., and Lenox, R.H. (2000). Differential regulation of primary protein kinase C substrate (MARCKS, MLP, GAP-43, RC3) mRNAs in the hippocampus during kainic acid-induced seizures and synaptic reorganization. *J. Neurosci. Res.* *62*, 416–426.
- Mendonça, D.M.F., Chimelli, L., and Martinez, A.M.B. (2006). Expression of ubiquitin and proteasome in motoneurons and astrocytes of spinal cords from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* *404*, 315–319.
- Merkley, N., and Shaw, G.S. (2004). Assignment of the (1)H, (13)C and (15)N resonances of the class II E2 conjugating enzyme, Ubc1. *J. Biomol. NMR* *30*, 369–370.
- Meyer, T., Fromm, A., Münch, C., Schwalenstöcker, B., Fray, A.E., Ince, P.G., Stamm, S., Grön, G., Ludolph, A.C., and Shaw, P.J. (1999). The RNA of the glutamate transporter EAAT2 is variably spliced in amyotrophic lateral sclerosis and normal individuals. *J. Neurol. Sci.* *170*, 45–50.
- Michelle, C., Vourc'h, P., Mignon, L., and Andres, C.R. (2009). What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *J. Mol. Evol.* *68*, 616–628.
- Migheli, A., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P., Mocellini, C., Vigliani, M.C., and Schiffer, D. (1990). Ubiquitinated filamentous inclusions in spinal cord of patients with motor neuron disease. *Neurosci. Lett.* *114*, 5–10.
- Millecamps, S., Salachas, F., Cazeneuve, C., Gordon, P., Bricka, B., Camuzat, A., Guillot-Noël, L., Russaouen, O., Bruneteau, G., Pradat, P.-F., et al. (2010). SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *J. Med. Genet.* *47*, 554–560.
- Millecamps, S., Boillée, S., Chabrol, E., Camu, W., Cazeneuve, C., Salachas, F., Pradat, P.-F., Danel-Brunaud, V., Vandenberghe, N., Corcia, P., et al. (2011). Screening of OPTN in French familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* *32*, 557.e11–13.
- Millecamps, S., Corcia, P., Cazeneuve, C., Boillée, S., Seilhean, D., Danel-Brunaud, V., Vandenberghe, N., Pradat, P.-F., Le Forestier, N., Lacomblez, L., et al. (2012). Mutations in UBQLN2 are rare in French amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* *33*, 839.e1–3.
- Miller, T.M., Pestronk, A., David, W., Rothstein, J., Simpson, E., Appel, S.H., Andres, P.L., Mahoney, K., Allred, P., Alexander, K., et al. (2013). An antisense oligonucleotide against

SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet Neurol.* 12, 435–442.

Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., and Caput, D. (2000). Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J. Biol. Chem.* 275, 36316–36323.

Mirkin, S.M. (2007). Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* 447, 932–940.

Mitchell, J., Paul, P., Chen, H.-J., Morris, A., Payling, M., Falchi, M., Habgood, J., Panoutsou, S., Winkler, S., Tisato, V., et al. (2010). Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7556–7561.

Mitsumoto, H., Santella, R.M., Liu, X., Bogdanov, M., Zipprich, J., Wu, H.-C., Mahata, J., Kilty, M., Bednarz, K., Bell, D., et al. (2008). Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 9, 177–183.

Miyazaki, K., Fujita, T., Ozaki, T., Kato, C., Kurose, Y., Sakamoto, M., Kato, S., Goto, T., Itoyama, Y., Aoki, M., et al. (2004). NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J. Biol. Chem.* 279, 11327–11335.

Mohideen, F., Capili, A.D., Bilimoria, P.M., Yamada, T., Bonni, A., and Lima, C.D. (2009). A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 945–952.

Moisse, K., and Strong, M.J. (2006). Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 1083–1093.

Moreau, C., Devos, D., Gosset, P., Brunaud-Danel, V., Tonnel, A.-B., Lassalle, P., Defebvre, L., and Destée, A. (2010). [Mechanisms of deregulated response to hypoxia in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a clinical study]. *Rev. Neurol. (Paris)* 166, 279–283.

Mori, K., Arzberger, T., Grässer, F.A., Gijssels, I., May, S., Rentzsch, K., Weng, S.-M., Schludi, M.H., van der Zee, J., Cruts, M., et al. (2013). Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 126, 881–893.

Morimoto, N., Nagai, M., Ohta, Y., Miyazaki, K., Kurata, T., Morimoto, M., Murakami, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Kamiya, T., et al. (2007). Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 1167, 112–117.

Morita, M., Al-Chalabi, A., Andersen, P.M., Hosler, B., Sapp, P., Englund, E., Mitchell, J.E., Habgood, J.J., de Belleruche, J., Xi, J., et al. (2006). A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia. *Neurology* 66, 839–844.

Morlando, M., Dini Modigliani, S., Torrelli, G., Rosa, A., Di Carlo, V., Caffarelli, E., and Bozzoni, I. (2012). FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment. *EMBO J.* 31, 4502–4510.

- Morris, J.R. (2010). SUMO in the mammalian response to DNA damage. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 92–97.
- Morris, J.R., Boutell, C., Keppler, M., Densham, R., Weekes, D., Alamshah, A., Butler, L., Galanty, Y., Pagon, L., Kiuchi, T., et al. (2009). The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* 462, 886–890.
- Mossessova, E., and Lima, C.D. (2000). Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol. Cell* 5, 865–876.
- Moulard, B., Salachas, F., Chassande, B., Briolotti, V., Meininger, V., Malafosse, A., and Camu, W. (1998). Association between centromeric deletions of the SMN gene and sporadic adult-onset lower motor neuron disease. *Ann. Neurol.* 43, 640–644.
- Mukherjee, S., Thomas, M., Dadgar, N., Lieberman, A.P., and Iñiguez-Lluhí, J.A. (2009). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of the androgen receptor attenuates polyglutamine-mediated aggregation. *J. Biol. Chem.* 284, 21296–21306.
- Mukhopadhyay, D., and Riezman, H. (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315, 201–205.
- Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y., and Dejean, A. (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* 275, 13321–13329.
- Münch, C., Sedlmeier, R., Meyer, T., Homberg, V., Sperfeld, A.D., Kurt, A., Prudlo, J., Peraus, G., Hanemann, C.O., Stumm, G., et al. (2004). Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology* 63, 724–726.
- Murphy, J., Henry, R., and Lomen-Hoerth, C. (2007). Establishing subtypes of the continuum of frontal lobe impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* 64, 330–334.
- Nagai, M., Aoki, M., Miyoshi, I., Kato, M., Pasinelli, P., Kasai, N., Brown, R.H., and Itoyama, Y. (2001). Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 9246–9254.
- Nagai, M., Re, D.B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T.M., Wichterle, H., and Przedborski, S. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat. Neurosci.* 10, 615–622.
- Nagata, T., Nagano, I., Shiote, M., Narai, H., Murakami, T., Hayashi, T., Shoji, M., and Abe, K. (2007). Elevation of MCP-1 and MCP-1/VEGF ratio in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol. Res.* 29, 772–776.
- Nakamura, S., Kawamoto, Y., Nakano, S., Ikemoto, A., Akiguchi, I., and Kimura, J. (1997). Cyclin-dependent kinase 5 in Lewy body-like inclusions in anterior horn cells of a patient with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 48, 267–270.
- Nakamura, Y., Shi, X., Numata, T., Mori, Y., Inoue, R., Lossin, C., Baram, T.Z., and Hirose, S. (2013). Novel HCN2 Mutation Contributes to Febrile Seizures by Shifting the Channel's Kinetics in a Temperature-Dependent Manner. *PloS One* 8, e80376.

- Nelson, D.L., Orr, H.T., and Warren, S.T. (2013). The unstable repeats--three evolving faces of neurological disease. *Neuron* 77, 825–843.
- Neumann, J., Sauerzweig, S., Röncke, R., Gunzer, F., Dinkel, K., Ullrich, O., Gunzer, M., and Reymann, K.G. (2008). Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5965–5975.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., et al. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133.
- Neumann, M., Rademakers, R., Roeber, S., Baker, M., Kretzschmar, H.A., and Mackenzie, I.R.A. (2009). A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain J. Neurol.* 132, 2922–2931.
- Niikura, T., Kita, Y., and Abe, Y. (2014). SUMO3 Modification Accelerates the Aggregation of ALS-Linked SOD1 Mutants. *PloS One* 9, e101080.
- Nishida, T., Tanaka, H., and Yasuda, H. (2000). A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. *Eur. J. Biochem. FEBS* 267, 6423–6427.
- Nishimura, A.L., Mitne-Neto, M., Silva, H.C.A., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J.R.M., Gillingwater, T., Webb, J., et al. (2004). A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 822–831.
- Niwa, J., Yamada, S., Ishigaki, S., Sone, J., Takahashi, M., Katsuno, M., Tanaka, F., Doyu, M., and Sobue, G. (2007). Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1. *J. Biol. Chem.* 282, 28087–28095.
- Niwa, J.-I., Ishigaki, S., Hishikawa, N., Yamamoto, M., Doyu, M., Murata, S., Tanaka, K., Taniguchi, N., and Sobue, G. (2002). Dofin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 277, 36793–36798.
- Novoselov, S.S., Mustill, W.J., Gray, A.L., Dick, J.R., Kanuga, N., Kalmar, B., Greensmith, L., and Cheetham, M.E. (2013). Molecular chaperone mediated late-stage neuroprotection in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PloS One* 8, e73944.
- O'Rourke, J.G., Gareau, J.R., Ochaba, J., Song, W., Raskó, T., Reverter, D., Lee, J., Monteys, A.M., Pallos, J., Mee, L., et al. (2013). SUMO-2 and PIAS1 modulate insoluble mutant huntingtin protein accumulation. *Cell Rep.* 4, 362–375.
- Ogunjimi, A.A., Wiesner, S., Briant, D.J., Varelas, X., Sicheri, F., Forman-Kay, J., and Wrana, J.L. (2010). The ubiquitin binding region of the Smurf HECT domain facilitates polyubiquitylation and binding of ubiquitylated substrates. *J. Biol. Chem.* 285, 6308–6315.
- Oh, Y., and Chung, K.C. (2013). UHRF2, a ubiquitin E3 ligase, acts as a small ubiquitin-like modifier E3 ligase for zinc finger protein 131. *J. Biol. Chem.* 288, 9102–9111.

- Okamoto, K. (2008). [Early symptoms of frontotemporal lobar degeneration]. *Rinshō Shinkeigaku Clin. Neurol.* 48, 999–1001.
- Olsen, S.K., Capili, A.D., Lu, X., Tan, D.S., and Lima, C.D. (2010). Active site remodelling accompanies thioester bond formation in the SUMO E1. *Nature* 463, 906–912.
- Ono, S., Hu, J., Shimizu, N., Imai, T., and Nakagawa, H. (2001). Increased interleukin-6 of skin and serum in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 187, 27–34.
- Paubel, A., Violette, J., Amy, M., Praline, J., Meininger, V., Camu, W., Corcia, P., Andres, C.R., Vourc'h, P., and French Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Study Group (2008). Mutations of the ANG gene in French patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* 65, 1333–1336.
- Pédélecq, J.-D., Piltch, E., Liong, E.C., Berendzen, J., Kim, C.-Y., Rho, B.-S., Park, M.S., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2002). Engineering soluble proteins for structural genomics. *Nat. Biotechnol.* 20, 927–932.
- Pedersen, W.A., Fu, W., Keller, J.N., Markesbery, W.R., Appel, S., Smith, R.G., Kasarskis, E., and Mattson, M.P. (1998). Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 44, 819–824.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S.P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* 21, 921–926.
- Petroski, M.D., and Deshaies, R.J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 9–20.
- Piao, Y.-S., Wakabayashi, K., Kakita, A., Yamada, M., Hayashi, S., Morita, T., Ikuta, F., Oyanagi, K., and Takahashi, H. (2003). Neuropathology with clinical correlations of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: 102 autopsy cases examined between 1962 and 2000. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 13, 10–22.
- Picard, N., Caron, V., Bilodeau, S., Sanchez, M., Mascle, X., Aubry, M., and Tremblay, A. (2012). Identification of estrogen receptor β as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3 β . *Mol. Cell. Biol.* 32, 2709–2721.
- Pichler, A., and Melchior, F. (2002). Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic Cph. Den.* 3, 381–387.
- Pichler, A., Knipscheer, P., Oberhofer, E., van Dijk, W.J., Körner, R., Olsen, J.V., Jentsch, S., Melchior, F., and Sixma, T.K. (2005). SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 264–269.
- Polazzi, E., Gianni, T., and Contestabile, A. (2001). Microglial cells protect cerebellar granule neurons from apoptosis: evidence for reciprocal signaling. *Glia* 36, 271–280.
- Poloni, M., Facchetti, D., Mai, R., Micheli, A., Agnoletti, L., Francolini, G., Mora, G., Camana, C., Mazzini, L., and Bachetti, T. (2000). Circulating levels of tumour necrosis

factor- α and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 287, 211–214.

Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (2000). Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14145–14150.

Ptáček, L.J., George, A.L., Jr, Griggs, R.C., Tawil, R., Kallen, R.G., Barchi, R.L., Robertson, M., and Leppert, M.F. (1991). Identification of a mutation in the gene causing hyperkalemic periodic paralysis. *Cell* 67, 1021–1027.

Raibon, E., Todd, L.M., and Möller, T. (2008). Glial cells in ALS: the missing link? *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 19, 441–459, vii–viii.

Rakhit, R., Robertson, J., Vande Velde, C., Horne, P., Ruth, D.M., Griffin, J., Cleveland, D.W., Cashman, N.R., and Chakrabartty, A. (2007). An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. *Nat. Med.* 13, 754–759.

Rallabhandi, P., Hashimoto, K., Mo, Y.-Y., Beck, W.T., Moitra, P.K., and D'Arpa, P. (2002). Sumoylation of topoisomerase I is involved in its partitioning between nucleoli and nucleoplasm and its clearing from nucleoli in response to camptothecin. *J. Biol. Chem.* 277, 40020–40026.

Rao, M.V., and Nixon, R.A. (2003). Defective neurofilament transport in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis: a review. *Neurochem. Res.* 28, 1041–1047.

Rao, S.D., and Weiss, J.H. (2004). Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci.* 27, 17–23.

Raoul, C., Estévez, A.G., Nishimune, H., Cleveland, D.W., deLapeyrière, O., Henderson, C.E., Haase, G., and Pettmann, B. (2002). Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35, 1067–1083.

Ratti, A., Corrado, L., Castellotti, B., Del Bo, R., Fogh, I., Cereda, C., Tiloca, C., D'Ascenzo, C., Bagarotti, A., Pensato, V., et al. (2012). C9ORF72 repeat expansion in a large Italian ALS cohort: evidence of a founder effect. *Neurobiol. Aging* 33, 2528.e7–14.

Ravid, T., and Hochstrasser, M. (2007). Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue. *Nat. Cell Biol.* 9, 422–427.

Ray, S.S., Nowak, R.J., Brown, R.H., Jr, and Lansbury, P.T., Jr (2005). Small-molecule-mediated stabilization of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase mutants against unfolding and aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3639–3644.

Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., et al. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 13, 43–47.

Renoux, A.J., and Todd, P.K. (2012). Neurodegeneration the RNA way. *Prog. Neurobiol.* 97, 173–189.

- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., et al. (2011a). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72, 257–268.
- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., et al. (2011b). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72, 257–268.
- Renton, A.E., Chiò, A., and Traynor, B.J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* 17, 17–23.
- Reverter, D., and Lima, C.D. (2005). Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature* 435, 687–692.
- Reyes-Turcu, F.E., and Wilkinson, K.D. (2009). Polyubiquitin binding and disassembly by deubiquitinating enzymes. *Chem. Rev.* 109, 1495–1508.
- Richet, E., Pooler, A.M., Rodriguez, T., Novoselov, S.S., Schmidtke, G., Groettrup, M., Hanger, D.P., Cheetham, M.E., and van der Spuy, J. (2012). NUB1 modulation of GSK3 β reduces tau aggregation. *Hum. Mol. Genet.* 21, 5254–5267.
- Robertson, J., Beaulieu, J.M., Doroudchi, M.M., Durham, H.D., Julien, J.P., and Mushynski, W.E. (2001). Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α . *J. Cell Biol.* 155, 217–226.
- Rodriguez, J.A., Valentine, J.S., Eggers, D.K., Roe, J.A., Tiwari, A., Brown, R.H., and Hayward, L.J. (2002). Familial amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations decrease the thermal stability of distinctly metallated species of human copper/zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 277, 15932–15937.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., and Deng, H.X. (1993a). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., and Deng, H.X. (1993b). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
- Rothstein, J.D., Martin, L.J., and Kuncl, R.W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 326, 1464–1468.
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., and Kuncl, R.W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 38, 73–84.
- Rotin, D., and Kumar, S. (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 398–409.

- Rouleau, G.A., Clark, A.W., Rooke, K., Pramatarova, A., Krizus, A., Suchowersky, O., Julien, J.P., and Figlewicz, D. (1996). SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* *39*, 128–131.
- Rowland, L.P., and Shneider, N.A. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *344*, 1688–1700.
- Rytinki, M.M., Kaikkonen, S., Pehkonen, P., Jääskeläinen, T., and Palvimo, J.J. (2009). PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 3029–3041.
- Al-Saif, A., Al-Mohanna, F., and Bohlega, S. (2011). A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* *70*, 913–919.
- Saitoh, H., Sparrow, D.B., Shiomi, T., Pu, R.T., Nishimoto, T., Mohun, T.J., and Dasso, M. (1998). Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2. *Curr. Biol. CB* *8*, 121–124.
- Sakamoto, H., Akamatsu, M., Hirano, M., Saigoh, K., Ueno, S., Isono, C., Kusunoki, S., and Nakamura, Y. (2014). Multiple system involvement in a Japanese patient with a V31A mutation in the SOD1 gene. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* *15*, 312–314.
- Santen, G.W.E., Aten, E., Sun, Y., Almomani, R., Gilissen, C., Nielsen, M., Kant, S.G., Snoeck, I.N., Peeters, E.A.J., Hilhorst-Hofstee, Y., et al. (2012). Mutations in SWI/SNF chromatin remodeling complex gene ARID1B cause Coffin-Siris syndrome. *Nat. Genet.* *44*, 379–380.
- Sargsyan, S.A., Monk, P.N., and Shaw, P.J. (2005). Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* *51*, 241–253.
- Sargsyan, S.A., Blackburn, D.J., Barber, S.C., Monk, P.N., and Shaw, P.J. (2009). Mutant SOD1 G93A microglia have an inflammatory phenotype and elevated production of MCP-1. *Neuroreport* *20*, 1450–1455.
- Sasaki, S., and Maruyama, S. (1994). Immunocytochemical and ultrastructural studies of the motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *87*, 578–585.
- Sasaki, S., Warita, H., Abe, K., and Iwata, M. (2005). Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *110*, 48–56.
- Sau, D., De Biasi, S., Vitellaro-Zuccarello, L., Riso, P., Guarnieri, S., Porrini, M., Simeoni, S., Crippa, V., Onesto, E., Palazzolo, I., et al. (2007). Mutation of SOD1 in ALS: a gain of a loss of function. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 1604–1618.
- Scheffner, M., Nuber, U., and Huibregtse, J.M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* *373*, 81–83.
- Schiffer, D., and Fiano, V. (2004). Astrogliosis in ALS: possible interpretations according to pathogenetic hypotheses. *Amyotroph. Lateral Scler. Mot. Neuron Disord. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* *5*, 22–25.

- Schiffer, D., Cordera, S., Cavalla, P., and Migheli, A. (1996). Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 139 Suppl, 27–33.
- Schmidt, D., and Müller, S. (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2872–2877.
- Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N., Elsasser, S., Finley, D., Dikic, I., Walters, K.J., and Groll, M. (2008). Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature* 453, 548–552.
- Schulman, B.A., and Harper, J.W. (2009). Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 319–331.
- Scott, D.C., Monda, J.K., Bennett, E.J., Harper, J.W., and Schulman, B.A. (2011). N-terminal acetylation acts as an avidity enhancer within an interconnected multiprotein complex. *Science* 334, 674–678.
- Seyfried, N.T., Gozal, Y.M., Dammer, E.B., Xia, Q., Duong, D.M., Cheng, D., Lah, J.J., Levey, A.I., and Peng, J. (2010). Multiplex SILAC analysis of a cellular TDP-43 proteinopathy model reveals protein inclusions associated with SUMOylation and diverse polyubiquitin chains. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 9, 705–718.
- Shambharkar, P.B., Blonska, M., Pappu, B.P., Li, H., You, Y., Sakurai, H., Darnay, B.G., Hara, H., Penninger, J., and Lin, X. (2007). Phosphorylation and ubiquitination of the IkappaB kinase complex by two distinct signaling pathways. *EMBO J.* 26, 1794–1805.
- Shaw, P.J. (2005). Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76, 1046–1057.
- Shaw, C.E., Enayat, Z.E., Powell, J.F., Anderson, V.E., Radunovic, A., al-Sarraj, S., and Leigh, P.N. (1997). Familial amyotrophic lateral sclerosis. Molecular pathology of a patient with a SOD1 mutation. *Neurology* 49, 1612–1616.
- Shaw, P.J., Forrest, V., Ince, P.G., Richardson, J.P., and Wastell, H.J. (1995). CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegener. J. Neurodegener. Disord. Neuroprotection Neuroregeneration* 4, 209–216.
- Shiina, Y., Arima, K., Tabunoki, H., and Satoh, J. (2010). TDP-43 dimerizes in human cells in culture. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 641–652.
- Siddique, T., Pericak-Vance, M.A., Brooks, B.R., Roos, R.P., Hung, W.Y., Antel, J.P., Munsat, T.L., Phillips, K., Warner, K., and Speer, M. (1989). Linkage analysis in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 39, 919–925.
- Simpson, E.P., Henry, Y.K., Henkel, J.S., Smith, R.G., and Appel, S.H. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* 62, 1758–1765.
- Smith, B.N., Newhouse, S., Shatunov, A., Vance, C., Topp, S., Johnson, L., Miller, J., Lee, Y., Troakes, C., Scott, K.M., et al. (2013). The C9ORF72 expansion mutation is a common

cause of ALS+/-FTD in Europe and has a single founder. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 21, 102–108.

Son, M., Cloyd, C.D., Rothstein, J.D., Rajendran, B., and Elliott, J.L. (2003). Aggregate formation in Cu,Zn superoxide dismutase-related proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 14331–14336.

Sone, J., Niwa, J., Kawai, K., Ishigaki, S., Yamada, S., Adachi, H., Katsuno, M., Tanaka, F., Doyu, M., and Sobue, G. (2010). Dofin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 88, 123–135.

Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G., and Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14373–14378.

Song, J., Zhang, Z., Hu, W., and Chen, Y. (2005). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation. *J. Biol. Chem.* 280, 40122–40129.

Soo, K.Y., Atkin, J.D., Horne, M.K., and Nagley, P. (2009). Recruitment of mitochondria into apoptotic signaling correlates with the presence of inclusions formed by amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutations. *J. Neurochem.* 108, 578–590.

Spencer, P.S. (1987). Guam ALS/parkinsonism-dementia: a long-latency neurotoxic disorder caused by “slow toxin(s)” in food? *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* 14, 347–357.

Spreux-Varoquaux, O., Bensimon, G., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P.F., Le Forestier, N., Marouan, A., Dib, M., and Meininger, V. (2002). Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J. Neurol. Sci.* 193, 73–78.

Steffan, J.S., and Thompson, L.M. (2003). Targeting aggregation in the development of therapeutics for the treatment of Huntington’s disease and other polyglutamine repeat diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* 7, 201–213.

Stehmeier, P., and Muller, S. (2009). Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling. *Mol. Cell* 33, 400–409.

Stephenson, J.R., Paavola, K.J., Schaefer, S.A., Kaur, B., Van Meir, E.G., and Hall, R.A. (2013). Brain-specific angiogenesis inhibitor-1 signaling, regulation, and enrichment in the postsynaptic density. *J. Biol. Chem.* 288, 22248–22256.

Sternsdorf, T., Puccetti, E., Jensen, K., Hoelzer, D., Will, H., Ottmann, O.G., and Ruthardt, M. (1999). PIC-1/SUMO-1-modified PML-retinoic acid receptor alpha mediates arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5170–5178.

Stieber, A., Gonatas, J.O., and Gonatas, N.K. (2000). Aggregation of ubiquitin and a mutant ALS-linked SOD1 protein correlate with disease progression and fragmentation of the Golgi apparatus. *J. Neurol. Sci.* 173, 53–62.

Streit, W.J. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40, 133–139.

- Tang, B., Sander, T., Craven, K.B., Hempelmann, A., and Escayg, A. (2008). Mutation analysis of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels HCN1 and HCN2 in idiopathic generalized epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 29, 59–70.
- Tanji, K., Tanaka, T., Mori, F., Kito, K., Takahashi, H., Wakabayashi, K., and Kamitani, T. (2006). NUB1 suppresses the formation of Lewy body-like inclusions by proteasomal degradation of synphilin-1. *Am. J. Pathol.* 169, 553–565.
- Tankersley, C.G., Haenggeli, C., and Rothstein, J.D. (2007). Respiratory impairment in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 102, 926–932.
- Tashiro, Y., Urushitani, M., Inoue, H., Koike, M., Uchiyama, Y., Komatsu, M., Tanaka, K., Yamazaki, M., Abe, M., Misawa, H., et al. (2012). Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 287, 42984–42994.
- Tateishi, T., Hokonohara, T., Yamasaki, R., Miura, S., Kikuchi, H., Iwaki, A., Tashiro, H., Furuya, H., Nagara, Y., Ohyagi, Y., et al. (2010). Multiple system degeneration with basophilic inclusions in Japanese ALS patients with FUS mutation. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 355–364.
- Taylor, J.P., Hardy, J., and Fischbeck, K.H. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296, 1991–1995.
- Tolbert, B.S., Tajc, S.G., Webb, H., Snyder, J., Nielsen, J.E., Miller, B.L., and Basavappa, R. (2005). The active site cysteine of ubiquitin-conjugating enzymes has a significantly elevated pKa: functional implications. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 16385–16391.
- Troost, D., Van den Oord, J.J., and Vianney de Jong, J.M. (1990). Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 16, 401–410.
- Tsai, C.-P., Soong, B.-W., Lin, K.-P., Tu, P.-H., Lin, J.-L., and Lee, Y.-C. (2011). FUS, TARDBP, and SOD1 mutations in a Taiwanese cohort with familial ALS. *Neurobiol. Aging* 32, 553.e13–21.
- Tsang, C.K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., and Zheng, X.F.S. (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat. Commun.* 5, 3446.
- Türk, M., Haaker, G., Winter, L., Just, W., Nickel, F.T., Linker, R.A., Chevessier, F., and Schröder, R. (2014). C9ORF72-ALS: p62- and ubiquitin-aggregation pathology in skeletal muscle. *Muscle Nerve*.
- Ullmann, R., Chien, C.D., Avantaggiati, M.L., and Muller, S. (2012). An acetylation switch regulates SUMO-dependent protein interaction networks. *Mol. Cell* 46, 759–770.
- Um, J.W., and Chung, K.C. (2006). Functional modulation of parkin through physical interaction with SUMO-1. *J. Neurosci. Res.* 84, 1543–1554.

- Urushitani, M., Shimohama, S., Kihara, T., Sawada, H., Akaike, A., Ibi, M., Inoue, R., Kitamura, Y., Taniguchi, T., and Kimura, J. (1998). Mechanism of selective motor neuronal death after exposure of spinal cord to glutamate: involvement of glutamate-induced nitric oxide in motor neuron toxicity and nonmotor neuron protection. *Ann. Neurol.* 44, 796–807.
- Urushitani, M., Kurisu, J., Tsukita, K., and Takahashi, R. (2002). Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 83, 1030–1042.
- Urushitani, M., Kurisu, J., Tateno, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-I., Kato, S., and Takahashi, R. (2004). CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70. *J. Neurochem.* 90, 231–244.
- Valentine, J.S., Doucette, P.A., and Zittin Potter, S. (2005). Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 563–593.
- Vance, C., Al-Chalabi, A., Ruddy, D., Smith, B.N., Hu, X., Sreedharan, J., Siddique, T., Schelhaas, H.J., Kusters, B., Troost, D., et al. (2006). Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain J. Neurol.* 129, 868–876.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., et al. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323, 1208–1211.
- Vanderweyde, T., Yu, H., Varnum, M., Liu-Yesucevitz, L., Citro, A., Ikezu, T., Duff, K., and Wolozin, B. (2012). Contrasting pathology of the stress granule proteins TIA-1 and G3BP in tauopathies. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 8270–8283.
- Vandewalle, J., Langen, M., Zschaetzsch, M., Nijhof, B., Kramer, J.M., Brems, H., Bauters, M., Lauwers, E., Srahna, M., Marynen, P., et al. (2013). Ubiquitin ligase HUWE1 regulates axon branching through the Wnt/ β -catenin pathway in a *Drosophila* model for intellectual disability. *PloS One* 8, e81791.
- Veglianese, P., Lo Coco, D., Bao Cutrona, M., Magnoni, R., Pennacchini, D., Pozzi, B., Gowing, G., Julien, J.P., Tortarolo, M., and Bendotti, C. (2006). Activation of the p38MAPK cascade is associated with upregulation of TNF alpha receptors in the spinal motor neurons of mouse models of familial ALS. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 218–231.
- Veltema, A.N., Roos, R.A., and Bruyn, G.W. (1990). Autosomal dominant adult amyotrophic lateral sclerosis. A six generation Dutch family. *J. Neurol. Sci.* 97, 93–115.
- Vertegaal, A.C.O., Andersen, J.S., Ogg, S.C., Hay, R.T., Mann, M., and Lamond, A.I. (2006). Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 5, 2298–2310.
- Veyrat-Durebex, C., Corcia, P., Dangoumau, A., Laumonnier, F., Piver, E., Gordon, P.H., Andres, C.R., Vourc'h, P., and Blasco, H. (2014). Advances in cellular models to explore the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurobiol.* 49, 966–983.
- De Vos, K.J., Chapman, A.L., Tennant, M.E., Manser, C., Tudor, E.L., Lau, K.-F., Brownlees, J., Ackerley, S., Shaw, P.J., McLoughlin, D.M., et al. (2007). Familial

amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2720–2728.

Walden, H., Podgorski, M.S., Huang, D.T., Miller, D.W., Howard, R.J., Minor, D.L., Holton, J.M., and Schulman, B.A. (2003). The structure of the APPBP1-UBA3-NEDD8-ATP complex reveals the basis for selective ubiquitin-like protein activation by an E1. *Mol. Cell* 12, 1427–1437.

Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J., and Terwilliger, T.C. (1999). Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 17, 691–695.

Wang, J., Xu, G., Gonzales, V., Coonfield, M., Fromholt, D., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Borchelt, D.R. (2002). Fibrillar inclusions and motor neuron degeneration in transgenic mice expressing superoxide dismutase 1 with a disrupted copper-binding site. *Neurobiol. Dis.* 10, 128–138.

Watanabe, M., Dykes-Hoberg, M., Culotta, V.C., Price, D.L., Wong, P.C., and Rothstein, J.D. (2001). Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol. Dis.* 8, 933–941.

Wenzel, D.M., Stoll, K.E., and Klevit, R.E. (2011). E2s: structurally economical and functionally replete. *Biochem. J.* 433, 31–42.

Werner, A., Flotho, A., and Melchior, F. (2012). The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 complex is a multisubunit SUMO E3 ligase. *Mol. Cell* 46, 287–298.

Weydt, P., Yuen, E.C., Ransom, B.R., and Möller, T. (2004). Increased cytotoxic potential of microglia from ALS-transgenic mice. *Glia* 48, 179–182.

Wiedau-Pazos, M., Goto, J.J., Rabizadeh, S., Gralla, E.B., Roe, J.A., Lee, M.K., Valentine, J.S., and Bredesen, D.E. (1996). Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 271, 515–518.

Wiedemann, F.R., Manfredi, G., Mawrin, C., Beal, M.F., and Schon, E.A. (2002). Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J. Neurochem.* 80, 616–625.

Van Wijk, S.J.L., and Timmers, H.T.M. (2010). The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 981–993.

Williams, A.H., Valdez, G., Moresi, V., Qi, X., McAnally, J., Elliott, J.L., Bassel-Duby, R., Sanes, J.R., and Olson, E.N. (2009). MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* 326, 1549–1554.

Williamson, T.L., and Cleveland, D.W. (1999). Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat. Neurosci.* 2, 50–56.

Williamson, T.L., Bruijn, L.I., Zhu, Q., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Julien, J.P., and Cleveland, D.W. (1998). Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9631–9636.

- Williamson, T.L., Corson, L.B., Huang, L., Burlingame, A., Liu, J., Bruijn, L.I., and Cleveland, D.W. (2000). Toxicity of ALS-linked SOD1 mutants. *Science* 288, 399.
- Winn, P.J., Religa, T.L., Battey, J.N.D., Banerjee, A., and Wade, R.C. (2004). Determinants of functionality in the ubiquitin conjugating enzyme family. *Struct. Lond. Engl.* 1993 12, 1563–1574.
- Wong, P.C., and Borchelt, D.R. (1995). Motor neuron disease caused by mutations in superoxide dismutase 1. *Curr. Opin. Neurol.* 8, 294–301.
- Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., and Price, D.L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14, 1105–1116.
- Wood, J.D., Beaujeux, T.P., and Shaw, P.J. (2003). Protein aggregation in motor neurone disorders. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 29, 529–545.
- Wu, C., Orozco, C., Boyer, J., Leglise, M., Goodale, J., Batalov, S., Hodge, C.L., Haase, J., Janes, J., Huss, J.W., 3rd, et al. (2009). BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol.* 10, R130.
- Xiao, Q., Zhao, W., Beers, D.R., Yen, A.A., Xie, W., Henkel, J.S., and Appel, S.H. (2007). Mutant SOD1(G93A) microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *J. Neurochem.* 102, 2008–2019.
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J. (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* 137, 133–145.
- Xu, R., Wu, C., Zhang, X., Zhang, Q., Yang, Y., Yi, J., Yang, R., and Tao, Y. (2011). Linking hypoxic and oxidative insults to cell death mechanisms in models of ALS. *Brain Res.* 1372, 133–144.
- Xu, Z., Cork, L.C., Griffin, J.W., and Cleveland, D.W. (1993). Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* 73, 23–33.
- Yagi, H., Ishimoto, K., Hiromoto, T., Fujita, H., Mizushima, T., Uekusa, Y., Yagi-Utsumi, M., Kurimoto, E., Noda, M., Uchiyama, S., et al. (2012). A non-canonical UBA-UBL interaction forms the linear-ubiquitin-chain assembly complex. *EMBO Rep.* 13, 462–468.
- Yamaguchi, T., Sharma, P., Athanasiou, M., Kumar, A., Yamada, S., and Kuehn, M.R. (2005). Mutation of SENP1/SuPr-2 reveals an essential role for desumoylation in mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5171–5182.
- Yan, J., Deng, H.-X., Siddique, N., Fecto, F., Chen, W., Yang, Y., Liu, E., Donkervoort, S., Zheng, J.G., Shi, Y., et al. (2010). Frameshift and novel mutations in FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia. *Neurology* 75, 807–814.
- Yang, S.-H., Galanis, A., Witty, J., and Sharrocks, A.D. (2006). An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J.* 25, 5083–5093.

- Yasojima, K., Tourtellotte, W.W., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2001). Marked increase in cyclooxygenase-2 in ALS spinal cord: implications for therapy. *Neurology* 57, 952–956.
- Ying, Z., Wang, H., Fan, H., Zhu, X., Zhou, J., Fei, E., and Wang, G. (2009). Gp78, an ER associated E3, promotes SOD1 and ataxin-3 degradation. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4268–4281.
- Yonashiro, R., Sugiura, A., Miyachi, M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R., Ogata, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., and Yanagi, S. (2009). Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced reactive oxygen species generation. *Mol. Biol. Cell* 20, 4524–4530.
- Yoshinaga, H., Sakoda, S., Good, J.-M., Takahashi, M.P., Kubota, T., Arikawa-Hirasawa, E., Nakata, T., Ohno, K., Kitamura, T., Kobayashi, K., et al. (2012). A novel mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. *J. Neurol. Sci.* 315, 15–19.
- Yrjänheikki, J., Tikka, T., Keinänen, R., Goldsteins, G., Chan, P.H., and Koistinaho, J. (1999). A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13496–13500.
- Van der Zee, J., Gijselinck, I., Dillen, L., Van Langenhove, T., Theuns, J., Engelborghs, S., Philtjens, S., Vandenbulcke, M., Sleegers, K., Sieben, A., et al. (2013a). A pan-European study of the C9orf72 repeat associated with FTLT: geographic prevalence, genomic instability, and intermediate repeats. *Hum. Mutat.* 34, 363–373.
- Van der Zee, J., Gijselinck, I., Dillen, L., Van Langenhove, T., Theuns, J., Engelborghs, S., Philtjens, S., Vandenbulcke, M., Sleegers, K., Sieben, A., et al. (2013b). A pan-European study of the C9orf72 repeat associated with FTLT: geographic prevalence, genomic instability, and intermediate repeats. *Hum. Mutat.* 34, 363–373.
- Zhang, F., and Zhu, H. (2006). Intracellular conformational alterations of mutant SOD1 and the implications for fALS-associated SOD1 mutant induced motor neuron cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 404–414.
- Zhang, J., and Herrup, K. (2011). Nucleocytoplasmic Cdk5 is involved in neuronal cell cycle and death in post-mitotic neurons. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 1208–1214.
- Zhang, B., Tu, P., Abtahian, F., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1997). Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *J. Cell Biol.* 139, 1307–1315.
- Zhang, D., Iyer, L.M., He, F., and Aravind, L. (2012a). Discovery of Novel DENN Proteins: Implications for the Evolution of Eukaryotic Intracellular Membrane Structures and Human Disease. *Front. Genet.* 3, 283.
- Zhang, D., Iyer, L.M., He, F., and Aravind, L. (2012b). Discovery of Novel DENN Proteins: Implications for the Evolution of Eukaryotic Intracellular Membrane Structures and Human Disease. *Front. Genet.* 3, 283.
- Zhang, H., Saitoh, H., and Matunis, M.J. (2002). Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6498–6508.

- Zhang, N., Wang, Q., Ehlinger, A., Randles, L., Lary, J.W., Kang, Y., Haririnia, A., Storaska, A.J., Cole, J.L., Fushman, D., et al. (2009). Structure of the s5a:k48-linked diubiquitin complex and its interactions with rpn13. *Mol. Cell* 35, 280–290.
- Zhang, X., Li, L., Chen, S., Yang, D., Wang, Y., Zhang, X., Wang, Z., and Le, W. (2011). Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* 7, 412–425.
- Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., et al. (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416, 703–709.
- Zhu, S., Stavrovskaya, I.G., Drozda, M., Kim, B.Y.S., Ona, V., Li, M., Sarang, S., Liu, A.S., Hartley, D.M., Wu, D.C., et al. (2002). Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417, 74–78.
- Zimmerman, E.S., Schulman, B.A., and Zheng, N. (2010). Structural assembly of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 714–721.
- Zou, W., Papov, V., Malakhova, O., Kim, K.I., Dao, C., Li, J., and Zhang, D.-E. (2005). ISG15 modification of ubiquitin E2 Ubc13 disrupts its ability to form thioester bond with ubiquitin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 61–68.
- Zhu, S., Stavrovskaya, I.G., Drozda, M., Kim, B.Y.S., Ona, V., Li, M., Sarang, S., Liu, A.S., Hartley, D.M., Wu, D.C., et al. (2002). Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417, 74–78.
- 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.C., et al. (2011). Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 260–265.

**COMMUNICATIONS ORALES ET
AFFICHEES, FINANCEMENTS**

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES, FINANCEMENTS

Communications orales

«*L'ubiquitine-like SUMO dans la sclérose latérale amyotrophique*», Séminaire de l'U930 : Famille des Ubiquitines et Pathologies neuronales, 2013, Tours, France.

«*Rôle de la SUMOylation dans la sclérose latérale amyotrophique*» Biotechnocentre 2013, Seillac, France

Communications affichées

Congrès internationaux

Dangoumau A., Veyrat C., Blasco H., Corcia P., Andres CR., Vourc'h P. *Role of SUMOylation in Amyotrophic Lateral Sclerosis neurodegeneration associated with SOD1 gene mutations* Federation of European Neurosciences, 2014, Milan, Italy

Vourc'h P., **Dangoumau A.**, Marouillat S., Boyce C., Makam C., Coehlo R., Wurmser F, Blasco H., Corcia P., Andres C. R *Gene expression profiling in motor neuronal cells in a model of Amyotrophic Lateral Sclerosis combining oxidative stress and ALS-related mutations in SOD1*. Federation of European Neurosciences, 2014, Milan, Italy

Veyrat-Durebex C., Corcia P., Emond P., **Dangoumau A.**, Vourc'h P., Piver E., Laumonnier F., Jonneaux A., Devos D., Marchetti P., Garçon G., Andres C.R., Blasco H. *Metabolomic approach on an in vitro model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: a co-culture of astrocytes and motor-neurons exposed to oxidative stress*. Federation of European Neurosciences, 2014, Milan, Italy

Veyrat-Durebex C, Blasco H, **Dangoumau A**, Vourc'h P, Piver E, Laumonnier F, Jonneaux A, Devos D, Marchetti P, Garçon G, Andres CR, Corcia P, *Metabolomic approach on an in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis, a co-culture of astrocytes and motor neurons exposed to oxidative stress*. The 24th International Symposium on ALS/MND, 2014, Milan, Italia.

Dangoumau A , Veyrat-Durebex C, Blasco H, Papon MA, Corcia P, Andres CR, Vourc'h P, *Role of SUMOylation in amyotrophic lateral sclerosis neurodegeneration and SOD1 gene mutation*. EMBO Ubiquitin and ubiquitin-like proteins: From structure to function, 2013, Riva del Garda, Italia

Dangoumau A, Veyrat-Durebex C, Hammouche E, Blasco H, Pouget J, Verschueren A, Praline J, Corcia P, Andres C, Vourc'h P, for the French Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Study Group. *Mutational analysis of the major Amyotrophic lateral sclerosis genes in French ALS patients*. European Society of Human Genetics, 2013, Paris, France

Vourc'h P., Wurmser F., Kassem S., Daoudi I., Le Berre T., **Dangoumau A.**, Veyrat-Durebex C., Blasco H., Corcia P., Andres C. R. *Analysis of candidate genes with hexanucleotide GGGGCC-repeats in French patients with Amyotrophic lateral sclerosis*. European Society of Human Genetics, 2013, Paris, France

Dangoumau A., Veyrat-Durebex C., Blasco H., Belin J., Praline J., Corcia P., Andres C., Vourc'h P. *Effects of ALS-related mutations on SOD1 SUMOylation and aggregation*. Federation of European Neurosciences, 2012, Barcelone, Spain.

Congrès nationaux

Dangoumau A., Veyrat-Durebex C., Blasco H., Papon M.A., Corcia P., Andres C.R., Vourc'h P. *Rôle de la SUMOylation dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) associée à des mutations du gène SOD1*. Journée de la recherche Tours-Poitiers 2013

Dangoumau A., Veyrat-Durebex C., Blasco H., Corcia P., Andres C.R., Vourc'h P. *Rôle de la SUMOylation dans la Sclérose Latérale Amyotrophique associée à des mutations du gène SOD1*. Journée de la SFR 2014

Dangoumau A., Veyrat-Durebex C., Hammouche E., Blasco H., Pouget J., Verschueren A., Praline J., Corcia P., Andres C., Vourc'h P., for the French Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Study Group. *Analyse des mutations des gènes majeurs de la sclérose latérale amyotrophique dans une cohorte française de patients atteints de SLA*. Journée de la SFR 2013

Dangoumau A., Veyrat-Durebex C., Blasco H., Belin J., Arnoult C.⁴, Praline J., Corcia P., Andres C.R., Vourc'h P. *Rôle de la SUMOylation de la protéine SOD1 dans la neurodégénérescence associée à la sclérose latérale amyotrophique*. Journée de la recherche Tours-Poitiers 2012

Dangoumau A., Veyrat C., Blasco H., Praline J., Corcia P., Andres C.R., Vourc'h P. *SUMOylation en réponse au stress cellulaire: implication dans la sclérose latérale amyotrophique*. Journée de la recherche Tours-Poitiers 2011

Financements

ARSLA association "Study of SUMOylation in response to cellular stress in motor neurons: implication in ALS" (Dr P. Vourc'h, A. Dangoumau): 40 000€

Société Française des Neurosciences (Travel awards, Fens Milan, 2014): 500€

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE 1

Hexanucleotide repeats (GGGGCC)_n containing genes resembling *C9ORF72* and expressed in the central nervous system are frequent in the Human genome

Vourc'h Patrick^{1,2,3}, Wurmser François², Mouzat Kevin⁴, Kassem Sandra³, **Dangoumau Audrey**¹, Blasco Hélène^{1,3}, Corcia Philippe^{1,3}, Andres Christian R.^{1,3}, and the French Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Study group.

¹ UMR INSERM U930, Université François-Rabelais, Tours, France

² Département Génomique, Plateforme Analyse des Systèmes Biologiques, Université François-Rabelais, Tours, France

³ CHRU de Tours, Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire, Tours, France

⁴ CHRU de Nîmes, Laboratoire de Biochimie, Nîmes, France

⁵ Centre SLA, CHU Bretonneau, Tours, France

*Corresponding author P Vourc'h, INSERM U930, Equipe Neurogénétique et Neurométabolomique, Faculté de Médecine, 10 bd Tonnellé, 37032 Tours, France. Tel: 33 (0)2 34 37 89 10; fax: 33 (0)2 47 36 61 85.

E-mail address: vourch@med.univ-tours.fr (P. Vourc'h)

Keywords: Expansion, microsatellite, Neurodegenerative, Neurodevelopmental, Ubiquitin

ABSTRACT

Several neurological diseases are caused by the expansion of unstable nucleotide repeats. Repeats of sequences like (CAG)_n present in different genes, can be responsible for various diseases of the central nervous system. Recently, an expanded hexanucleotide repeat (GGGGCC)_n in the *C9ORF72* gene has been characterized as the most frequent genetic cause of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal Lobar Dementia (FTLD). In this study, we performed a genome-wide analysis in the Human genome and identified 74 genes containing this precise hexanucleotide repeat, with a preference for a location in exon 1 or intron 1, similar to the *C9ORF72* gene. We chose to study two of these genes based on their function, *NUB1* and *MARCKSL1* in a French cohort of patients with ALS, but observed no abnormal expansion. We propose that 35 of these 74 genes may be considered as candidates in neurodevelopmental or neurodegenerative diseases, based on their function.

1. INTRODUCTION

Several human diseases, and particularly neurological and neuromuscular diseases, are caused by the expansion of nucleotide repeats named microsatellites in different genes (Nelson et al., 2013). These DNA repeats seem to be predisposed to such expansion, perhaps because of unusual structural features. They are located in various regions of the genes, including promoters, 5'-or 3'-untranslated regions (UTR), coding sequences, and introns (Mirkin, 2007). For example, the exonic triplet repeats (CAG)_n described in several genes encode expanded polyglutamine-repeats in proteins. This expansion is implicated in Huntington's disease (HD), spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), and spinocerebellar ataxia (He et al., 2010). The exonic triplet repeats (GCN)_n also reported in several genes encode expanded polyalanine-repeats in proteins. Intronic trinucleotide repeats such as (GAA)_n are observed in Friedreich's ataxia (FRDA) for example. 5'UTR triplet repeats such as (CGG)_n and 3'UTR triplet repeats such as (CTG)_n are implicated in Fragile-X mental retardation (FRAXA) and myotonic dystrophy type 1 respectively. Other expansions are reported in myotonic dystrophy type 2 (CCTG)_n, spinocerebellar ataxia type 10 (ATTCT)_n and type 36 (GGCCTG)_n.

Recently an hexanucleotide repeat expansion (GGGGCC)_n located in the first intron of the *C9ORF72* gene was identified as the most frequent mutation in Amyotrophic Lateral

Sclerosis (ALS) and Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD) (DeJesus-Hernandez et al., 2011b; Gijssels et al., 2012; Renton et al., 2011b). Non-expanded repeat size ranges from 2 to 22 in the normal population. It generally exceeds 30 repeats in pathological populations. The (GGGGCC)_n repeat is located in the first intron corresponding to two transcripts (1 and 3) of *C9ORF72*, and in the 5'UTR corresponding to a third transcript (2) (DeJesus-Hernandez et al., 2011b). The expansion of this repeat was associated with a reduction in *C9ORF72* gene expression (van der Zee et al., 2013b), suggesting a haploinsufficiency mechanism. The function of the C9ORF72 protein is still unknown, but a role in autophagy and in vesicular trafficking was proposed based on homology searches (Levine et al., 2013b; Zhang et al., 2012b). Two other disease mechanisms, both by toxic gain of function, have been proposed (Gendron et al., 2014; Haeusler et al., 2014). They are based on the observation that the expansion is also associated with a production of both sense and antisense transcribed expanded repeats ((5'GGGGCC3')_n and (5'GGCCCC3')_n), which form RNA-G-quadruplex structures aberrantly interacting with various RNA-binding proteins (RBPs) and normal RNA in cells, and forming RNA foci (DeJesus-Hernandez et al., 2011b). These two repeat-containing RNAs can also be the site of a non-AUG-initiated (RAN) translation leading to the production of toxic dipeptide-repeat containing proteins (Ash et al., 2013; Mori et al., 2013). This RAN mechanism was first described in trinucleotide repeat expansions in spinocerebellar ataxia 8 and myotonic dystrophy type 1 (Zu et al., 2011). The use of antibodies generated against putative GGGGCC repeat RAN-translated peptides detected neuronal inclusions throughout the central nervous system of patients with ALS/FTLD (Ash et al., 2013).

In this paper, we hypothesized that the hexanucleotide repeat (5'GGGGCC3')_n or its antisense sequence (5'GGCCCC3')_n, encoding RNA-G-quadruplex structures and/or expanded poly dipeptide-repeat proteins, could be present not only in *C9ORF72*, but also in other genes in the human genome. Similarly to what was observed in ALS/FTDP with *C9ORF72*, these repeats may be subject to expansion and cause neurological diseases. We analysed the presence and distribution of this hexanucleotide repeat (both sense and antisense sequences) in the whole human genome. Based on data on gene expression and function, we established a list of genes to further study by repeat-primed polymerase chain reaction (PCR) in neurological and neuromuscular diseases. We analysed two of them, *MARCKSL1* and *NUBI*, in a French population of ALS patients.

2. METHODS

The genome-wide analysis was done using the human genome assembly hg19. Only perfect repeats of three or more repeats were searched using an *ad hoc* pipeline. The precise location of the repeats in genomic regions such as promoters, introns and exons was identified using the genome browsers Ensembl and UCSC (Flicek et al., 2014; Kent et al., 2002). We assessed if this (GGGGCC)_n pattern was statistically overrepresented in the human genome using a Monte Carlo test with 1,000 iterations.

The expression and function of genes with (GGGCC)_n repeats were analyzed using the gene annotation portal bioGPS (bioGPS.org) and Medline database (pubmed.org).

Clinical data and blood samples were obtained from 200 patients with sporadic ALS. ALS was diagnosed according to the El Escorial World Federation criteria by physicians in the French ALS Study Group centers. DNA was extracted from peripheral blood samples using a standard procedure. All patients studied showed no mutation in the *SOD1*, *TARDBP* and *FUS* genes, and no expansion of the hexanucleotide repeat in the *C9ORF72* gene. The analysis of repeats in *C9ORF72* (positive control for repeat primed PCR), *NUB1* and *MARKSL1* genes was carried out by repeat-primed polymerase chain reaction (PCR) and gene scanning in a 3130xl Applied Sequencer with primers presented in supplementary table 1. The PCR reaction contained 300 ng of DNA, 5% dimethyl sulfoxide, 2mM dNTP (a substitution of 7-deaza-2-desoxy-GTP for dGTP), 0.15U of Pfu DNA polymerase (Promega), 0.2μM of Reverse (gene specific) and M13 primers, 0.3μM of a 6-FAM labeled Forward primer (gene specific), with an optimized cycling program adapted from DeJesus-Hernandez et al., 2011 (13 cycles at T_m 65°C, 32 cycles at T_m 58°C).

3. RESULTS

3.1. Loci with repeats in the human genome.

A genome-wide analysis was performed to identify and locate all GGGGCC and CCCCCG hexanucleotide repeats in the human genome assembly hg19. The number of repeats of the hexanucleotide GGGGCC in *C9ORF72* in the human genome of reference in Ensembl is 3. We therefore set the lower limit at 3 repetitions in our analysis. We found the repetitions GGGGCC or CCCCCG in 101 loci in the human genome. These repeats were not over-represented in the genome compared with randomly chosen six-bases repeats (p-value: 0.096, Monte Carlo test with 1,000 iterations). Repeats were observed on all chromosomes

except chromosome 14 and Y (Figure 1A). The average number of repeats per chromosome was 4.6. 22 intergenic regions contained the repeats. They were considered intergenic sequences because of their location at more 1000 bp of a coding sequence. We considered in our analysis only perfect repeats, (GGGGCC GGGGCC GGGGCC) or (CCCCGG CCCCCG CCCCCG). These perfect repeats were often surrounded by very similar sequences, as for example GGGGCg in *C9ORF72*.

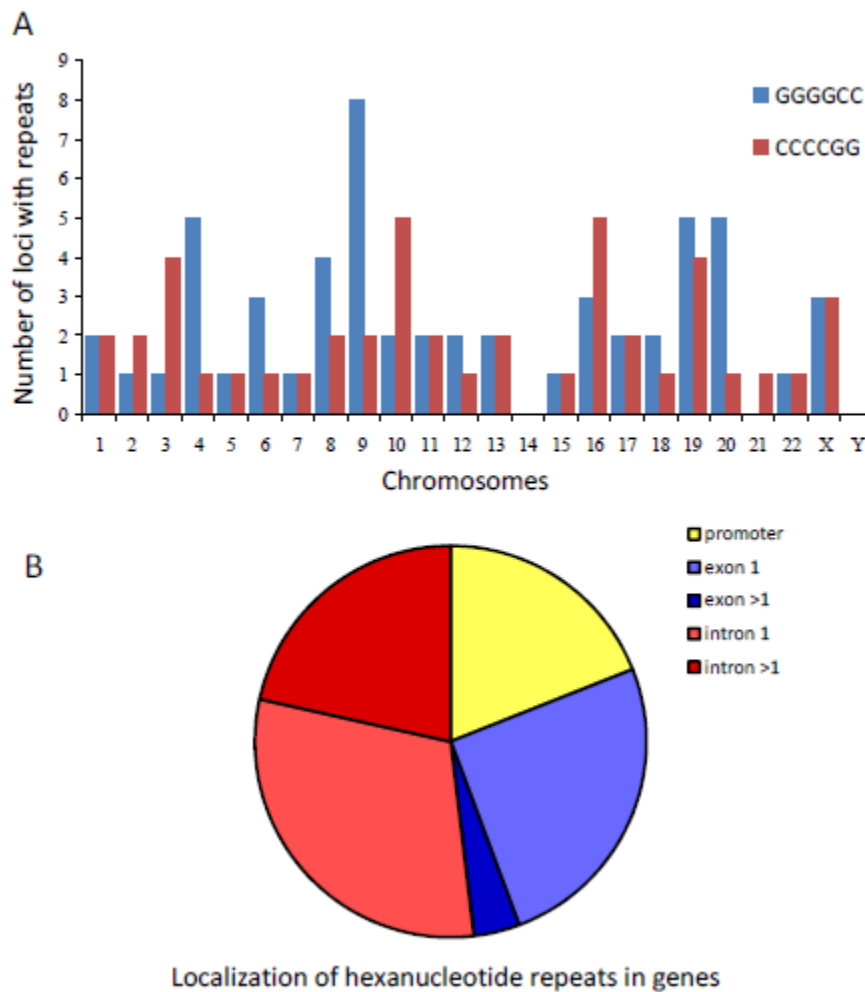


Figure 1: (A) Number of GGGGCC or CCCCCG repeats on each chromosome of the Human genome; (B) Number of genes with repeats and localisation of these repeats.

3.2. Genes with repeats in the human genome.

We next focused on repeats within genes in the human genome. We observed the repeats (GGGGCC)_n or (CCCCGG)_n, with $n \geq 3$, in 79 genes distributed over all chromosomes, except chromosome 14, 21 and Y (Supplementary Table 2). We identified the (GGGGCC)_n repeats in intron 1 of *C9ORF72* gene, validating our bioinformatic analysis. For 15 genes, repeats were located in proximity (<1000pb) of 5' regions of coding sequences,

therefore in promoters. For 64 genes, repeats were in RNA coding sequences in translated or untranslated regions, such as UTRs and introns (Table 1, Supplementary Table 2). They were in intronic sequences for 31 genes (42% of the genes). We observed the repetitions mostly in the intron 1 (23 genes) compared to other introns, as in *C9orf72* involved in ALS/DFT, but this was mainly due to the large size of this first intron in many genes. Indeed the repetitions were not more frequent in the intron than in other regions of the genes if we take into account the length of exons and introns ($p=0.48$).

Locus (Human)	Gene symbol (synonyms)	Gene name	Repeat units (n)	Localisation
1p13	<i>KCNA2</i>	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 2	3	intron 1
1p35.1	<i>MARCKSL1</i>	MARCKS-like 1	3	intron 1
2q24.3	<i>STK39</i>	Serine threonine kinase 39	4	exon 1 CS
3q13	<i>CASR</i>	Calcium-sensing receptor	3	intron 1
3q27	<i>CHRD</i>	Chordin	4	UTR5'
4q26	<i>FGF2</i>	Fibroblast growth factor 2 (basic)	3	exon 1 CS
6p21	<i>ITPR3</i>	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 3	3	intron 1
6p21.1	<i>RRP36</i>	Ribosomal RNA processing 36 homolog	4	exon 1 CS
6q25.3	<i>ARID1B</i>	AT rich interactive domain 1B	3	promoter
7q36.1	<i>NUB1</i>	Negative regulator of ubiquitin-like protein 1	3	intron 1
8q22.2	<i>NCALD</i>	Neurocalcin delta	3	intron 1
8q24.3	<i>BAI1</i>	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1	3	intron 3
8q24.3	<i>SHARPIN</i>	SHANK-associated RH domain interactor	3	intron 5
9p21.2	<i>C9orf72</i>	Chromosome 9 open reading frame 72	3	intron 1
9q31	<i>TMEFF1</i>	Tomoregulin-1	3	intron 1
9q34.3	<i>CACNA1B</i>	Calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	3	intron 1
9q34.3	<i>GPSM1 / AGS3</i>	G-protein signaling modulator 1	3	intron 1
10q24.31	<i>LZTS2 / LAPSER1</i>	Leucine zipper tumor suppressor 2	3	UTR5'
10q26	<i>GPR123</i>	G protein-coupled receptor 123	4	intron 5
10q26.3	<i>JAKMIP3 / NECC2</i>	Janus kinase and microtubule interacting protein 3	3	intron 10
11p15.5	<i>AP2A</i>	Adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit	3	intron 1
11p15.5	<i>CDKN1C</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	3	exon 1 CS
12q13.13	<i>POU6F1 / BRN5</i>	POU class 6 homeobox 1	4	promoter
13q34	<i>TFDP1</i>	Transcription factor Dp-1	3	intron 1
16p13.3	<i>CACNA1H</i>	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit	4	UTR5'
16q12.1	<i>PAPD5</i>	PAP associated domain containing 5	3	exon 2 CS
17q23.2	<i>TBX2</i>	T-box 2	3	UTR5'
17q23.3	<i>SCN4A</i>	Sodium channel voltage gated type IV, alpha subunit	3	intron 14
19p13.3	<i>TNFAIP8L1</i>	Tumor necrosis factor (TNF)-alpha induced protein 8	3	UTR5'
19p13.3	<i>HCN2</i>	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel	4	intron 6
19q13.12	<i>USF2</i>	Upstream transcription factor 2	3	intron 1
19q13.2	<i>ZFP36 / TTP</i>	Ring finger protein, Tritetrarprolin	3	promoter
19q13.33	<i>LRRC4B</i>	Leucine rich repeat containing protein 4B	3	promoter
20p13	<i>RBCK1 / RNFS4 / HOIL1</i>	Ring finger protein 54	3	intron 1
20q13.33	<i>TAF4 / TAFII30</i>	TBP associated factor 4 RNA polymerase 2	3	exon 1 CS
Xp11.22	<i>HUWE1</i>	HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase	5	intron 17

CS: coding sequence

Table 1: Genes containing hexanucleotide repeats expressed in the central nervous system or neuromuscular system.

23 genes (29%) contained the repeats in exons, and again mostly in the first exon (20 genes). For 7 of them the repeats were in the translated coding sequence, and in a hydrophobic region of the protein (Table 1, Supplementary Table 2). This region was formed of perfect repeats and surrounded by sequences highly similar to the repeats. For example, the

coding sequence of the gene *TAF4* contains 5 perfect repeats (CCCCGG) surrounded by three highly similar sequences, encoding in the protein a hydrophobic domain of 8 repeats of the dipeptide Glycine-Proline. These 7 genes were *STK39* (Ala-Pro)₄, *FGF2* (Gly-Arg)₃, *RRP36* (Ala-Gly)₄, *CDKN1C* (Ala-Pro)₈, *PAPD5* (Ala-Pro)₃, *RBM12* (Gly-Pro)₆ and *TAF4* (Gly-Pro)₈.

3.3. Genes with repeats expressed in the nervous and neuromuscular systems

From the list of 74 genes we extracted all genes expressed in the central nervous system or in muscles (bioGPS.org), and with known functions (Table 2) (Wu et al., 2009). The 36 selected genes were located on 18 chromosomes, with 5 genes in 19q13.

The majority of them could be grouped into 4 functional families. 10 genes are involved in neuronal differentiation, migration and maturation (Table 1). For example *CDKN1C* negatively controls the expansion of cortical intermediate progenitor cells. It is directly regulated by *ARX*, a gene whose mutations are found in disorders with epilepsy and intellectual disability (Colasante et al., 2013). 12 genes are involved in neuronal or muscle excitability. For example *SNC4A* gene encodes a skeletal muscle sodium channel. It is mutated in several muscle disorders characterized by episodic abnormalities of membrane excitability (McClatchey et al., 1992). Five genes encode proteins of the Ubiquitin pathway, such as *ARID1B* and *HUWE1*, and thus are involved in regulating the half-life or function of proteins. *ARID1B* encodes a protein of an E3 ubiquitin ligase complex member of the SWI/SNF-A chromatin-remodelling complex. Its haploinsufficiency is a cause of Intellectual disability (Hoyer et al., 2012; Li et al., 2010). Duplication or point mutations in *HUWE1*, encoding an E3 ubiquitin ligase regulating axon branching, also contribute to intellectual disability (Froyen et al., 2008; Vandewalle et al., 2013). The fourth family contains 5 genes involved in the regulation of RNA or in cell death. For example, the protein product of *TFDP1* negatively regulates the neuroprotective function of Cdk5 kinase in mature neurons (Zhang and Herrup, 2011). These data together support the idea that other genes than *C9ORF72* could be candidate genes to be tested by repeat-primed PCR in diseases of the central nervous system.

3.4. Genetic analysis in Amyotrophic lateral sclerosis

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common adult-onset motor neuron disorder. Considerable progress has been made in identifying the genetic aetiology of ALS

(Renton et al., 2014). Given their expression pattern and their functions, we considered the possibility that the genes *NUB1* (7q36.1) and *MARCKSL1* (1p35.1) could be valuable candidate genes to analyse in ALS. *NUB1* encodes the negative regulator of Ubiquitin-like protein-1 that suppresses Lewy body-like inclusions, abnormal aggregates of proteins that develop inside nerve cells in ALS (Tanji et al., 2006). *MARCKSL1* is highly expressed in spinal cord and encodes the myristoylated alanine-rich C kinase substrate implicated in cytoskeletal plasticity during nerve degeneration (Björkblom et al., 2012; McNamara and Lenox, 2000). *NUB1* and *MARCKSL1* contain 3 GGGGCC repeats in their intron 1 in the human genome of reference, as *C9ORF72*. We analysed the presence of a hexanucleotide repeat expansion in *NUB1* and *MARCKSL1* by repeat-primed PCR and gene scanning in 200 unrelated sporadic ALS patients. We identified no profile of expansion of the hexanucleotide repeat in both genes in our ALS population (Figure 2).

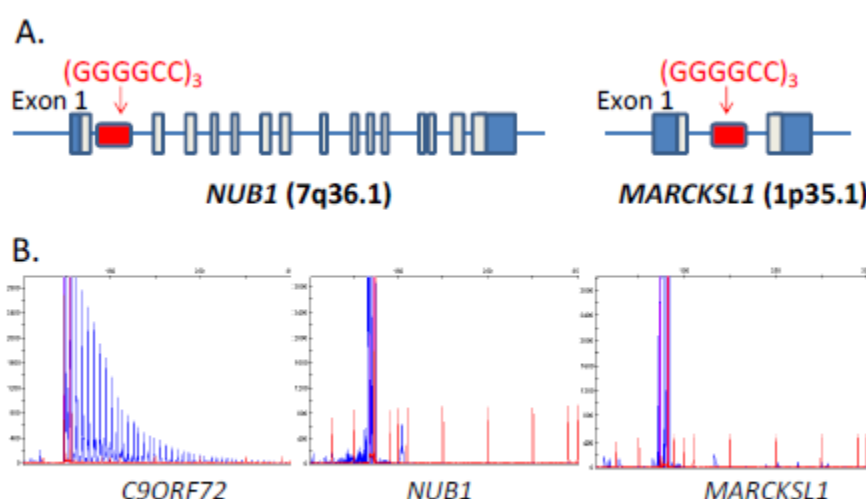


Figure 2 (A) Schematic representations of the *NUB1* and *MARCKSL1* genes, with hexanucleotide repeats (n=3) located in the first intron. (B) Genescan analysis of products from repeat-primed PCR reactions on regions containing the GGGGCC repeats in *C9ORF72* (positive control; ALS patient with more than 30 repeats), *NUB1* and *MARKSL1* genes.

4. DISCUSSION

Instability characterized by the expansion of simple DNA repeats are involved in more than 30 human hereditary disorders to date, and the list is still growing (Mirkin, 2007). A particular repeat expansion such as (CAG)_n resulting in polyglutamine run in proteins was observed in many genes and implicated in several diseases. One of the most recent

observations is the expansion of a hexanucleotide repeat in *C9ORF72* and its implication in ALS and FTD (DeJesus-Hernandez et al., 2011b; Gijselinck et al., 2012; Renton et al., 2011b). Disease mechanisms associated with this particular repeat expansion emerge. They include RNA toxicity and abnormal translation of expanded repeat sequences (poly-dipeptides). Here, we present a list 74 genes in the human genome that contain a hexanucleotide repeat (GGGGCC or reverse sequence), with many of them expressed in the central nervous system or in muscles and valuable candidates in neurological diseases.

The mechanism of instability of this type of hexanucleotide repeat expansion is still to be characterized. Studies on *C9ORF72* support the idea that a *de novo* pathological expansion does not exist (Beck et al., 2013; Ratti et al., 2012; Smith et al., 2013). Further studies will indicate whether or not the hexanucleotide repeats in *C9ORF72* are unstable and if intermediate repeat length (n=20-30) may be pathological (Byrne et al., 2014). Interestingly, small deletions appear significantly enriched in the region directly flanking the *C9ORF72* repeat in carriers of expanded repeats (van der Zee et al., 2013b). The consequence is an extension of the perfect repeats (GGGGCC) surrounded with imperfect ones, and consequently a higher vulnerability to expansion by strand slippage for example. In our list of 79 genes, we observed that many genes contained GC-rich low complexity sequences and imperfect repeats flanking the perfects ones.

Disorders of the nervous system characterized by expansion of a nucleotide repeat account for a number of neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. It is interesting to note that our screening identify several genes already involved in neurological diseases. Abnormalities in these genes consist mainly in point mutations and copy number variants. For example abnormalities in *HUWE1* (E3 ubiquitin ligase) and *ARID1B* (epigenetic modifier of chromatin structure) are associated with intellectual disability (Backx et al., 2011; Froyen et al., 2008; Santen et al., 2012). In patients with epilepsy mutations are observed in *CACNA1H* and *HCN2* encoding respectively the Cav3.2 T-type Ca²⁺ channel and the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 (Chen et al., 2003; Eckle et al., 2013; Nakamura et al., 2013; Tang et al., 2008). Mutations in the adult skeletal muscle sodium channel gene *SCN4A* are responsible for periodic paralysis and myotonic disorders (Ptáček et al., 1991; Yoshinaga et al., 2012). The presence of hexanucleotide repeats in these genes, often in their 5' region such as in *C9ORF72*, suggests that it could be of

interest to look for their possible expansion in patients with these clinical signs of diseases but without classical mutations in these genes.

We observed the hexanucleotide repeats in 29 other genes non-genetically involved in diseases so far. However, several of them are interesting candidates for diseases of the nervous system. We studied *NUB1* and *MARCKSL1* genes by repeat-primed PCR in a cohort of sporadic ALS patients and found no repeat expansion. It would be of interest to continue this study in larger cohorts and particularly in cohorts of familial ALS patients, as well as in patients with other neurodegenerative diseases. Indeed, recent studies have shown that the protein of the ubiquitin pathway NUB1, known to suppress Lewy body-like inclusions, is a suppressor of mutant huntingtin toxicity and reduces tau aggregation (Lu et al., 2013; Richet et al., 2012; Tanji et al., 2006). *TTP* and *RRP36* are two other interesting genes because of their direct implication in RNA homeostasis, a major emerging theme is neurodegeneration (Renoux and Todd, 2012). *TTP* encodes an AU-rich element binding protein that regulates the stability of many mRNA and is present in stress granules in tauopathies (Vanderweyde et al., 2012). *RRP36* encodes the Ribosomal RNA processing 36 homolog involved in early cleavage of pre-rRNA (Gérus et al., 2010). We also noted two very interesting genes encoding synaptic proteins to study in neurodevelopmental diseases. *SHARPIN* encodes a postsynaptic density protein involved in ubiquitination and directly interacting with the shank family of proteins (Lim et al., 2001). *BAI-1* encodes a synaptic receptor that activates the Rho signaling pathway implicated in intellectual disability (van Bokhoven, 2011; Stephenson et al., 2013).

Our results indicate that *C9ORF72* is not the only gene in the Human genome containing the same hexanucleotide repeat whose expansion which is implicated in ALS/FTD. The discovery of this expansion in ALS required to analyse intronic regions and to use a repeat-primed PCR protocol. The present study provides indirect support for the idea that hexanucleotide repeat expansions could affect other genes in the genome. Our 35 selected genes can be used as a list of candidate genes to study not only by DNA sequencing but also by repeat-primed PCR in several diseases of the nervous system.

REFERENCES

Ash, P.E.A., Bieniek, K.F., Gendron, T.F., Caulfield, T., Lin, W.-L., Dejesus-Hernandez, M., van Blitterswijk, M.M., Jansen-West, K., Paul, J.W., 3rd, Rademakers, R., Boylan, K.B.,

Dickson, D.W., Petrucelli, L., 2013. Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 77, 639–646.

Backx, L., Seuntjens, E., Devriendt, K., Vermeesch, J., Van Esch, H., 2011. A balanced translocation t(6;14)(q25.3;q13.2) leading to reciprocal fusion transcripts in a patient with intellectual disability and agenesis of corpus callosum. *Cytogenet. Genome Res.* 132, 135–143.

Beck, J., Poulter, M., Hensman, D., Rohrer, J.D., Mahoney, C.J., Adamson, G., Campbell, T., Uphill, J., Borg, A., Fratta, P., Orrell, R.W., Malaspina, A., Rowe, J., Brown, J., Hodges, J., Sidle, K., Polke, J.M., Houlden, H., Schott, J.M., Fox, N.C., Rossor, M.N., Tabrizi, S.J., Isaacs, A.M., Hardy, J., Warren, J.D., Collinge, J., Mead, S., 2013. Large C9orf72 hexanucleotide repeat expansions are seen in multiple neurodegenerative syndromes and are more frequent than expected in the UK population. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 345–353.

Björkblom, B., Padzik, A., Mohammad, H., Westerlund, N., Komulainen, E., Hollos, P., Parviainen, L., Papageorgiou, A.C., Iljin, K., Kallioniemi, O., Kallajoki, M., Courtney, M.J., Mågård, M., James, P., Coffey, E.T., 2012. c-Jun N-terminal kinase phosphorylation of MARCKSL1 determines actin stability and migration in neurons and in cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 32, 3513–3526.

Byrne, S., Heverin, M., Elamin, M., Walsh, C., Hardiman, O., 2014. Intermediate repeat expansion length in C9orf72 may be pathological in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 15, 148–150.

Chen, Y., Lu, J., Pan, H., Zhang, Y., Wu, H., Xu, K., Liu, X., Jiang, Y., Bao, X., Yao, Z., Ding, K., Lo, W.H.Y., Qiang, B., Chan, P., Shen, Y., Wu, X., 2003. Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann. Neurol.* 54, 239–243.

Colasante, G., Simonet, J.C., Calogero, R., Crispi, S., Sessa, A., Cho, G., Golden, J.A., Broccoli, V., 2013. ARX Regulates Cortical Intermediate Progenitor Cell Expansion and Upper Layer Neuron Formation Through Repression of Cdkn1c. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.-Y.R., Karydas, A., Seeley, W.W., Josephs, K.A., Coppola, G., Geschwind, D.H., Wszolek, Z.K., Feldman, H., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Miller, B.L., Dickson, D.W., Boylan, K.B., Graff-Radford, N.R., Rademakers, R., 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245–256.

Eckle, V.-S., Shcheglovitov, A., Vitko, I., Dey, D., Yap, C.C., Winckler, B., Perez-Reyes, E., 2013. Mechanisms by which a CACNA1H mutation found in epilepsy patients increase seizure susceptibility. *J. Physiol.*

Flicek, P., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S., Gil, L., Girón, C.G., Gordon, L., Hourlier, T., Hunt, S., Johnson, N., Juettemann, T., Kähäri, A.K., Keenan, S., Kulesha, E., Martin, F.J., Maurel, T., McLaren, W.M., Murphy, D.N., Nag, R., Overduin, B., Pignatelli, M., Pritchard, B., Pritchard, E., Riat, H.S., Ruffier, M., Sheppard, D., Taylor, K., Thormann, A., Trevanion, S.J., Vullo, A., Wilder, S.P., Wilson, M., Zadissa, A., Aken, B.L., Birney, E., Cunningham,

F., Harrow, J., Herrero, J., Hubbard, T.J.P., Kinsella, R., Muffato, M., Parker, A., Spudich, G., Yates, A., Zerbino, D.R., Searle, S.M.J., 2014. Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res.* 42, D749–755.

Froyen, G., Corbett, M., Vandewalle, J., Jarvela, I., Lawrence, O., Meldrum, C., Bauters, M., Govaerts, K., Vandeleur, L., Van Esch, H., Chelly, J., Sanlaville, D., van Bokhoven, H., Ropers, H.-H., Laumonnier, F., Ranieri, E., Schwartz, C.E., Abidi, F., Tarpey, P.S., Futreal, P.A., Whibley, A., Raymond, F.L., Stratton, M.R., Fryns, J.-P., Scott, R., Peippo, M., Sipponen, M., Partington, M., Mowat, D., Field, M., Hackett, A., Marynen, P., Turner, G., Géczy, J., 2008. Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 432–443.

Gendron, T.F., Belzil, V.V., Zhang, Y.-J., Petrucelli, L., 2014. Mechanisms of toxicity in C9FTLD/ALS. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. doi:10.1007/s00401-013-1237-z

Gérus, M., Bonnart, C., Caizergues-Ferrer, M., Henry, Y., Henras, A.K., 2010. Evolutionarily conserved function of RRP36 in early cleavages of the pre-rRNA and production of the 40S ribosomal subunit. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1130–1144.

Gijssels, I., Van Langenhove, T., van der Zee, J., Slegers, K., Philtjens, S., Kleinberger, G., Janssens, J., Bettens, K., Van Cauwenberghe, C., Pereson, S., Engelborghs, S., Sieben, A., De Jonghe, P., Vandenberghe, R., Santens, P., De Bleecker, J., Maes, G., Bäumer, V., Dillen, L., Joris, G., Cuijt, I., Corsmit, E., Elinck, E., Van Dongen, J., Vermeulen, S., Van den Broeck, M., Vaerenberg, C., Mattheijssens, M., Peeters, K., Robberecht, W., Cras, P., Martin, J.-J., De Deyn, P.P., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., 2012. A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *Lancet Neurol.* 11, 54–65.

Haeusler, A.R., Donnelly, C.J., Periz, G., Simko, E.A.J., Shaw, P.G., Kim, M.-S., Maragakis, N.J., Troncoso, J.C., Pandey, A., Sattler, R., Rothstein, J.D., Wang, J., 2014. C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature* 507, 195–200.

He, X.-H., Lin, F., Qin, Z.-H., 2010. Current understanding on the pathogenesis of polyglutamine diseases. *Neurosci. Bull.* 26, 247–256.

Hoyer, J., Ekici, A.B., Ende, S., Popp, B., Zweier, C., Wiesener, A., Wohlleber, E., Dufke, A., Rossier, E., Petsch, C., Zweier, M., Göhring, I., Zink, A.M., Rappold, G., Schröck, E., Wieczorek, D., Riess, O., Engels, H., Rauch, A., Reis, A., 2012. Haploinsufficiency of ARID1B, a member of the SWI/SNF-a chromatin-remodeling complex, is a frequent cause of intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 565–572.

Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M., Haussler, D., 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 12, 996–1006.

Levine, T.P., Daniels, R.D., Gatta, A.T., Wong, L.H., Hayes, M.J., 2013. The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29, 499–503.

- Li, X.S., Trojer, P., Matsumura, T., Treisman, J.E., Tanese, N., 2010. Mammalian SWI/SNF--a subunit BAF250/ARID1 is an E3 ubiquitin ligase that targets histone H2B. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1673–1688.
- Lim, S., Sala, C., Yoon, J., Park, S., Kuroda, S., Sheng, M., Kim, E., 2001. Sharpin, a novel postsynaptic density protein that directly interacts with the shank family of proteins. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 385–397.
- Lu, B., Al-Ramahi, I., Valencia, A., Wang, Q., Berenshteyn, F., Yang, H., Gallego-Flores, T., Ichcho, S., Lacoste, A., Hild, M., Difiglia, M., Botas, J., Palacino, J., 2013. Identification of NUB1 as a suppressor of mutant Huntington toxicity via enhanced protein clearance. *Nat. Neurosci.* 16, 562–570.
- McClatchey, A.I., Trofatter, J., McKenna-Yasek, D., Raskind, W., Bird, T., Pericak-Vance, M., Gilchrist, J., Arahata, K., Radosavljevic, D., Worthen, H.G., 1992. Dinucleotide repeat polymorphisms at the SCN4A locus suggest allelic heterogeneity of hyperkalemic periodic paralysis and paramyotonia congenita. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 896–901.
- McNamara, R.K., Lenox, R.H., 2000. Differential regulation of primary protein kinase C substrate (MARCKS, MLP, GAP-43, RC3) mRNAs in the hippocampus during kainic acid-induced seizures and synaptic reorganization. *J. Neurosci. Res.* 62, 416–426.
- Mirkin, S.M., 2007. Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* 447, 932–940.
- Mori, K., Arzberger, T., Grässer, F.A., Gijssels, I., May, S., Rentzsch, K., Weng, S.-M., Schludi, M.H., van der Zee, J., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., Kremmer, E., Kretzschmar, H.A., Haass, C., Edbauer, D., 2013. Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 126, 881–893.
- Nakamura, Y., Shi, X., Numata, T., Mori, Y., Inoue, R., Lossin, C., Baram, T.Z., Hirose, S., 2013. Novel HCN2 Mutation Contributes to Febrile Seizures by Shifting the Channel's Kinetics in a Temperature-Dependent Manner. *PloS One* 8, e80376.
- Nelson, D.L., Orr, H.T., Warren, S.T., 2013. The unstable repeats--three evolving faces of neurological disease. *Neuron* 77, 825–843.
- Ptáček, L.J., George, A.L., Jr, Griggs, R.C., Tawil, R., Kallen, R.G., Barchi, R.L., Robertson, M., Leppert, M.F., 1991. Identification of a mutation in the gene causing hyperkalemic periodic paralysis. *Cell* 67, 1021–1027.
- Ratti, A., Corrado, L., Castellotti, B., Del Bo, R., Fogh, I., Cereda, C., Tiloca, C., D'Ascenzo, C., Bagarotti, A., Pensato, V., Ranieri, M., Gagliardi, S., Calini, D., Mazzini, L., Taroni, F., Corti, S., Ceroni, M., Oggioni, G.D., Lin, K., Powell, J.F., Sorarù, G., Ticozzi, N., Comi, G.P., D'Alfonso, S., Gellera, C., Silani, V., SLAGEN Consortium, 2012. C9ORF72 repeat expansion in a large Italian ALS cohort: evidence of a founder effect. *Neurobiol. Aging* 33, 2528.e7–14.
- Renoux, A.J., Todd, P.K., 2012. Neurodegeneration the RNA way. *Prog. Neurobiol.* 97, 173–189.

Renton, A.E., Chiò, A., Traynor, B.J., 2014. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* 17, 17–23.

Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A.M., Kaganovich, A., Scholz, S.W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D.W., Hernandez, D.G., Johnson, J.O., Mok, K., Ryten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, R.J., Orrell, R.W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, I.E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, J.B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, M.A., Peuralinna, T., Jansson, L., Isoviita, V.-M., Kaivorinne, A.-L., Hölttä-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wu, J., Chiò, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M., Heckerman, D., Rogaeva, E., Zinman, L., Rothstein, J.D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, E.E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, N.M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris, H.R., Tienari, P.J., Traynor, B.J., 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72, 257–268.

Richet, E., Pooler, A.M., Rodriguez, T., Novoselov, S.S., Schmidtke, G., Groettrup, M., Hanger, D.P., Cheetham, M.E., van der Spuy, J., 2012. NUB1 modulation of GSK3 β reduces tau aggregation. *Hum. Mol. Genet.* 21, 5254–5267.

Santen, G.W.E., Aten, E., Sun, Y., Almomani, R., Gilissen, C., Nielsen, M., Kant, S.G., Snoeck, I.N., Peeters, E.A.J., Hilhorst-Hofstee, Y., Wessels, M.W., den Hollander, N.S., Ruivenkamp, C.A.L., van Ommen, G.-J.B., Breuning, M.H., den Dunnen, J.T., van Haeringen, A., Kriek, M., 2012. Mutations in SWI/SNF chromatin remodeling complex gene ARID1B cause Coffin-Siris syndrome. *Nat. Genet.* 44, 379–380.

Smith, B.N., Newhouse, S., Shatunov, A., Vance, C., Topp, S., Johnson, L., Miller, J., Lee, Y., Troakes, C., Scott, K.M., Jones, A., Gray, I., Wright, J., Hortobágyi, T., Al-Sarraj, S., Rogelj, B., Powell, J., Lupton, M., Lovestone, S., Sapp, P.C., Weber, M., Nestor, P.J., Schelhaas, H.J., Asbroek, A.A.T., Silani, V., Gellera, C., Taroni, F., Ticozzi, N., Van den Berg, L., Veldink, J., Van Damme, P., Robberecht, W., Shaw, P.J., Kirby, J., Pall, H., Morrison, K.E., Morris, A., de Belleruche, J., Vianney de Jong, J.M.B., Baas, F., Andersen, P.M., Landers, J., Brown, R.H., Jr, Weale, M.E., Al-Chalabi, A., Shaw, C.E., 2013. The C9ORF72 expansion mutation is a common cause of ALS+/-FTD in Europe and has a single founder. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 21, 102–108.

Stephenson, J.R., Paavola, K.J., Schaefer, S.A., Kaur, B., Van Meir, E.G., Hall, R.A., 2013. Brain-specific angiogenesis inhibitor-1 signaling, regulation, and enrichment in the postsynaptic density. *J. Biol. Chem.* 288, 22248–22256.

Tang, B., Sander, T., Craven, K.B., Hempelmann, A., Escayg, A., 2008. Mutation analysis of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels HCN1 and HCN2 in idiopathic generalized epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 29, 59–70.

Tanji, K., Tanaka, T., Mori, F., Kito, K., Takahashi, H., Wakabayashi, K., Kamitani, T., 2006. NUB1 suppresses the formation of Lewy body-like inclusions by proteasomal degradation of synphilin-1. *Am. J. Pathol.* 169, 553–565.

Van Bokhoven, H., 2011. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu. Rev. Genet.* 45, 81–104. 2

Van der Zee, J., Gijssels, I., Dillen, L., Van Langenhove, T., Theuns, J., Engelborghs, S., Philtjens, S., Vandenbulcke, M., Slegers, K., Sieben, A., Bäumer, V., Maes, G., Corsmit, E., Borroni, B., Padovani, A., Archetti, S., Perneczky, R., Diehl-Schmid, J., de Mendonça, A., Miltenberger-Miltenyi, G., Pereira, S., Pimentel, J., Nacmias, B., Bagnoli, S., Sorbi, S., Graff, C., Chiang, H.-H., Westerlund, M., Sanchez-Valle, R., Llado, A., Gelpi, E., Santana, I., Almeida, M.R., Santiago, B., Frisoni, G., Zanetti, O., Bonvicini, C., Synofzik, M., Maetzler, W., Vom Hagen, J.M., Schöls, L., Heneka, M.T., Jessen, F., Matej, R., Parobkova, E., Kovacs, G.G., Ströbel, T., Sarafov, S., Tournev, I., Jordanova, A., Danek, A., Arzberger, T., Fabrizi, G.M., Testi, S., Salmon, E., Santens, P., Martin, J.-J., Cras, P., Vandenberghe, R., De Deyn, P.P., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., van der Zee, J., Gijssels, I., Dillen, L., Van Langenhove, T., Theuns, J., Philtjens, S., Slegers, K., Bäumer, V., Maes, G., Corsmit, E., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., van der Zee, J., Gijssels, I., Dillen, L., Van Langenhove, T., Philtjens, S., Theuns, J., Slegers, K., Bäumer, V., Maes, G., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Cras, P., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Vandenbulcke, M., Vandenbulcke, M., Borroni, B., Padovani, A., Archetti, S., Perneczky, R., Diehl-Schmid, J., Synofzik, M., Maetzler, W., Müller Vom Hagen, J., Schöls, L., Synofzik, M., Maetzler, W., Müller Vom Hagen, J., Schöls, L., Heneka, M.T., Jessen, F., Ramirez, A., Kurzweil, D., Sachtleben, C., Mairer, W., de Mendonça, A., Miltenberger-Miltenyi, G., Pereira, S., Forno, C., Pimentel, J., Sanchez-Valle, R., Llado, A., Antonell, A., Molinuevo, J., Gelpi, E., Graff, C., Chiang, H.-H., Westerlund, M., Graff, C., Kinhult Ståhlbom, A., Thonberg, H., Nennesmo, I., Börjesson-Hanson, A., Nacmias, B., Bagnoli, S., Sorbi, S., Bessi, V., Piaceri, I., Santana, I., Santiago, B., Santana, I., Helena Ribeiro, M., Rosário Almeida, M., Oliveira, C., Massano, J., Garret, C., Pires, P., Frisoni, G., Zanetti, O., Bonvicini, C., Sarafov, S., Tournev, I., Jordanova, A., Tournev, I., Kovacs, G.G., Ströbel, T., Heneka, M.T., Jessen, F., Ramirez, A., Kurzweil, D., Sachtleben, C., Mairer, W., Jessen, F., Matej, R., Parobkova, E., Danel, A., Arzberger, T., Maria Fabrizi, G., Testi, S., Ferrari, S., Cavallaro, T., Salmon, E., Santens, P., Cras, P., European Early-Onset Dementia Consortium, 2013. A pan-European study of the C9orf72 repeat associated with FTLT: geographic prevalence, genomic instability, and intermediate repeats. *Hum. Mutat.* 34, 363–373.

Vanderweyde, T., Yu, H., Varnum, M., Liu-Yesucevitz, L., Citro, A., Ikezu, T., Duff, K., Wolozin, B., 2012. Contrasting pathology of the stress granule proteins TIA-1 and G3BP in tauopathies. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 8270–8283.

Vandewalle, J., Langen, M., Zschaetzsch, M., Nijhof, B., Kramer, J.M., Brems, H., Bauters, M., Lauwers, E., Srahna, M., Marynen, P., Verstreken, P., Schenck, A., Hassan, B.A., Froyen, G., 2013. Ubiquitin ligase HUWE1 regulates axon branching through the Wnt/ β -catenin pathway in a *Drosophila* model for intellectual disability. *PloS One* 8, e81791.

Wu, C., Orozco, C., Boyer, J., Leglise, M., Goodale, J., Batalov, S., Hodge, C.L., Haase, J., Janes, J., Huss, J.W., 3rd, Su, A.I., 2009. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol.* 10, R130.

Yoshinaga, H., Sakoda, S., Good, J.-M., Takahashi, M.P., Kubota, T., Arikawa-Hirasawa, E., Nakata, T., Ohno, K., Kitamura, T., Kobayashi, K., Ohtsuka, Y., 2012. A novel mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. *J. Neurol. Sci.* 315, 15–19.

Zhang, D., Iyer, L.M., He, F., Aravind, L., 2012. Discovery of Novel DENN Proteins: Implications for the Evolution of Eukaryotic Intracellular Membrane Structures and Human Disease. *Front. Genet.* 3, 283.

Zhang, J., Herrup, K., 2011. Nucleocytoplasmic Cdk5 is involved in neuronal cell cycle and death in post-mitotic neurons. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 1208–1214.

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.C., Nan, Z., Forster, C., Low, W.C., Schoser, B., Somia, N.V., Clark, H.B., Schmechel, S., Bitterman, P.B., Gourdon, G., Swanson, M.S., Moseley, M., Ranum, L.P.W., 2011. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 260–265.

Supplementary data

Genes	Primers	Sequence 5'-3'
<i>C9ORF72</i>	5'-FAM-Forward	CAA-GGA-GGG-AAA-CAA-CCG-CAG-CC
	Reverse	GGA-TAA-CAA-TTT-CAC-ACA-GGG-GGC-CCG-CCC-CGA-CCA-CGC-CCC-GGC-CCC-GGC-CCC-GG
<i>MARCKSL1</i>	5'-FAM-Forward	GCC-AGG-TGG-GTA-CGC-TTG-GC
	Reverse	GGA-TAA-CAA-TTT-CAC-ACA-GGT-CCC-GGG-CCG-GTC-TTT-GCG-CGC-GGC-CCC-GGC-CCC-GG
<i>NUB1</i>	5'-FAM-Forward	CCG-ACT-GGG-CAC-CTC-TCC-TGG
	Reverse	GGA-TAA-CAA-TTT-CAC-ACA-GGC-GAA-GCC-CGG-CCC-ACC-GCT-CCC-GGC-CCC-GGC-CCC-GG
All genes	M13 reverse	GGA-TAA-CAA-TTT-CAC-ACA-GG

Supplementary table 1: Primers used for repeat-primed PCR reactions.

Locus (Human)	Gene symbol	Gene name	Localisation*
1p13	KCNA2	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 2	I
1p21.3	SLC44A3	Solute carrier family 44 member 3	E
1p35.1	MARCKSL1	MARCKS-like 1	I
1q21	MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	P
2q24.3	STK39	Serine threonine kinase 39	E
2q37.3	LRRFIP1	Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	E
3q13	CASR	Calcium-sensing receptor	I
3q27	CHRD	Chordin	E
4p16.3	DGKQ	Diacylglycerol kinase	E
4q21.21	BMP2K	BMP2 inducible kinase	E
4q21.22	TMEM150C	Transmembrane protein 150C	I
4q26	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	E
4q35.1	FAM149A	Family with sequence similarity 149, member A	P
5q34	FGF18	Fibroblast growth factor 18	I
5q35.3	RGS14	Regulator of G-protein signaling 14	I
6p21	ITPR3	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 3	I
6p21.1	RRP36	Ribosomal RNA processing 36 homolog (S. cerevisiae)	E
6q21	ZBTB24	Zinc finger and BTB domain containing 24	P
6q25.3	ARID1B	AT rich interactive domain 1B	P
7q31.3	WASL	Wiskott-Aldrich syndrome-like	I
7q36.1	NUB1	Negative regulator of ubiquitin-like protein 1	I
8q22.2	NCALD	Neurocalcin delta	E
8q24.3	BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1	I
8q24.3	SHARPIN	SHANK-associated RH domain interactor	I
9p21.2	C9orf72	Chromosome 9 open reading frame 72	I
9q31	TMEFF1	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1	I
9q34	ST6GALNAC4	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 4	P
9q34.11	PRRX2	Paired related homeobox 2	E
9q34.3	PRRC2B	Prolin-rich coiled-coil 2B	I
9q34.3	CACNA1B	Calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	I
9q34.3	GPSM1 / AGS3	G-protein signaling modulator 1	I
10q22.2	AGAP5	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 5	P
10q24.31	LZTS2 / LAPSER1	Leucine zipper tumor suppressor 2	E
10q26	GPR123	G protein-coupled receptor 123	I
10q26.3	JAKMIP3 / NECC2	Janus kinase and microtubule interacting protein 3	I
11p15.5	AP2A2	Adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit	I
11p15.5	CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	E
11p15.5	CHID1	Chitinase domain containing 1	E
12p13	PTMS	Parathyromosin	E
12q13.13	POU6F1 / BRN5	POU class 6 homeobox 1	P
13q14	RCBTB1	Regulator of chromosome condensation and BTB domain containing protein	P
13q34	TFDP1	Transcription factor Dp-1	I
15q15	TUBGCP4	Tubulin, gamma complex associated protein 4	P
16p11.2	RABEP2	Rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 2	E
16p13.3	CACNA1H	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit	E
16p13.3	CRAMP1L	Crm, cramped-like (Drosophila)	I
16p13.3	RHBDF1	Rhomboid 5 homolog 1 (Drosophila)	I
16p13.3	UNKL	Unkempt homolog (Drosophila)-like	I
16q12	ZNF423	Zinc finger protein 423	I
16q12.1	PAPD5	PAP associated domain containing 5	E
17q12	ARHGAP23	Rho GTPase protein activating 23	I
17q23.2	TBX2	T-box 2	E
17q23.3	SCN4A	Sodium channel voltage gated type IV, alpha subunit	I
18q12	ZNF24	Zinc finger protein 24	I
18q23	ZNF516	Zinc finger protein 516	I
18q23	PARD6G	Par-6 family cell polarity regulator gamma	P
19p13.3	TNFAIP8L1	Tumor necrosis factor (TNF)-alpha induced protein 8	E
19q13.12	USF2	Upstream transcription factor 2	I
19q13.2	ZFP36 / TPP	Ring finger protein, Tritetraprofin	P
19p13.3	HCN2	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel	I
19p13.3	MED16	Mediator complex subunit 16	I
19q13.33	LRR48	Leucine rich repeat containing protein 48	P
20p13	RBCK1 / RNFS4 / HOIL1	Ring finger protein 54	I
20q11.21	RBM12	RNA binding motif protein 12	E
20q13.3	OSBPL2	Oxysterol binding protein-like 2	I
20q13.3	TCFL5	Transcription factor like 5	P
20q13.33	HRH3	Histamine receptor H3	E
20q13.33	TAF4 / TAFII130	TBP associated factor 4 RNA polymerase 2	E
22q13	PIM3	Pim-3 oncogene	I
22q13.1	CBX6	Chromobox homolog 6	I
Xp11.22	HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase	I
Xp11.23	USP27X	Ubiquitin specific peptidase 27, X-linked	E
Xp22.12	SH3KBP1	SH3-domain kinase binding protein 1	P
Xp22.3	SHROOM2	Shroom family member 2	P

* P (Promoter; region -100 to 0), E (Exon), I (Intron)

Supplementary table 2: Genes of the Human genome containing hexanucleotide repeats.

Advances in Cellular Models to Explore the Pathophysiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis

C. Veyrat-Durebex · P. Corcia · A. Dangoumau ·
F. Laumonnier · E. Piver · P. H. Gordon · C. R. Andres ·
P. Vourc'h · H. Blasco

Received: 3 June 2013 / Accepted: 15 October 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the most common adult-onset motor neuron disorder, is fatal for most patients less than 3 years from when the first symptoms appear. The aetiologies for sporadic and most familial forms of ALS are unknown, but genetic factors are increasingly recognized as causal in a subset of patients. Studies of disease physiology suggest roles for oxidative stress, glutamate-mediated excitotoxicity or protein aggregation; how these pathways interact in the complex pathophysiology of ALS awaits elucidation. Cellular models are being used to examine disease mechanisms. Recent advances include the availability of expanded cell types, from neuronal or glial cell culture to motoneuron–astrocyte co-culture genetically or environmentally modified. Cell culture experiments confirmed the central role of glial cells in ALS. The recent adaptation of induced pluripotent stem cells (iPSC) for ALS modeling could allow a broader perspective and is expected to generate new hypotheses, related particularly to mechanisms underlying genetic factors. Cellular models have provided meaningful advances

in the understanding of ALS, but, to date, complete characterization of in vitro models is only partially described. Consensus on methodological approaches, strategies for validation and techniques that allow rapid adaptation to new genetic or environmental influences is needed. In this article, we review the principal cellular models being employed in ALS and highlight their contribution to the understanding of disease mechanisms. We conclude with recommendations on means to enhance the robustness and generalizability of the different concepts for experimental ALS.

Keywords Amyotrophic lateral sclerosis · In vitro models · Motor neuron · Astrocyte · Co-culture

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), an age-related neurodegenerative disorder, is characterized by progressive motor weakness that leads to death within 2 to 5 years from onset [1]. This fatal condition is due to the degeneration of α - and γ -motor neurons in the cerebral cortex, brainstem and spinal cord [2, 3]. Sporadic forms (SALS) account for 90 % of ALS. There are phenotypic similarities between sporadic and familial ALS (FALS), suggesting similar pathophysiological mechanisms. The pathogenesis of ALS is hypothesized to have genetic and environmental influences. Familial cases are usually inherited in an autosomal dominant pattern [4]. The first gene identified as involved in ALS was *SOD1*, which encodes the free radical-scavenging enzyme copper–zinc superoxide dismutase 1 [5] and explains about 15 % of FALS. Other genes, including *TARDBP* (TAR DNA-binding protein 43) [6], *FUS* (fused in sarcoma) [7, 8] and angiogenin (*ANG*) [9], have been implicated in ALS. Recently, a large GGGGCC repeat expansion in the first intron of the *C9orf72* gene was discovered in patients with FALS or familial frontotemporal

C. Veyrat-Durebex (✉) · P. Corcia · A. Dangoumau ·
F. Laumonnier · C. R. Andres · P. Vourc'h · H. Blasco
Equipe « Neurogénétique et neurométabolomique », Université
François-Rabelais de Tours, UMR INSERM U930, 37032 Tours,
France
e-mail: charlotte.veyrat@live.fr

C. Veyrat-Durebex · C. R. Andres · P. Vourc'h · H. Blasco
Laboratoire de Biochimie et de biologie moléculaire, CHRU de
Tours, 37044 Tours, France

P. Corcia
Service de Neurologie, CHRU de Tours, 37044 Tours, France

E. Piver
INSERM U966, 37032 Tours, France

P. H. Gordon
Hôpital la Pitié Salpêtrière, APHP, Paris, France

Published online: 07 November 2013

 Springer

dementia (FTD) [10, 11]. *C9orf72* now appears to be the principal genetic cause of ALS, accounting for approximately 39.3 % of FALS and 7 % of SALS [12]. An oligogenic hypothesis of ALS suggests that known mutations (*ANG*, *C9orf72* or homozygous *TARDBP*) may co-occur more frequently in ALS than expected by chance [13]. The low overall frequency of mutations in identified genes (48 % of FALS and 8 % of SALS [13]) also implies the involvement of other pathogenic factors. Moreover, phenotypic discordance in monozygotic twins suggests that aetiologies may result from the association of different genetic and environmental influences [14]. Environmental risk factors such as ingestion of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) [15, 16] or exposure to heavy metals [17] have been described. Other risk factors have been implicated in the aetiology, such as cigarette smoking [18], repeated or severe trauma [19] and lifetime physical activity especially seen in professional soccer players and Gulf War veterans [20].

Glutamate excitotoxicity, oxidative stress [21], mitochondrial dysfunction [22], abnormal protein aggregation [23], hypoxia [24, 25], alterations in RNA metabolism [26] and neuroinflammation [27] (Fig. 1) appear to be involved in the pathophysiology of ALS. In vitro, ex vivo and in vivo studies are being employed to unravel the complex interaction of the different pathways. Among the different strategies is examination of post-mortem tissue [29–31], which has provided clues to numerous mechanisms that were subsequently described in more detail using in vivo or in vitro studies. Proof of a mechanism requires study of biological samples taken from ALS patients [32–35].

Data derived from experimental models are being used to (1) assess the earliest events in motor neuron death, (2) improve knowledge of pathophysiological mechanisms and (3) identify new therapeutic targets.

Animal models, primarily transgenic rodents, were first developed in the 1990s [36]. Mutant SOD1 mice have been used to investigate disease mechanisms and to test potential new therapies [37]. Advantages of murine models include the ability to study the effects of genetic mutations or environmental stresses on animal behavior and function. The first mutation discovered was in the *SOD1* gene on chromosome 21 [5]. *SOD1* mutations were subsequently used to create a transgenic animal model that has been very important in screening new drugs and studying disease physiology. Currently, more than 160 mutations in the gene have been identified [4]. While most underlie FALS, 5 % of patients with SALS carry similar mutations [4]. Animal models can help determine the effect of a new agent on disease physiology. No model perfectly recapitulates the human condition; many positive studies in animals could not be replicated in patients, at least in part because of methodological problems in animal and human trials and also because of the complex nature of ALS [38]. While other transgenic animal models are under

development, the SOD1 rodent is still considered an important standard for screening potential new drugs [39]. Consensus approaches to testing agents in the model, including assessment of dose and pharmacokinetic profiles, are now published [39].

Cellular models have been used to investigate disease-specific features at the level of the motor neuron. Some laboratories utilize unicellular organisms such as yeast [40], but, in this review, we will focus on multi-cellular models because of their broader scope and ability to model more complex physiology. A robust cellular model has to be both easy to use and complex enough to recapitulate one complete part of the pathophysiology of the disease. Cell cultures have been used to explore cell viability, apoptosis, protein aggregation, receptor function and enzyme activity in ALS since the 1980s. As a whole, work using cell culture has been important in showing the role of astrocytes on selective motor neuron degeneration in ALS. They have also contributed to improved quality of experiments done with cellular models. This review aims to assess advances in the development of in vitro models and describe their continued relevance in the ongoing quest to fully elucidate the pathophysiology of ALS.

Genetically Modified and Environmental Models of ALS

Genetically Modified Models of Familial ALS

Cellular models of FALS have been based mainly on the overexpression of mutant SOD1. New models utilizing overexpression of *FUS* and *TARDBP* are being developed. The cells used most often in genetic models are fibroblasts derived from biopsies or cells from post-mortem tissues from ALS patients [41, 42] and cells taken from animal models of ALS [43], usually transgenic *SOD1* rodents. The discovery that the repeat expansion in the *C9orf72* gene is a principal genetic risk factor for ALS brings with it the possibility of new experimental models for ALS.

Cultured cell lines can also be modified to overexpress ALS-related genes. The most widely used method to overexpress genes is transfection, usually based on cationic lipids. Transfection with plasmid DNA containing a gene of interest produces variable yield depending on the cell line. This method has been used to study the expression of modified proteins involved in ALS, including TDP-43 [44] and misfolded SOD1 [45], explore different signaling pathways [46] and examine cellular responses to manipulation of enzymes or receptors [47].

Viral transduction, using lenti- or adeno-viral vectors, is an alternative approach to production of cell culture models using gene overexpression. This method results in more efficient gene transfer but requires special facilities with specialized containment laboratories depending on the class of vector.

Viral transduction was used to express the protein SUMO1 (small-ubiquitin-like modifier 1) in astrocytes while describing the sumoylation of EAAT2 (excitatory amino acid transporter 2) in co-cultured astrocytes and motor neurons [48]. An adeno-associated virus vector was utilized for examination of the proteins CRMP2 and CRMP4a (collapsin response mediator protein) in primary motor neuron culture; research in this model has shown abbreviated motor neuron survival in cells overexpressing a CRMP4a variant found in some ALS patients [49]. Transfection and transduction methods can also express siRNA [50] or shRNA [51] in cellular models of ALS, mediating depletion of targeted proteins at translation. Transfection or transduction yields are targeted according to the objectives of a study; the scope of the results can be limited if the model insufficiently represents the genetic environment.

Environmental Models of ALS

L-BMAA has been added to cell cultures to measure levels toxic to motor neurons. In one model, low concentrations of L-BMAA disturb protein homeostasis, inducing endoplasmic reticulum

stress while high concentrations induce excitotoxicity and oxidative stress [52]. The effect of exposure to heavy metals has also been explored in cellular models. After cadmium exposure, neuronal cells have reduced Cu,Zn-SOD (SOD1) enzyme activity and apoptosis induced by altered oxidative species [53].

Some authorities use oxidative stress and glutamate-mediated excitotoxicity to mimic the environment in ALS (Fig. 1). Different methods can induce oxidative stress, including exposure to hydrogen peroxide (H_2O_2 , 100–300 μM) over 1 to 24 h [54, 55] or to L-buthionine sulfoximine (BSO, 25 to 200 μM) [56]. Oxidative toxicity to motor neuron cell lines and primary neuronal cells has been induced by cobalt chloride ($CoCl_2$) or chronic sustained hypoxia (0.1 % O_2) in order to explore the link between hypoxia and oxidative stresses in neuronal death in ALS [57]. Primary mouse motor neuron cultures have been exposed to atmospheric hypoxia in chambers with 10, 3 and 1 % O_2 for 24 h to study the regulation of angiogenin in motor neurons under hypoxic conditions [58]. Oxidative stress occurs in both familial and sporadic ALS, but the underlying causes are unknown. Reactive oxygen species (ROS) are associated with mitochondrial

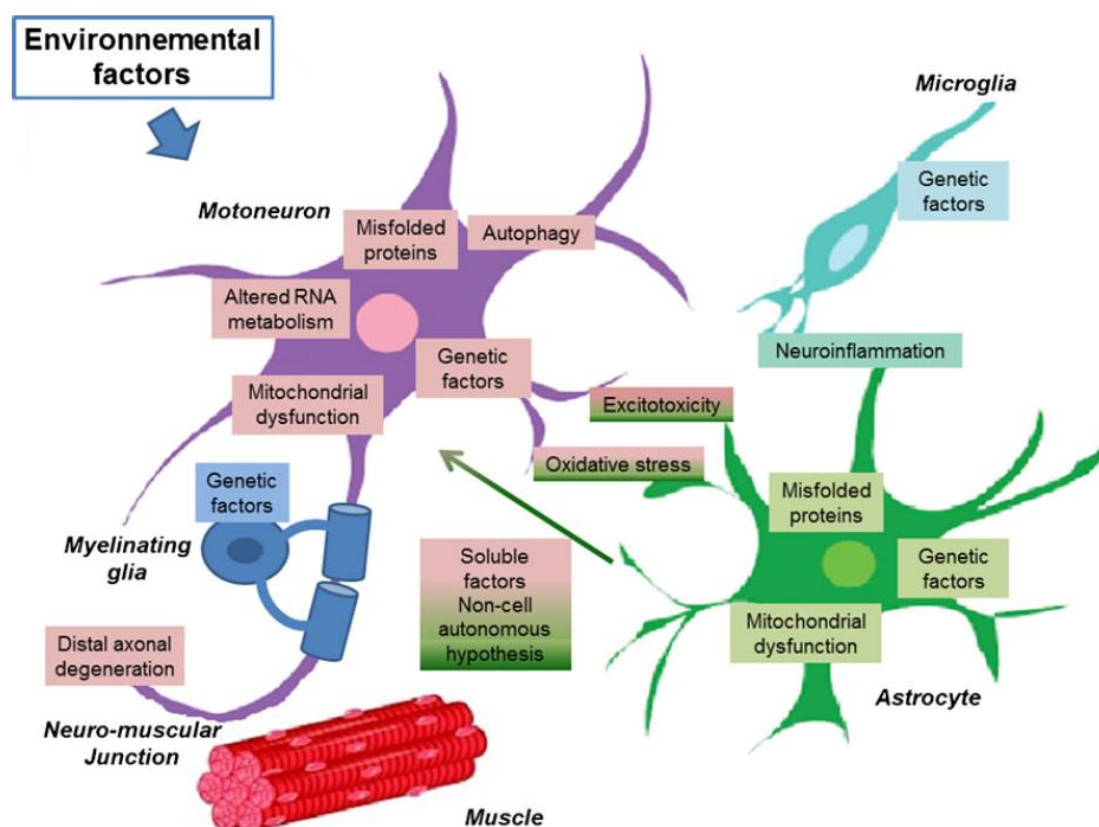


Fig. 1 Overview of mechanisms of motor neuron degeneration in ALS. Astrocytes and microglia contribute to MN (motor neuron) degeneration through neuroinflammation. Myelinating glia such as oligodendrocytes in central nervous system and Schwann cells in peripheral nervous system also seem involved in ALS pathophysiology. Astrocytes are involved in MN degeneration by secretion of toxic soluble factors; this is the non-cell

autonomous hypothesis. This close communication between motor neuron and astrocyte contributes to oxidative stress and excitotoxicity. The dying-back hypothesis involves the role of muscle in MN degeneration. This representation is a simplification of the various observations made in these recent years in ALS research and is based on the review of Ferraiuolo et al. [28] and a synthesis of the literature

dysfunction and mutations in the *SOD1* gene, but no unifying explanation has been identified. In vitro models of oxidative

stress are widely used in ALS research, but how well they represent the true disease is unknown.

Table 1 Cells in ALS studies and their use for exploration of pathophysiology of ALS

Type of cell	Origin of cell ^a	Pathophysiology hypothesis tested in this model	References (examples)
Primary neurons	Primary cell cultures from rodent cortices or hippocampi	Genetic factors and non-cell autonomous hypothesis	[61]
		Mitochondrial dysfunction	[62]
		Excitotoxicity	[63]
		Oxidative stress	[43]
Primary motor neurons	Primary cell cultures from rodent cortices, hippocampi, or spinal cords [64]	Genetic factors (<i>SOD1</i>)	[65]
		Mitochondrial dysfunction and misfolded proteins	[66]
Primary glial cells	Primary cell cultures from rodent cortices, hippocampi, or spinal cords	Misfolded proteins	[67]
	Astrocytes and oligodendrocytes [68, 69]	Neuroinflammation	[70]
	Microglia [71]	Non-cell autonomous hypothesis	Tables 1, 2 and 3
	Schwann cells [85]		
Neuro-2a	Mouse cell line from neuroblastoma	Mitochondrial dysfunction and misfolded proteins	[86]
		Genetic factors	[87]
		Oxidative stress	[88]
SK-N-SH	Human cell line from metastatic bone marrow of a human with neuroblastoma	Misfolded proteins	[44]
SH-SY5Y	Clone from SK-N-SH cell line	Mitochondrial dysfunction	[89, 90]
		Misfolded proteins	[91]
		Oxidative stress	[92]
PC12	Rat cell line from pheochromocytoma [93]	Misfolded proteins	[94]
		Genetic factors	[95, 96]
		High-throughput screening	[97, 98]
NSC-34	Mouse cell line from the fusion of MN and neuroblastoma [99, 100]	Misfolded proteins	[101]
		Genetic factors (<i>SOD1</i>)	[65]
		Mitochondrial dysfunction	[66]
		screening antioxidants	[102]
		Oxidative stress	[56, 103]
		Excitotoxicity	[104]
		Hypoxia	[57]
VSC 4.1	Cell line from the fusion of rat embryonic mesencephalon cells and murine neuroblastoma [105]	SIRT1 as therapeutic target	[106]
		Toxicity of Ig from ALS patients	[107]
HEK293	Human embryonic kidney cell line	Misfolded proteins	[101]
		Genetic factors (<i>SOD1</i>)	[65]
		Oxidative stress	[108]
HeLa	Human cell line from metastasis of human cervical cancer	Misfolded proteins	[101]
		Genetic factors (<i>SOD1</i>)	[65]
Lymphoblasts	From patients' lymphocytes [109]	Genetic factors (<i>SOD1</i>)	[65, 110]
Motor neurons from iPSC or hESC	Human stem cells [111, 112] or iPSC lines from ALS patients' fibroblasts [113]	Drug screening	[114]
		Genetic factors	[115]
		Non-cell autonomous hypothesis	[72, 116]
Astrocytes from iPSC, hESC or NPC	iPSC lines from ALS patients fibroblasts or hESC [117] or NPC [41]	Non-cell autonomous hypothesis	[41, 77]

SOD1 superoxide dismutase 1, *SIRT1* sirtuin 1, *Ig* immunoglobulin, *iPSC* induced pluripotent stem cells, *hESC* human embryonic stem cells, *NPC* neural progenitor cells

^aReferences including detailed culture methodology

Cell models of glutamate-mediated excitotoxicity are based on poorly functioning excitatory amino acid transporters (EAAT2) or activation of post-synaptic receptors. Exposure of primary neuronal cultures to glutamate, AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) and NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) at various concentrations has been used to assess the effects of excitotoxicity on AMPA and NMDA receptors [59]. A model of slow glutamate excitotoxicity was created by inhibition of the glutamate transporter by threo-hydroxyaspartate, inducing motor neuron toxicity detected by measurement of choline acetyltransferase (ChAT) activity [60].

The models based on slow environmental stresses seem to adequately represent the evolution of human pathology. However, the strategies that expose cells to chronic stress are currently too complex to ensure reproducibility and validity, and practical constraints inherent in cell models preclude sufficiently long exposures.

Types of Cell Cultures Used in Modeling ALS Pathophysiology

The different types of cells used in ALS models are presented in Table 1.

Neuronal Cell Cultures

Primary Neuronal and Motor Neuronal Cell Cultures

Most primary neuronal cell cultures used in experimental ALS are obtained from the cortex or hippocampus of rodent embryos (E14–E17) [43, 63, 118]. These sites provide a convenient source of neurons and have been used in numerous experiments of ALS. Until the emergence of motor neuron-like cell lines and the development of simple techniques to culture primary motor neurons, these sources provide the best alternative for the study of neurodegeneration in ALS.

Primary cultures of motor neurons are created from the spinal cords of rodent embryos [64, 119]. Because motor neurons in spinal cord constitute a small population, cultures must be enriched and purified. Different enrichment techniques are based on differences between motor neurons and glial cells. Treatment with cytosine arabinoside (Ara-C) one technique, but cell loss is high, about 90 %, so yields are low [120]. Because of their large size, motor neurons can also be separated, on density gradients such as Ficoll [121], Nycodenz [122] or metrizamide [123, 124]. Gradients are easy to use and produce rapid enrichments but also carry the disadvantage of damage to neurons during centrifugation. Cells labeled with a diffusible and non-lethal tracer can also be separated from spinal cord cell mixture in a fluorescence-activated cell sorter (FACS). This approach produces a population of pure motor

neurons (nearly 100 %) but is also hampered by injury to cells and low yield [125]. Lastly, motor neurons taken from the spinal cord can be isolated by immunopanning, in which antibodies are directed against an extracellular epitope on the motor neuron. Among possible epitopes, the p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}), which is highly expressed on motor neurons [64, 126], is most used. Depending on the antibody, an entire subpopulation of motor neurons can be selected or excluded. Immunopanning is quick and inexpensive, but yields vary.

Neuronal and Motor Neuron Cell Lines

Two major cell lines currently in use that have neuronal properties are Neuro-2a and SH-SY5Y. The Neuro-2a clone was established from a spontaneous neuroblastoma in an albino mouse more than 40 years ago [127]. Neuro-2a cells develop neurites and produce large quantities of microtubule proteins that are essential to axonal dynamics [128]. These cells have been applied widely to ALS and have proved useful for functional studies of misfolded SOD1, especially induction of motor neuron death through inhibition of the proteasome [45]. The SH-SY5Y clone, thrice subcloned from SK-N-SH cells [129], dates back to 1970 when metastatic neuroblastoma cells were taken from the bone marrow of an affected 4-year-old girl [130]. These neuroblast-like cell lines possess many, predominantly adrenergic, biochemical properties of neurons. SH-SY5Y and SK-N-SH cells have dopamine- β -hydroxylase activity and are able to convert tyrosine to dopamine, glutamate to GABA and choline to acetylcholine. SH-SY5Y cells that overexpress mutant SOD1-G93A reproduce the impaired mitochondrial calcium homeostasis seen in ALS [90], and SK-N-SH lines can be modified to study the TDP-43 protein as examples [44].

PC12 cells, derived from rat pheochromocytoma, are also sometimes used in neuronal models. These highly stable cells can be differentiated using nerve growth factor and employed in models of neurobiological and neurochemical systems [93, 131]. PC12 cells have been applied to studies that examine the structural properties and neuronal toxicity of ALS-associated SOD1 aggregates [131].

A serie of cell lines was developed by fusing aminopterin-sensitive neuroblastoma cells from N18TG2 mice with motor neuron-enriched embryonic spinal cord taken from 12–14-day-old mice [99]. Over 30 neuroblastoma-spinal cord (NSC) hybrids display neuron-like phenotypes. NSC-34 cells express additional properties specific to motor neurons, including generation of action potentials, expression of neurofilament triplet proteins, as well as synthesis, storage and release of acetylcholine. NSC-34 cells are capable of forming cholinergic synapses with co-cultured myotubes. Confluent cultures comprise two populations: small, undifferentiated cells that have the capacity to undergo cell division and larger,

multi-nucleate, non-dividing cells with numerous processes. A glutamate-sensitive motor neuron cell line was developed from NSC-34 [100]; modified growth conditions through serum depletion induced differentiation into mature cells that express functional glutamate receptors with the phenotypic characteristics of motor neurons. The NSC-34 cell line is considered the most stable motor neuron cell line model and is widely used. The model has been utilized to screen molecules capable of rescuing mutant SOD1 NSC-34, identified the neuroprotective properties of various antioxidants [102] and contributed to the understanding of motor neuron degeneration due to mutant FUS [132]. However, the outcome of functional studies can vary depending on whether the model derives from primary motor neurons or NSC-34 cells [133], so results must be interpreted within the context of broader scientific evidence.

Another cell line, VSC 4.1 (ventral spinal cord 4.1), obtained by the fusion of rat embryonic mesencephalon cells and the murine neuroblastoma cell line N18TG2 [105], is characterized by motor neuronal properties such as ChAT activity and is considered motor neuron-like but has rarely been used for ALS [106, 107].

Motor Neuron Cell Cultures Derived from Human Cells

Motor neurons can be derived from human embryonic stem cells (hESC) [111]. In 2008, two groups used hESC-derived motor neurons co-cultured with astrocytes to explore non-cell-autonomous degeneration in ALS [72, 116]. A high-yield purification technique for hESC generates limb-innervating motor neurons, considered to be among the earliest affected in ALS [112].

Induced pluripotent stem cells (iPSC) have been established from adult human fibroblasts by retroviral transduction of transcription factors and culture conditions [113]. In ALS, iPSC generated from patients can differentiate into motor neurons [42, 115]. These patient-specific iPSC possess properties of embryonic stem cells. Reprogramming of differentiated human somatic cells into a pluripotent state could produce cell cultures specific to a disease or a patient. iPSC generated from patients with different phenotypes might shed light on pathophysiological processes related to different causes of ALS. An open-access collection of fibroblast lines from patients carrying mutations linked to neurological diseases such as ALS has been made available to researchers, promoting more efficient research related to cultures of iPSC [134].

Glial Cell Cultures

Primary Glial Cell Cultures

Astrocytes are obtained from rodent spinal cord [135, 136] or cortex [68, 137]. Greater than 95 % purity is obtained by

shaking the cultures, typically after approximately 10 days, to remove microglia and oligodendrocytes [137]. Microglia can be acquired by shaking a mixed glial culture [138] or through mild trypsinization [71]. Glial cells are often used to assess neuroinflammatory mechanisms in ALS. These studies usually evaluate inflammatory markers in astrocytes or microglia overexpressing mutant SOD1-G93A [138, 139] or examine the influence of glial cells in neurodegeneration [75].

Oligodendrocytes can be obtained from postnatal mouse cortex after isolation of oligodendrocytic progenitor cells (OPC) by FACS and a 4-day culture. OPC then differentiate into mature oligodendrocytes on a differentiation media [69].

Schwann cells can be obtained from sciatic nerves of neonatal rats. After an enzymatic digestion of tissues, the cell suspension is seeded, and contaminating fibroblasts are removed by arabinoside C treatment. Schwann cell cultures are then purified by immunopanning with α -Thy1 antibodies in order to reach purity levels approaching 99 % [85].

Glial Cell Lines

Numerous glial cell lines are derived from human glioblastoma, astrocytoma or monocytic cells, but few have been applied to the field of ALS. In one study, a human astroglial cell line U87MG evaluated the inhibition of TDP43 protein by zinc [140]. Experiments comparing lactate uptake in oligodendrocytes and astrocytes using M003.13 oligodendroglioma and U87 astrocytoma cell lines have shown greater lactate transport in oligodendrocytes than in astrocytes, suggesting that oligodendrocytes are the principal metabolic supplier of lactate to neurons, a mechanism which seems to be impaired in ALS [69].

Glial Cell Cultures Derived from Human Cells

Post-mortem spinal cord neural progenitor cells (NPCs) are tripotent, capable of differentiating into neurons, oligodendrocytes and astrocytes [141]. Differentiation into astrocytes is achieved by supplementing the medium with 10 % fetal bovine serum [41]. NPC-derived astrocytes share a similar gene profile, with astrocytes isolated directly from human spinal cord [41], and are toxic to motor neurons, reinforcing the central role of astrocytes in the pathogenesis of ALS.

Recently, mature astrocytes were generated from human embryonic or induced pluripotent stem cells following brief exposure to fibroblast growth factor [117].

Other Cell Cultures

Muscle Cell Cultures

Cultures of muscle cells are usually made up of myotubes, developing multinucleated muscle cells. Human myocytes are

obtained from muscle biopsy and, in ALS, bear acetylcholine receptors with low affinity for acetylcholine [142]. By desmin staining, 70 % of cells obtained at biopsy are myogenic and can differentiate into myotubes [143]. Muscle cell cultures are used to study the “dying-back” hypothesis of ALS in which motor unit loss precedes degeneration of the cell body. Models using muscle cells in monoculture give a limited view of disease physiology as long as neuromuscular junctions (NMJ) are not reproduced. Accumulating evidence for involvement of muscle in ALS, including statements on Nogo-A [144], the potential biomarkers Akt and Factor XIIIIB [145], mitochondrial dysfunction [146], muscle wasting as related to glucose intolerance [147] and the “dying-back” phenomenon, means that experiments performed on muscular cells are important today and should be further developed to aid in the understanding of the role of peripheral factors in the demise of motor neurons. These models are a tool for examining the involvement of muscle in ALS but recapitulate complex ALS mechanisms less completely than neuronal or glial cell models.

The myoblast C2C12 cell line has occasionally been used in ALS and investigated the differential behavior of mutant SOD1-G93A in muscle cells compared to motor neurons, showing that mutant SOD1 did not produce aggregates in muscle cells due to a higher proteasome activity. Motor neurons appear to be more sensitive to mutant SOD1-induced oxidative stress than muscle cells [148].

Immortalized Lymphoblasts

Immortalized lymphoblast cell lines are established by infecting lymphocytes from ALS patients with a virus such as Epstein–Barr virus. Lymphoblast models have been used to describe wild-type *SOD1* as well as the post-translational modifications and over-oxidation that occur in ALS [109]. These models are best applied to simple functional studies such as studying the consequences of a gene mutation on protein expression but are not complex enough to give information on dynamic pathophysiological mechanisms.

Other Cell Lines

Other non-neural cell lines are also used in ALS because they are easy to transfect and grow, allowing the study of genetic mutations and peptides or effects of new drugs. Human embryonic kidney (HEK) cells are easily transfectable and have been used, for example, to study the FUS protein [108]. Aggregation of TPD-43 protein was recently explored using HeLa and U-2 OS (osteosarcoma cell line) cells [50].

Co-cultures

Studies that have examined genetic or environmental influences on co-culture are shown in Tables 2, 3 and 4.

Experimental studies, particularly on animal models, prompted the development of in vitro experiments using co-cultured motor neurons and glial cells. The role of astrocytes, the most abundant non-neuronal cells in the central nervous system, in neurodegeneration is increasingly appreciated [156]. Studies using FALS mice models have implicated non-neuronal cells, including microglia and astrocytes, in the progression of FALS [157–159]. Microglial activation has been observed in ALS patients [160]. Oligodendrocytes and Schwann cells are also implicated in ALS. These cells endow axons with the myelin sheath to speed up axonal transmission. The metabolic support that oligodendrocytes provide to neurons may be disturbed in ALS mouse and culture models as well as in ALS patients [69, 161]. Oligodendrocytes appear to degenerate before motor neurons in the ALS mouse model, forming immature oligodendrocytes, NG2+ cells, which leads to demyelination [162]. Suppression of central nervous system proliferative cells, including NG2+ progenitors, in the SOD1G93A mouse model accelerates disease progression [163]. Conversely, expression of active mutant SOD1 G37R in Schwann cells in one mouse model was neuroprotective, and the removal of the mutant SOD1 reduced survival [164]. Moreover, the expression of inactive mutant SOD1 G85R was neurotoxic, and its removal extended survival [165].

Co-culture models of ALS are most often astrocytes and motor neurons taken from rodents [151], though NSC-34 cells can be used in place of motor neurons [48]. Some investigators have adopted mixed spinal cord cultures to reproduce the cellular make up of the central nervous system [81]. Haastert et al. developed a co-culture system of rat embryonic motor neurons and Schwann cells in order to investigate the pathophysiology of diseases such as ALS [85]. These experiments allow the assessment of neuron–glia interactions and have highlighted the important role in ALS of astrocytes that harbor *SOD1* mutations (G37R, G85R, G93A) [72, 116, 150, 166, 167]. The non-cell autonomous effect of glia is defined by the influence on motor neuron survival of soluble factors released by glial cells [166, 168]. Various studies have shown that expression of mutant SOD1 (G37R, G85R, G93A) solely in motor neurons or astrocytes is insufficient for the development of disease in ALS models [158, 169–171]. The interaction of soluble factors transmitted between astrocytes and motor neurons is necessary [166, 172]. Activated glial cells have been observed in post-mortem tissue of ALS patients and the spinal cord of *SOD1* transgenic mice [173]. Culture of glial cells with motor neurons may best model the disease physiology of ALS currently.

Table 2 Studies using genetic conditions on co-cultures in ALS

Type of co-culture	Genetic conditions	Goals of study and main results	References
Human embryonic stem cell-derived MN and glial cells of P1-P3 mice	SOD1G93A, WT, or non-transgenic	MN degeneration and non-cell-autonomous hypothesis Glial cells carrying mSOD1G93A were toxic to MN	[72]
MN (E14-15 rats) in compartmental chambers with glial cells	Viral vector HSV SOD1 WT or G85R	MN degeneration Involvement of retrograde stress signaling in neurodegeneration	[73]
MN (spinal cord E13-14 mice) and microglia (P7-8 mice)	Non-transgenic and CD14 ^{-/-} (KO)	MN degeneration Extracellular mSOD1 was toxic to MN through activation of microglia	[74]
Astrocytes (spinal cord of P2-P4 mice) and primary MN (spinal cord of E12.5 mice) or NSC-34	Astrocytes from transgenic mouse SOD1G93A+ transfection of SUMO1	MN degeneration The expression of sumoylated EAAT2 in astrocytes was toxic to MN	[48]
astrocytes derived from NPC from ALS patients and mouse embryonic stem cell-derived MN	only one ALS case with a SOD1 mutation	MN degeneration and non-cell-autonomous hypothesis Astrocytes from familial and sporadic ALS patients were toxic to MN	[41]
Glial cell line and NSC-34	Adenovirus SOD1G93A and Alsin	Neuroinflammation and MN degeneration Coexpression of Alsin with mSOD1 attenuated gliosis and MN death induced by mSOD1	[75]
MN and microglia (ALS mice at onset or end-state of disease)	Mice SOD1G93A	Activation of microglia Microglia has a neuroprotective phenotype at disease onset and was neurotoxic at end-stage disease	[76]
Astrocytes (spinal cord E18 rat) and MN (spinal cord E15 rat)	The two cell types with SOD1WT or G93A	Mitochondrial dysfunction mSOD1G93A triggered a mitochondrial fragmentation in MN and decreased axonal transport of mitochondria	[62]
Astrocytes and MN from human iPSC	iPSC carrying ALS causing <i>TDP-43</i> mutation	MN degeneration Astrocytes carrying <i>TDP-43</i> mutation did not affect survival of MN: TDP-43 proteinopathies did not display an astrocyte non-cell-autonomous effect	[77]

MN motor neuron, SOD1 superoxide dismutase 1, WT wild type, HSV herpes simplex virus, KO knock out, mSOD1 mutant SOD1, SUMO1 small ubiquitin-related modifier 1, EAAT2 excitatory amino acid transporter 2, NPC neural progenitor cell, GCLM glutamate cystine ligase modifier subunit, iPSC induced pluripotent stem cells

Table 3 Studies using environmental conditions on co-cultures in ALS

Type of co-culture	Environmental conditions	Goals of study and main results	Authors
Astrocytes and MN or dorsal horn neurons (spinal cord E14 rats)	Excitotoxicity (kainic acid)	MN degeneration The selective MN death was due to Ca ²⁺ entry via AMPA receptors	[78]
Astrocytes (spinal cord newborn rats) and MN (spinal cord E15 rats)	Nitrotyrosine	MN death by apoptosis Nitrotyrosine induced apoptosis in MN, and co-culture with astrocytes delayed but not prevented MN death	[79]
Astrocytes (spinal cord P1-2 rats) and MN (spinal cord E15 rats) or MN p75 ^{NTR} KO mouse (E13)	Peroxyntirite and LPS treatments	Neurotoxicity of astrocytes Reactive astrocytes produced NGF causing apoptosis of MN in a mechanism involving nitric oxide	[80]
Mouse mixed spinal cord cultures (E12.5)	Excitotoxicity (AMPA receptor agonist) and oxidative stress	Glutamate transporters (EAATs) Oxidative stress was more gliotoxic and excitotoxicity more neurotoxic and the regulation of EAATs in response to stress was cell-specific	[81]
MN and astrocytes (Wistar rats)	Excitotoxicity (kainic acid), VEGF+/-	MN degeneration VEGF protected MN against excitotoxicity by up-regulation of GluR2	[82]
MN and astrocytes or Schwann cells	Excitotoxicity (kainic acid)	Drug screening of valproic acid and its derivatives	[83]
Mouse mixed spinal cord cultures (E12.5)	Excitotoxicity (AMPA receptor agonist) and oxidative stress	MN degeneration and non-cell-autonomous hypothesis Combined excitotoxic-oxidative insult generated astrogliosis before MN death	[84]

MN motor neuron, p75^{NTR} p75 neurotrophin receptor, KO knock out, LPS lipopolysaccharide, NGF nerve growth factor, AMPA 2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)propanoic acid, EAATs excitatory amino acid transporters, VEGF vascular endothelial growth factor, GluR2 subunit of AMPA receptor

Table 4 Studies using genetic and environmental conditions on co-cultures in ALS

Type of co-culture	Genetic conditions	Environmental conditions	Goals of study and main results	Authors
SH-SY5Y and human macrophages	SODG93A and SOD1WT	Infection	MN degeneration There was a link between infection and increased MN death	[149]
Astrocytes (spinal cord newborn transgenic mice) and human embryonic stem cell-derived neurons or primary neurons (spinal E12.5 mice)	SOD1: G93A, G37R, G85R, WT	Conditioned medium	MN degeneration and non-cell-autonomous hypothesis Astrocytes expressing mSOD1 released factors selectively toxic to MN	[150]
Astrocytes (spinal cord P0-P2) MN (spinal cord E12.5) from mice	Astrocytes and MN from transgenic SOD1WT or SODG93A mouse	Excitotoxicity (AMPA), apoptosis (staurosporine), oxidative stress (H ₂ O ₂)	Mitochondrial dysfunction The expression of mSOD1 in astrocytes induced mitochondrial dysfunction in MN	[151]
Astrocytes (spinal cord P1 mice) and MN (spinal cord E12.5 mice)	SOD1G93A and GFAP-Nrf2	Excitotoxicity (treatment of astrocytes with tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) and then MN plating), siRNA Mrp1	Protective effect of Nrf2 Toxicity of astrocytes expressing ALS-linked mutant hSOD1 to co-cultured MN was reversed by Nrf2 over-expression	[152]
Astrocytes (spinal cord P1 rat) and MN (spinal cord E15 rat)	SOD1G93A (astrocytes only) and non-transgenic	Lead (Pb) treatment	MN degeneration Treatment of astrocytes mSOD1 by low, non-toxic Pb concentrations up-regulated VEGF and decreased MN loss	[153]
Astrocytes (spinal cord P1 rat) and MN (spinal cord E15 rat)	Astrocytes from SODG93A or non-transgenic rats	ATP	Astrocyte-mediated MN degeneration Astrocytes became neurotoxic through an activation by the stimulation of the P2X ₇ receptor	[135]
Astrocytes (spinal cord P1 rat) and MN (E15 rat spinal cord)	Cells from rat SOD1G93A and non-transgenic	Treatment by dichloroacetate	MN survival Improvement of astrocytic mitochondrial function prevented MN survival	[154]
Astrocytes and MN (embryonic mice)	SOD1G93A and non-transgenic	Excitotoxicity (kainic acid)	MN survival N-Acetyl-glucagon-like peptide 1 was neuroprotective for MN	[155]

MN motor neuron, WT wild type, AMPA 2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)propanoic acid, H₂O₂ hydrogen peroxide, GFAP glial fibrillary acidic protein, Nrf2 nuclear factor erythroid 2-related factor 2, siRNA small interfering RNA, Mrp1 multidrug resistance protein, ATP adenosine tri-phosphate

Distal axonal degeneration occurs early in ALS before symptoms develop and before neuronal cell death [174]. In theory, the disease could begin in the axon or at the NMJ and then spread proximally to the cell body [175]. While this hypothesis is debated [176], some studies have used muscle cells in co-culture with neurons or motor neurons to reproduce the NMJ and model the “dying-back” mechanism [143].

Characterization of In Vitro Models

Ideally, a cellular model should fulfill several criteria, usually described as construct, face and predictive validity [177]. Construct validity is the degree to which the model reflects the human disease. This criterion is the most difficult to quantify because the complexity of the disease cannot be reproduced by a single cell culture; construct validity is

limited to motor neuron degeneration in ALS. Face validity implies similar morphological and biochemical changes in the model as human ALS. Predictive validity means that the response of the model to various exogenous factors or treatments is comparable to that in humans.

Morphologic and Biochemical Characteristics

Morphological features are systematically evaluated using optical microscopy. Activity of certain enzymes such as ChAT is often considered a surrogate for motor neuron function. Immunocytochemistry is performed to evaluate culture purity. Antibodies are most often directed against specific markers of each cell type, i.e. GFAP or CD44 for astrocytes [41]; Ox-42 (a microglia specific integrin marker) for microglia [178]; olig2 for oligodendrocytes [69]; and β III-tubulin, MAP-2 (microtubule-associated protein 2), SMI-32 [81], ChAT [111] or p-75^{NTR} for neurons and motor neurons.

Immunocytochemistry with multi-staining identifies different cell types in co-culture [151]. Myocytes can be used to characterize motor neurons through the formation of synapses and synapsin-positive neurites [111].

Studies have yet to evaluate energetic metabolism in these models, a limitation to modeling a disease in which biochemical disturbances are central to the pathophysiology.

Assessment of Viability, Proliferation and Apoptosis

Cell death is assessed through evaluation of apoptosis and necrosis [179]. Autophagy is involved in motor neuron degeneration in ALS [180] but has so far not been thoroughly evaluated with in vitro experiments. The most widely used method to assess viability is counting the number of p-75^{NTR} positive primary motor neurons that display neurites longer than four cell bodies in diameter [181]. For other cell types, viability can be estimated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2'-5-diphenyltetrazolium bromide reduction [79] or blue trypan [151] assays. Measurement of cell proliferation is made by measuring the incorporation of thymidine analogues such as 5-bromo-2'-deoxyuridine [135] or [³H]-thymidine [79] into DNA. Apoptosis in ALS models is assessed using the apoptosis TUNEL assay [182, 183] or annexin V labeling as measured by flow cytometry [84].

Specific Validations

The validation of a model implies delineation of (1) the properties of individual cell types and (2) interaction between cells, no matter the model type. In SOD1-based models, validation includes, at minimum, Western blot analysis to confirm the overexpression of SOD1 protein [106]. Models of hypoxia have been validated by measuring increased expression of the protein hypoxia-inducing factor (HIF)-1 α [57, 58]. Identification of intracellular ROS using the fluorescence assay H₂DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein) can validate models of oxidative stress [184]. Assessment of cell-cell interactions is largely unexplored, counterbalancing the advantages of co-cultures.

Discussion

The principal cell models have meaningfully advanced the understanding of disease physiology in ALS. Cell models allow flexibility in studying disease dynamics, but the choice of model must be tailored to the purpose of the study. Most studies use targeted methodologies with objectives that include functional description of newly identified mutations, assessment of mitochondria function or visualization of aggregated proteins. In vitro cellular models have the advantage of less cellular heterogeneity than tissue models but lack a

“real in vivo environment”. In vitro models can serve as cell-based assays for drug screening or analysis of metabolomics or transcriptomics.

Genetic models are based principally on *SOD1* mutations, reflecting a small proportion of ALS. No therapeutic agent, other than riluzole, has been shown to be effective in SOD1-G93A mice [38]. The *C9orf72* gene may prove to be a more common cause of ALS, explaining the majority of FALS and approximately 8 % of SALS [13]. A non-ATG-initiated translation of the intronic GGGGCC repeat expansion leads to accumulation of protein aggregates in patients with FTL/D/ALS [185]. Properties of the C9orf72 protein are unknown, but expression of the expanded GGGGCC RNA repeat in neurons (neuro2a) and *Drosophila* causes neurodegeneration [186]. A C9orf72-based cellular model will be available soon. The hypothetical oligogenic aetiology for ALS could be best tested once in vitro oligogenic models have been developed.

Non-genetic factors also likely contribute to the pathogenesis of ALS. Oxidative stress has been described to be independent from genetic status [21], but the origins are cryptogenic. Environmental exposures are difficult to model because ALS is a chronic disease and most stresses must be applied acutely to in vitro models, a technical limitation requiring better understanding. No matter what type of stress and duration of application, environmental conditions applied to genetic models may be the most realistic approach to exploring the complex pathophysiology of ALS.

The use of cell lines for in vitro models is technically uncomplicated, inexpensive and does not require animal dissection or invasive procedures for patients. Cell growth is rapid and reproducible. Cell lines could be utilized by a variety of laboratories for transfection or transduction experiments as long as attention is given to technical limitations such as the number of cell passages that can modify differentiation of immortalized cells or induce epigenetic modifications. The major disadvantage to cell lines is that immortalization dissociates them from the physiological status of the

Table 5 General conditions to apply on experiments using cell models in ALS

To use a co-culture model based on motor neuron and glial cells
To favour dynamic studies with chronic environmental conditions to reproduce the kinetics of ALS disease
To validate the model including: (1) repetition of experiments more than four times, with less than 30 % of coefficient of variation for quantitative parameters, or with a concordance of results superior to 75 % for qualitative parameters; (2) morphological characterization (specific markers of cells and their interactions) and (3) systematic functional assays to characterize the genetic modification in cells and measurement of markers specifically induced by environmental stress
To characterize cell death by apoptosis, necrosis and autophagy evaluation

cells of origin. The bias induced by this transformation has to be taken into account [187].

Primary cultures are more difficult to work with; they are delicate, display contact inhibition and have higher mortality as well as a limited number of cell passages. The chief advantage to primary cultures is that the morphology, behavior and activity retain features similar to in vivo conditions. Creating primary motor neuron cultures can be laborious, taking time and effort, and requires in-depth knowledge of cell culture methodology in addition to animal dissection, from which neuronal cultures usually are taken. Cell cultures derived from patients with ALS are an alternative to best represent the true disease state, but the effects of cell reprogramming on epigenetic phenomena and cell stability are uncertain.

Monocultures are still used, having generated many hypotheses and discoveries about the pathophysiology of ALS [43, 172], but there are also limitations. Non-cell autonomous toxicity in ALS [166, 168] and interactions of astrocytes and neurons [188] are better examined in astrocyte–motor neuron co-culture, a better overall representation of ALS (Tables 2, 3 and 4). Co-culture experiments can be used to explore targeted physiological pathways or disease markers, including the so-called global studies that assess multiple concomitant mechanisms or markers in combination.

Consensus criteria for the best methods to characterize cell models have yet to be developed, leading to difficulty in reproducing results from laboratory to laboratory. Not all in vitro models are suitable for all targeted objectives. ALS is heterogeneous and is thought to have multifactorial aetiologies, so recommendations for validation cannot be generalized to every model. A given model can be characterized for a single application, such as expression of *SOD1* in a model of FALS or HIF-1 α expression in models of hypoxic damage. We suggest identifying a specific study target before model development, allowing for more rigorous hypothesis testing. For example, metabolic interactions inherent to the compartmentalization of brain metabolism may be best evaluated in a motor neuron–glia co-culture. Functional evaluation of a modified protein could be tested in neuronal cells and then evaluated in co-culture models to assess the effects of different cell types. General guidelines for the conduct of cell model experiments in ALS are shown in Table 5.

Conclusions

Most cellular models described in ALS, particularly co-culture models, have produced meaningful advances in understanding of the disease physiology. Cell cultures derived from human cells are a promising modality, but they might also generate ethical debate, especially over embryonic stem cells. A standardized approach to the characterisation of various models and model choice based on the scientific question

at hand will help improve study quality and reproducibility. Progress in the application of robust methodology to experiments done around the world will extend the scope and importance of cellular models of ALS.

Acknowledgments We thank the Association ARSLA (Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique) for its financial support.

References

- Korner S, Kollewé K, Ilseemann J, Müller-Heine A, Dengler R, Krampfl K, Petri S (2012) Prevalence and prognostic impact of comorbidities in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol Off J Eur Fed Neurol Soc*. doi:10.1111/ene.12015
- Saito M, Tomonaga M, Narabayashi H (1978) Histochemical study of the muscle spindles in parkinsonism, motor neuron disease and myasthenia. An examination of the pathological fusimotor endings by the acetylcholinesterase technic. *J Neurol* 219(4):261–271
- Swash M, Fox KP (1974) The pathology of the human muscle spindle: effect of denervation. *J Neurol Sci* 22(1):1–24
- Andersen PM, Al-Chalabi A (2011) Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* 7(11):603–615. doi:10.1038/nrneurol.2011.150
- Rosen DR (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364(6435):362
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319(5870):1668–1672
- Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH Jr (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323(5918):1205–1208
- Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleruche J, Gallo JM, Miller CC, Shaw CE (2009) Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323(5918):1208–1211
- Greenway MJ, Alexander MD, Ennis S, Traynor BJ, Corr B, Frost E, Green A, Hardiman O (2004) A novel candidate region for ALS on chromosome 14q11.2. *Neurology* 63(10):1936–1938
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung GY, Karydas A, Seeley WW, Josephs KA, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZK, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR, Rademakers R (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72(2):245–256. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.011
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC,

- Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Rytten M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister JB, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviita VM, Kaivorinne AL, Holtta-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wu J, Chio A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M, Heckeman D, Rogaeva E, Zinman L, Rothstein JD, Sendtner M, Drepper C, Eichler EE, Alkan C, Abdullaev Z, Pack SD, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams NM, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris HR, Tienari PJ, Traynor BJ (2011) A hexanucleotide repeat expansion in C9orf72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72(2):257–268. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.010
12. Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S, Chio A, Restagno G, Nicolaou N, Simon-Sanchez J, van Swieten JC, Abramzon Y, Johnson JO, Sendtner M, Pamphlett R, Orrell RW, Mead S, Sidle KC, Houlden H, Rohrer JD, Morrison KE, Pall H, Talbot K, Ansorge O, Hernandez DG, Arepalli S, Sabatelli M, Mora G, Corbo M, Giannini F, Calvo A, Englund E, Borghero G, Floris GL, Remes AM, Laaksovirta H, McCluskey L, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, Schellenberg GD, Nalls MA, Drory VE, Lu CS, Yeh TH, Ishiura H, Takahashi Y, Tsuji S, Le Ber I, Brice A, Drepper C, Williams N, Kirby J, Shaw P, Hardy J, Tienari PJ, Heutink P, Morris HR, Pickering-Brown S, Traynor BJ (2012) Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 11(4):323–330. doi:10.1016/s1474-4422(12)70043-1
 13. van Blitterswijk M, van Es MA, Hennekam EA, Dooijes D, van Rheeën W, Medic J, Bourque PR, Schelhaas HJ, van der Kooi AJ, de Visser M, de Bakker PI, Veldink JH, van den Berg LH (2012) Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 21(17):3776–3784. doi:10.1093/hmg/dd199
 14. Al-Chalabi A, Fang F, Hanby MF, Leigh PN, Shaw CE, Ye W, Rijdsdijk F (2010) An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81(12):1324–1326. doi:10.1136/jnnp.2010.207464
 15. Papapetropoulos S (2007) Is there a role for naturally occurring cyanobacterial toxins in neurodegeneration? The beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) paradigm. *Neurochem Int* 50(7–8):998–1003. doi:10.1016/j.neuint.2006.12.011
 16. Caller TA, Field NC, Chipman JW, Shi X, Harris BT, Stommel EW (2012) Spatial clustering of amyotrophic lateral sclerosis and the potential role of BMAA. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Motor Neuron Dis* 13(1):25–32. doi:10.3109/17482968.2011.621436
 17. Vinceti M, Bottecchi I, Fan A, Finkelstein Y, Mandrioli J (2012) Are environmental exposures to selenium, heavy metals, and pesticides risk factors for amyotrophic lateral sclerosis? *Rev Environ Health* 27(1):19–41
 18. Wang H, O'Reilly EJ, Weisskopf MG, Logroscino G, McCullough ML, Thun MJ, Schatzkin A, Kolonel LN, Ascherio A (2011) Smoking and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a pooled analysis of 5 prospective cohorts. *Arch Neurol* 68(2):207–213. doi:10.1001/archneurol.2010.367
 19. Pupillo E, Messina P, Logroscino G, Zoccollella S, Chio A, Calvo A, Corbo M, Lunetta C, Micheli A, Millul A, Vitelli E, Beghi E (2012) Trauma and amyotrophic lateral sclerosis: a case-control study from a population-based registry. *Eur J Neurol Off J Eur Fed Neurol Soc* 19(12):1509–1517. doi:10.1111/j.1468-1331.2012.03723.x
 20. Huismans MH, Seelen M, de Jong SW, Dorresteyn KR, van Doornaal PT, van der Kooi AJ, de Visser M, Schelhaas HJ, van den Berg LH, Veldink JH (2013) Lifetime physical activity and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. doi:10.1136/jnnp-2012-304724
 21. Barber SC, Shaw PJ (2010) Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med* 48(5):629–641. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.018
 22. Guegan C, Vila M, Rosoklija G, Hays AP, Przedborski S (2001) Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21(17):6569–6576
 23. Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD (2001) Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis* 8(6):933–941
 24. Just N, Moreau C, Lassalle P, Gosset P, Perez T, Brunaud-Danel V, Wallaert B, Destee A, Defebvre L, Tonnel AB, Devos D (2007) High erythropoietin and low vascular endothelial growth factor levels in cerebrospinal fluid from hypoxemic ALS patients suggest an abnormal response to hypoxia. *Neuromuscul Disord* 17(2):169–173
 25. Moreau C, Devos D, Gosset P, Brunaud-Danel V, Tonnel AB, Lassalle P, Defebvre L, Destee A (2010) Mechanisms of deregulated response to hypoxia in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a clinical study. *Rev Neurol* 166(3):279–283. doi:10.1016/j.neurol.2009.05.018
 26. Gagliardi S, Milani P, Sardone V, Pansarasa O, Cereda C (2012) From transcriptome to noncoding RNAs: implications in ALS mechanism. *Neurol Res Int* 2012:278725. doi:10.1155/2012/278725
 27. McGeer PL, McGeer EG (2002) Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26(4):459–470
 28. Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ (2011) Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 7(11):616–630. doi:10.1038/nrneurol.2011.152
 29. Corcia P, Pradat PF, Salachas F, Bruneteau G, Forestier N, Seilhean D, Hauw JJ, Meininger V (2008) Causes of death in a post-mortem series of ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Motor Neuron Dis* 9(1):59–62. doi:10.1080/17482960701656940
 30. Kirby J, Ning K, Ferraiuolo L, Heath PR, Ismail A, Kuo SW, Valori CF, Cox L, Sharrack B, Wharton SB, Ince PG, Shaw PJ, Azzouz M (2011) Phosphatase and tensin homologue/protein kinase B pathway linked to motor neuron survival in human superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J Neurol* 134(Pt 2):506–517. doi:10.1093/brain/awq345
 31. Sala G, Tremolizzo L, Melchionda L, Stefanoni G, Derosa M, Susani E, Pagani A, Perini M, Pettini P, Tavernelli F, Zarcone D, Ferrarese C (2012) A panel of macroautophagy markers in lymphomonocytes of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Motor Neuron Dis* 13(1):119–124. doi:10.3109/17482968.2011.611139
 32. Wuolikainen A, Moritz T, Marklund SL, Antti H, Andersen PM (2011) Disease-related changes in the cerebrospinal fluid metabolome in amyotrophic lateral sclerosis detected by GC/TOFMS. *PLoS ONE* 6(4):e17947. doi:10.1371/journal.pone.0017947
 33. Blasco H, Corcia P, Moreau C, Veau S, Fournier C, Vourc'h P, Emond P, Gordon P, Pradat PF, Praline J, Devos D, Nadal-Desbarats L, Andres CR (2010) ¹H-NMR-based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 5(10):e13223. doi:10.1371/journal.pone.0013223
 34. Kumar A, Bala L, Kalita J, Misra UK, Singh RL, Khetrapal CL, Babu GN (2010) Metabolomic analysis of serum by (1) H NMR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 411(7–8):563–567. doi:10.1016/j.cca.2010.01.016

35. von Neuhoff N, Oumeraci T, Wolf T, Kollewe K, Bewerunge P, Neumann B, Brors B, Bufler J, Wurster U, Schlegelberger B, Dengler R, Zapotka M, Petri S (2012) Monitoring CSF proteome alterations in amyotrophic lateral sclerosis: obstacles and perspectives in translating a novel marker panel to the clinic. *PLoS ONE* 7(9):e44401. doi:10.1371/journal.pone.0044401
36. Gurney ME (1994) Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 331(25):1721–1722
37. McGoldrick P, Joyce PI, Fisher EM, Greensmith L (2013) Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. doi:10.1016/j.bbdis.2013.03.012
38. Scott S, Kranz JE, Cole J, Lincecum JM, Thompson K, Kelly N, Bostrom A, Theodoss J, Al-Nakhala BM, Vieira FG, Ramasubbu J, Heywood JA (2008) Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Motor Neuron Dis* 9(1):4–15. doi:10.1080/17482960701856300
39. Ludolph AC, Bendotti C, Blaugrund E, Hengerer B, Löffler JP, Martin J, Meininger V, Meyer T, Moussaoui S, Robberecht W, Scott S, Silani V, Van Den Berg LH (2007) Guidelines for the preclinical in vivo evaluation of pharmacological active drugs for ALS/MND: report on the 142nd ENMC international workshop. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Motor Neuron Dis* 8(4):217–223. doi:10.1080/17482960701292837
40. Kryndushkin D, Ihrke G, Piemartiri TC, Shewmaker F (2012) A yeast model of optineurin proteinopathy reveals a unique aggregation pattern associated with cellular toxicity. *Mol Microbiol* 86(6):1531–1547. doi:10.1111/mmi.12075
41. Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD, Rao M, Eagle A, Kammesheidt A, Christensen A, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK (2011) Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol* 29(9):824–828. doi:10.1038/nbt.1957
42. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Golland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321(5893):1218–1221. doi:10.1126/science.1158799
43. Boutahar N, Wierinckx A, Camdessanche JP, Antoine JC, Reynaud E, Lassabliere F, Lachuer J, Borg J (2011) Differential effect of oxidative or excitotoxic stress on the transcriptional profile of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 cultured neurons. *J Neurosci Res* 89(9):1439–1450. doi:10.1002/jnr.22672
44. Shiina Y, Arima K, Tabunoki H, Satoh J (2010) TDP-43 dimerizes in human cells in culture. *Cell Mol Neurobiol* 30(4):641–652. doi:10.1007/s10571-009-9489-9
45. Urushitani M, Kurisu J, Tsukita K, Takahashi R (2002) Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 83(5):1030–1042
46. Boutahar N, Reynaud E, Lassabliere F, Borg J (2008) Timing differences of signaling response in neuron cultures activated by glutamate analogue or free radicals. *Brain Res* 1191:20–29. doi:10.1016/j.brainres.2007.11.016
47. Al-Saif A, Al-Mohanna F, Bohlega S (2011) A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 70(6):913–919. doi:10.1002/ana.22534
48. Foran E, Bogush A, Goffredo M, Roncaglia P, Gustincich S, Pasinelli P, Trotti D (2011) Motor neuron impairment mediated by a sumoylated fragment of the glial glutamate transporter EAAT2. *Glia* 59(11):1719–1731. doi:10.1002/glia.21218
49. Duplan L, Bernard N, Casseron W, Dudley K, Thouvenot E, Honnorat J, Rogemond V, De Bovis B, Aebischer P, Marin P, Raoul C, Henderson CE, Pettmann B (2010) Collapsin response mediator protein 4a (CRMP4a) is upregulated in motoneurons of mutant SOD1 mice and can trigger motoneuron axonal degeneration and cell death. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30(2):785–796. doi:10.1523/jneurosci.5411-09.2010
50. Budini M, Romano V, Avendano-Vazquez SE, Bembich S, Buratti E, Baralle FE (2012) Role of selected mutations in the Q/N rich region of TDP-43 in EGFP-12xQ/N-induced aggregate formation. *Brain Res* 1462:139–150. doi:10.1016/j.brainres.2012.02.031
51. Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Hutt KR, Vu AQ, Baughn M, Huelga SC, Clutario KM, Ling SC, Liang TY, Mazur C, Wanciewicz E, Kim AS, Watt A, Freier S, Hicks GG, Donohue JP, Shiue L, Bennett CF, Ravits J, Cleveland DW, Yeo GW (2012) Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat Neurosci* 15(11):1488–1497. doi:10.1038/nn.3230
52. Okle O, Stemmer K, Deschl U, Dietrich DR (2013) L-BMAA induced ER stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low nonexcitotoxic concentrations. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 131(1):217–224. doi:10.1093/toxsci/kfs291
53. Huang YH, Shih CM, Huang CJ, Lin CM, Chou CM, Tsai ML, Liu TP, Chiu JF, Chen CT (2006) Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu, Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *J Cell Biochem* 98(3):577–589. doi:10.1002/jcb.20772
54. Lee M, Hyun DH, Halliwell B, Jenner P (2001) Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative stress and cell death induced by hydrogen peroxide, 4-hydroxynonenal or serum deprivation: potentiation of injury by ALS-related mutant superoxide dismutases and protection by Bcl-2. *J Neurochem* 78(2):209–220
55. Soo KY, Atkin JD, Home MK, Nagley P (2009) Recruitment of mitochondria into apoptotic signaling correlates with the presence of inclusions formed by amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutations. *J Neurochem* 108(3):578–590. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05799.x
56. Chi L, Ke Y, Luo C, Gozal D, Liu R (2007) Depletion of reduced glutathione enhances motor neuron degeneration in vitro and in vivo. *Neuroscience* 144(3):991–1003. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.09.064
57. Xu R, Wu C, Zhang X, Zhang Q, Yang Y, Yi J, Yang R, Tao Y (2011) Linking hypoxic and oxidative insults to cell death mechanisms in models of ALS. *Brain Res* 1372:133–144. doi:10.1016/j.brainres.2010.11.056
58. Sebastia J, Kieran D, Breen B, King MA, Nettelband DF, Joyce D, Fitzpatrick SF, Taylor CT, Prehn JH (2009) Angiogenin protects motoneurons against hypoxic injury. *Cell Death Differ* 16(9):1238–1247. doi:10.1038/cdd.2009.52
59. Mahajan SS, Thai KH, Chen K, Ziff E (2011) Exposure of neurons to excitotoxic levels of glutamate induces cleavage of the RNA editing enzyme, adenosine deaminase acting on RNA 2, and loss of GLUR2 editing. *Neuroscience* 189:305–315. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.05.027
60. Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncel RW (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(14):6591–6595
61. Fritz E, Izaurieta P, Weiss A, Mir FR, Rojas P, Gonzalez D, Rojas F, Brown RH, Madrid R, van Zundert B (2013) Mutant SOD1-expressing astrocytes release toxic factors that trigger motor neuron death by inducing hyper-excitability. *J Neurophysiol*. doi:10.1152/jn.00500.2012
62. Song W, Song Y, Kincaid B, Bossy B, Bossy-Wetzel E (2013) Mutant SOD1G93A triggers mitochondrial fragmentation in spinal cord motor neurons: neuroprotection by SIRT3 and PGC-1alpha. *Neurobiol Dis* 51:72–81. doi:10.1016/j.nbd.2012.07.004
63. Caioli S, Curcio L, Pieri M, Antonini A, Marolda R, Severini C, Zona C (2011) Substance P receptor activation induces

- downregulation of the AMPA receptor functionality in cortical neurons from a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 44(1):92–101. doi:10.1016/j.nbd.2011.06.008
64. Camu W, Henderson CE (1992) Purification of embryonic rat motoneurons by panning on a monoclonal antibody to the low-affinity NGF receptor. *J Neurosci Methods* 44(1):59–70
 65. Fujisawa T, Homma K, Yamaguchi N, Kadowaki H, Tsuburaya N, Naguro I, Matsuzawa A, Takeda K, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Nishitoh H, Ichijo H (2012) A novel monoclonal antibody reveals a conformational alteration shared by amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants. *Ann Neurol* 72(5):739–749. doi:10.1002/ana.23668
 66. Prell T, Lautenschlager J, Witte OW, Carri MT, Grosskreutz J (2012) The unfolded protein response in models of human mutant G93A amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 35(5):652–660. doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08008.x
 67. Roberts K, Zeineddine R, Corcoran L, Li W, Campbell IL, Yerbury JJ (2013) Extracellular aggregated Cu/Zn superoxide dismutase activates microglia to give a cytotoxic phenotype. *Glia* 61(3):409–419. doi:10.1002/glia.22444
 68. Chen Y, Balasubramanian V, Peng J, Hurlock EC, Tallquist M, Li J, Lu QR (2007) Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc* 2(5):1044–1051. doi:10.1038/nprot.2007.149
 69. Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD (2012) Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487(7408):443–448. doi:10.1038/nature11314
 70. Berger JV, Dumont AO, Focant MC, Vergouts M, Sternotte A, Calas AG, Goursaud S, Hermans E (2012) Opposite regulation of metabotropic glutamate receptor 3 and metabotropic glutamate receptor 5 by inflammatory stimuli in cultured microglia and astrocytes. *Neuroscience* 205:29–38. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.12.044
 71. Saura J, Tusell JM, Serratos J (2003) High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44(3):183–189. doi:10.1002/glia.10274
 72. Di Giorgio FP, Boulting GL, Bobrowicz S, Eggan KC (2008) Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell* 3(6):637–648
 73. Perlson E, Jeong GB, Ross JL, Dixit R, Wallace KE, Kalb RG, Holzbaur EL (2009) A switch in retrograde signaling from survival to stress in rapid-onset neurodegeneration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29(31):9903–9917. doi:10.1523/jneurosci.0813-09.2009
 74. Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien JP, Appel SH (2010) Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia* 58(2):231–243. doi:10.1002/glia.20919
 75. Li Q, Spencer NY, Pantazis NJ, Engelhardt JF (2011) Alsln and SOD1(G93A) proteins regulate endosomal reactive oxygen species production by glial cells and proinflammatory pathways responsible for neurotoxicity. *J Biol Chem* 286(46):40151–40162. doi:10.1074/jbc.M111.279711
 76. Liao B, Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Appel SH (2012) Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp Neurol* 237(1):147–152. doi:10.1016/j.expneurol.2012.06.011
 77. Serio A, Bilican B, Barmada SJ, Ando DM, Zhao C, Siller R, Burr K, Haghi G, Story D, Nishimura AL, Carrasco MA, Phatnani HP, Shum C, Wilmut I, Maniatis T, Shaw CE, Finkbeiner S, Chandran S (2013) Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi:10.1073/pnas.1300398110
 78. Van Den Bosch L, Vandenbergh W, Klaassen H, Van Houtte E, Robberecht W (2000) Ca²⁺-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J Neurol Sci* 180(1–2):29–34
 79. Peluffo H, Shacka JJ, Ricart K, Bisig CG, Martinez-Palma L, Pritsch O, Kamaid A, Eiserich JP, Crow JP, Barbeito L, Estevez AG (2004) Induction of motor neuron apoptosis by free 3-nitro-L-tyrosine. *J Neurochem* 89(3):602–612. doi:10.1046/j.1471-4159.2004.02363.x
 80. Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Castellanos R, Viera L, Beckman JS, Estevez AG, Barbeito L (2004) Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 89(2):464–473. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02357.x
 81. Zagami CJ, Beart PM, Wallis N, Nagley P, O'Shea RD (2009) Oxidative and excitotoxic insults exert differential effects on spinal motoneurons and astrocytic glutamate transporters: implications for the role of astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 57(2):119–135. doi:10.1002/glia.20739
 82. Bogaert E, Van Damme P, Poesen K, Dhondt J, Hersmus N, Kiraly D, Scheveneels W, Robberecht W, Van Den Bosch L (2010) VEGF protects motor neurons against excitotoxicity by upregulation of GluR2. *Neurobiol Aging* 31(12):2185–2191. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.12.007
 83. Raganokova D, Song Y, Nau H, Dengler R, Krampfl K, Petri S (2010) Modulation of synaptic transmission and analysis of neuroprotective effects of valproic acid and derivatives in rat embryonic motoneurons. *Cell Mol Neurobiol* 30(6):891–900. doi:10.1007/s10571-010-9518-8
 84. Wallis N, Zagami CJ, Beart PM, O'Shea RD (2012) Combined excitotoxic-oxidative stress and the concept of non-cell autonomous pathology of ALS: insights into motoneuron axonopathy and astrogliosis. *Neurochem Int*. doi:10.1016/j.neuint.2012.02.026
 85. Haastert K, Grosskreutz J, Jaekel M, Laderer C, Bufler J, Grothe C, Claus P (2005) Rat embryonic motoneurons in long-term co-culture with Schwann cells—a system to investigate motoneuron diseases on a cellular level in vitro. *J Neurosci Methods* 142(2):275–284. doi:10.1016/j.jneumeth.2004.09.003
 86. Soo KY, Atkin JD, Farg M, Walker AK, Horne MK, Nagley P (2012) Bim links ER stress and apoptosis in cells expressing mutant SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 7(4):e35413. doi:10.1371/journal.pone.0035413
 87. Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, Dion PA, Bercier V, Bourgouin P, Rochefort D, Bel Hadj S, Durham HD, Vande Velde C, Rouleau GA, Drapeau P (2010) Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Hum Mol Genet* 19(4):671–683. doi:10.1093/hmg/ddp534
 88. Ezzi SA, Urushitani M, Julien JP (2007) Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J Neurochem* 102(1):170–178. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04531.x
 89. Hadzhiieva M, Kirches E, Wilisch-Neumann A, Pachow D, Wallesch M, Schoenfeld P, Paige I, Vielhaber S, Petri S, Keilhoff G, Mawrin C (2013) Dysregulation of iron protein expression in the G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 230:94–101. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.11.021
 90. Jaiswal MK, Zech WD, Goos M, Leutbecher C, Ferri A, Zippelius A, Carri MT, Nau R, Keller BU (2009) Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. *BMC Neurosci* 10:64. doi:10.1186/1471-2202-10-64
 91. Pokrishevsky E, Grad LI, Yousefi M, Wang J, Mackenzie IR, Cashman NR (2012) Aberrant localization of FUS and TDP43 is associated with misfolding of SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 7(4):e35050. doi:10.1371/journal.pone.0035050
 92. Meyerowitz J, Parker SJ, Vella LJ, Ng D, Price KA, Liddell JR, Caragounis A, Li QX, Masters CL, Nonaka T, Hasegawa M, Bogoyevitch MA, Kanninen KM, Crouch PJ, White AR (2011)

- C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress. *Mol Neurodegener* 6:57. doi: [10.1186/1750-1326-6-57](https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-57)
93. Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(7):2424–2428
 94. Trippier PC, Benmohammed R, Kirsch DR, Silverman RB (2012) Substituted pyrazolones require N2 hydrogen bond donating ability to protect against cytotoxicity from protein aggregation of mutant superoxide dismutase 1. *Bioorg Med Chem Lett* 22(21):6647–6650. doi: [10.1016/j.bmcl.2012.08.114](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.114)
 95. Chou CM, Huang CJ, Shih CM, Chen YP, Liu TP, Chen CT (2005) Identification of three mutations in the Cu, Zn-superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) gene with familial amyotrophic lateral sclerosis: transduction of human Cu, Zn-SOD into PC12 cells by HIV-1 TAT protein basic domain. *Ann N Y Acad Sci* 1042:303–313. doi: [10.1196/annals.1338.053](https://doi.org/10.1196/annals.1338.053)
 96. Liu R, Narla RK, Kurinov I, Li B, Uckun FM (1999) Increased hydroxyl radical production and apoptosis in PC12 neuron cells expressing the gain-of-function mutant G93A SOD1 gene. *Radiat Res* 151(2):133–141
 97. Wright PD, Wightman N, Huang M, Weiss A, Sapp PC, Cuny GD, Iverson AJ, Glicksman MA, Ferrante RJ, Matson W, Matson S, Brown RH Jr (2012) A high-throughput screen to identify inhibitors of SOD1 transcription. *Front Biosci (Elite edition)* 4:2801–2808
 98. Benmohamed R, Arvanites AC, Kim J, Ferrante RJ, Silverman RB, Morimoto RI, Kirsch DR (2011) Identification of compounds protective against G93A-SOD1 toxicity for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Motor Neuron Dis* 12(2):87–96. doi: [10.3109/17482968.2010.522586](https://doi.org/10.3109/17482968.2010.522586)
 99. Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, Dahrouge S, Antel JP (1992) Neuroblastoma × spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn* 194(3):209–221
 100. Eggett CJ, Crosier S, Manning P, Cookson MR, Menzies FM, McNeil CJ, Shaw PJ (2000) Development and characterisation of a glutamate-sensitive motor neurone cell line. *J Neurochem* 74(5): 1895–1902
 101. Prause J, Goswami A, Katona I, Roos A, Schnitzler M, Bushuven E, Dreier A, Buchkremer S, Johann S, Beyer C, Deschauer M, Troost D, Weis J (2013) Altered localization, abnormal modification and loss of function of sigma receptor-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. doi: [10.1093/hmg/ddt008](https://doi.org/10.1093/hmg/ddt008)
 102. Barber SC, Higginbottom A, Mead RJ, Barber S, Shaw PJ (2009) An in vitro screening cascade to identify neuroprotective antioxidants in ALS. *Free Radic Biol Med* 46(8):1127–1138. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.019](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.019)
 103. Cookson MR, Menzies FM, Manning P, Eggett CJ, Figlewicz DA, McNeil CJ, Shaw PJ (2002) Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) mutations associated with familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) affect cellular free radical release in the presence of oxidative stress. *Amyotroph Lateral Scler Motor Neuron Disord Off Publ World Fed Neurol Res Group Motor Neuron Dis* 3(2):75–85. doi: [10.1080/146608202760196048](https://doi.org/10.1080/146608202760196048)
 104. Rembach A, Turner BJ, Bruce S, Cheah IK, Scott RL, Lopes EC, Zagami CJ, Beart PM, Cheung NS, Langford SJ, Cheema SS (2004) Antisense peptide nucleic acid targeting GluR3 delays disease onset and progression in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. *J Neurosci Res* 77(4):573–582. doi: [10.1002/jnr.20191](https://doi.org/10.1002/jnr.20191)
 105. Crawford GD Jr, Le WD, Smith RG, Xie WJ, Stefani E, Appel SH (1992) A novel N18TG2 × mesencephalon cell hybrid expresses properties that suggest a dopaminergic cell line of substantia nigra origin. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 12(9):3392–3398
 106. Wang J, Zhang Y, Tang L, Zhang N, Fan D (2011) Protective effects of resveratrol through the up-regulation of SIRT1 expression in the mutant hSOD1-G93A-bearing motor neuron-like cell culture model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 503(3):250–255. doi: [10.1016/j.neulet.2011.08.047](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.08.047)
 107. Smith RG, Alexianu ME, Crawford G, Nyormoi O, Stefani E, Appel SH (1994) Cytotoxicity of immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients on a hybrid motoneuron cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8):3393–3397
 108. Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, Kwiatkowski TJ Jr, Sapp P, McKenna-Yasek D, Brown RH Jr, Hayward LJ (2010) Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum Mol Genet* 19(21):4160–4175. doi: [10.1093/hmg/ddq335](https://doi.org/10.1093/hmg/ddq335)
 109. Guareschi S, Cova E, Cereda C, Ceroni M, Donetti E, Bosco DA, Trotti D, Pasinelli P (2012) An over-oxidized form of superoxide dismutase found in sporadic amyotrophic lateral sclerosis with bulbar onset shares a toxic mechanism with mutant SOD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(13):5074–5079. doi: [10.1073/pnas.1115402109](https://doi.org/10.1073/pnas.1115402109)
 110. Hart MP, Gitler AD (2012) ALS-associated ataxin 2 polyQ expansions enhance stress-induced caspase 3 activation and increase TDP-43 pathological modifications. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 32(27):9133–9142. doi: [10.1523/jneurosci.0996-12.2012](https://doi.org/10.1523/jneurosci.0996-12.2012)
 111. Li XJ, Du ZW, Zamowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA, Zhang SC (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23(2):215–221. doi: [10.1038/nbt1063](https://doi.org/10.1038/nbt1063)
 112. Amoroso MW, Croft GF, Williams DJ, O'Keeffe S, Carrasco MA, Davis AR, Roybon L, Oakley DH, Maniatis T, Henderson CE, Wichterle H (2013) Accelerated high-yield generation of limb-innervating motor neurons from human stem cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33(2):574–586. doi: [10.1523/jneurosci.0906-12.2013](https://doi.org/10.1523/jneurosci.0906-12.2013)
 113. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861–872. doi: [10.1016/j.cell.2007.11.019](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019)
 114. Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MC, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H (2012) Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* 4(145):145ra104. doi: [10.1126/scitranslmed.3004052](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004052)
 115. Mitne-Neto M, Machado-Costa M, Marchetto MC, Bengtson MH, Joazeiro CA, Tsuda H, Bellen HJ, Silva HC, Oliveira AS, Lazar M, Muotri AR, Zatz M (2011) Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. *Hum Mol Genet* 20(18):3642–3652. doi: [10.1093/hmg/ddr284](https://doi.org/10.1093/hmg/ddr284)
 116. Marchetto MC, Muotri AR, Mu Y, Smith AM, Cezar GG, Gage FH (2008) Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 3(6):649–657. doi: [10.1016/j.stem.2008.10.001](https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.001)
 117. Roybon L, Lamas NJ, Garcia-Diaz A, Yang EJ, Sattler R, Jackson-Lewis V, Kim YA, Kachel CA, Rothstein JD, Przedborski S, Wichterle H, Henderson CE (2013) Human stem cell-derived spinal cord astrocytes with defined mature or reactive phenotypes. *Cell Rep* 4(5):1035–1048. doi: [10.1016/j.celrep.2013.06.021](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.021)
 118. Majumder P, Chen YT, Bose JK, Wu CC, Cheng WC, Cheng SJ, Fang YH, Chen YL, Tsai KJ, Lien CC, Shen CK (2012) TDP-43 regulates the mammalian spinogenesis through translational

- repression of Rac1. *Acta Neuropathol* 124(2):231–245. doi:10.1007/s00401-012-1006-4
119. Martinou JC, Le Van TA, Cassar G, Roubinet F, Weber MJ (1989) Characterization of two factors enhancing choline acetyltransferase activity in cultures of purified rat motoneurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 9(10):3645–3656
 120. Masuko S, Kuromi H, Shimada Y (1979) Isolation and culture of motoneurons from embryonic chicken spinal cords. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(7):3537–3541
 121. Berg DK, Fischbach GD (1978) Enrichment of spinal cord cell cultures with motoneurons. *J Cell Biol* 77(1):83–98
 122. Bataille S, Portalier P, Coulon P, Ternaux JP (1998) Influence of acetylcholinesterase on embryonic spinal rat motoneurons growth in culture: a quantitative morphometric study. *Eur J Neurosci* 10(2): 560–572
 123. Schnaar RI, Schaffner AE (1981) Separation of cell types from embryonic chicken and rat spinal cord: characterization of motoneuron-enriched fractions. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1(2):204–217
 124. Arakawa Y, Sendtner M, Thoenen H (1990) Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 10(11):3507–3515
 125. O'Brien RJ, Fischbach GD (1986) Isolation of embryonic chick motoneurons and their survival in vitro. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 6(11):3265–3274
 126. Wiese S, Herrmann T, Drepper C, Jablonka S, Funk N, Klausmeyer A, Rogers ML, Rush R, Sendtner M (2010) Isolation and enrichment of embryonic mouse motoneurons from the lumbar spinal cord of individual mouse embryos. *Nat Protoc* 5(1):31–38. doi:10.1038/nprot.2009.193
 127. Klebe RJ, Ruddle FH (1969) Neuroblastoma: cell culture analysis of differentiating stem cell system. *J Cell Biol* 43:69A
 128. Olmsted JB, Carlson K, Klebe R, Ruddle F, Rosenbaum J (1970) Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65(1):129–136
 129. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38(11 Pt 1):3751–3757
 130. Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33(11):2643–2652
 131. Matsumoto G, Stojanovic A, Holmberg CI, Kim S, Morimoto RI (2005) Structural properties and neuronal toxicity of amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu/Zn superoxide dismutase 1 aggregates. *J Cell Biol* 171(1):75–85. doi:10.1083/jcb.200504050
 132. Farg MA, Soo KY, Walker AK, Pham H, Orian J, Horne MK, Warraich ST, Williams KL, Blair IP, Atkin JD (2012) Mutant FUS induces endoplasmic reticulum stress in amyotrophic lateral sclerosis and interacts with protein disulfide-isomerase. *Neurobiol Aging* 33(12):2855–2868. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.02.009
 133. Blasco H, Bemard-Marissal N, Vourc'h P, Guettard YO, Sunyach C, Augereau O, Khederchah J, Mouzat K, Antar C, Gordon PH, Veyrat-Durebex C, Besson G, Andersen PM, Salachas F, Meininger V, Camu W, Pettmann B, Andres CR, Corcia P (2013) A rare motor neuron deleterious missense mutation in the DPYSL3 (CRMP4) gene is associated with ALS. *Hum Mutat*. doi:10.1002/humu.22329
 134. Wray S, Self M, Lewis PA, Taanman JW, Ryan NS, Mahoney CJ, Liang Y, Devine MJ, Sheerin UM, Houlden H, Morris HR, Healy D, Marti-Masso JF, Preza E, Barker S, Sutherland M, Corriveau RA, D'Andrea M, Schapira AH, Uitti RJ, Guttman M, Opala G, Jasinska-Myga B, Puschmann A, Nilsson C, Espay AJ, Slawek J, Gutmman L, Boeve BF, Boylan K, Stoessl AJ, Ross OA, Maragakis NJ, Van Gerpen J, Gerstenhaber M, Gwinn K, Dawson TM, Isacson O, Marder KS, Clark LN, Przedborski SE, Finkbeiner S, Rothstein JD, Wszolek ZK, Rossor MN, Hardy J (2012) Creation of an open-access, mutation-defined fibroblast resource for neurological disease research. *PLoS ONE* 7(8):e43099. doi:10.1371/journal.pone.0043099
 135. Gandelman M, Peluffo H, Beckman JS, Cassina P, Barbeito L (2010) Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 7:33. doi:10.1186/1742-2094-7-33
 136. Scorisa JM, Duobles T, Oliveira GP, Maximino JR, Chadi G (2010) The review of the methods to obtain non-neuronal cells to study glial influence on amyotrophic lateral sclerosis pathophysiology at molecular level in vitro. *Acta Cir Bras Soc Brasileira Desenvolvimento Pesqui Cir* 25(3):281–289
 137. Ciccarelli R, D'Alimonte I, Santavenere C, D'Auro M, Ballerini P, Nargi E, Buccella S, Nicosia S, Folco G, Caciagli F, Di Iorio P (2004) Cysteinyl-leukotrienes are released from astrocytes and increase astrocyte proliferation and glial fibrillary acidic protein via cys-LT1 receptors and mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Neurosci* 20(6):1514–1524. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03613.x
 138. Sargsyan SA, Blackburn DJ, Barber SC, Monk PN, Shaw PJ (2009) Mutant SOD1 G93A microglia have an inflammatory phenotype and elevated production of MCP-1. *Neuroreport* 20(16):1450–1455. doi:10.1097/WNR.0b013e328331e8fa
 139. Hensley K, Abdel-Moaty H, Hunter J, Mhatre M, Mou S, Nguyen K, Potapova T, Pye QN, Qi M, Rice H, Stewart C, Stroukoff K, West M (2006) Primary glia expressing the G93A-SOD1 mutation present a neuroinflammatory phenotype and provide a cellular system for studies of glial inflammation. *J Neuroinflammation* 3:2. doi:10.1186/1742-2094-3-2
 140. Caragounis A, Price KA, Soon CP, Filiz G, Masters CL, Li QX, Crouch PJ, White AR (2010) Zinc induces depletion and aggregation of endogenous TDP-43. *Free Radic Biol Med* 48(9):1152–1161. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.035
 141. Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH (2001) Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 411(6833):42–43. doi:10.1038/35075141
 142. Palma E, Inghilleri M, Conti L, DeFlorio C, Frasca V, Manteca A, Pichiorri F, Roseti C, Torchia G, Limatola C, Grassi F, Miledi R (2011) Physiological characterization of human muscle acetylcholine receptors from ALS patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(50):20184–20188. doi:10.1073/pnas.1117975108
 143. Guo X, Gonzalez M, Stancescu M, Vandenberg HH, Hickman JJ (2011) Neuromuscular junction formation between human stem cell-derived motoneurons and human skeletal muscle in a defined system. *Biomaterials* 32(36):9602–9611. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.014
 144. Pradat PF, Bruneteau G, Gonzalez de Aguilar JL, Dupuis L, Jokic N, Salachas F, Le Forestier N, Echaniz-Laguna A, Dubourg O, Hauw JJ, Tranchant C, Loeffler JP, Meininger V (2007) Muscle Nogo-A expression is a prognostic marker in lower motor neuron syndromes. *Ann Neurol* 62(1):15–20. doi:10.1002/ana.21122
 145. Yin F, Ye F, Tan L, Liu K, Xuan Z, Zhang J, Wang W, Zhang Y, Jiang X, Zhang DY (2012) Alterations of signaling pathways in muscle tissues of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 46(6):861–870. doi:10.1002/mus.23411
 146. Krasnianski A, Deschauer M, Neudecker S, Gellerich FN, Muller T, Schoser BG, Krasnianski M, Zierz S (2005) Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies. *Brain J Neurol* 128(Pt 8):1870–1876. doi:10.1093/brain/awh540
 147. Moxley RT, Griggs RC, Forbes GB, Goldblatt D, Donohoe K (1983) Influence of muscle wasting on oral glucose tolerance testing. *Clin Sci (London, England: 1979)* 64(6):601–609

148. Onesto E, Rusmini P, Crippa V, Ferri N, Zito A, Galbiati M, Poletti A (2011) Muscle cells and motoneurons differentially remove mutant SOD1 causing familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 118(2):266–280. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07298.x
149. Goos M, Zech WD, Jaiswal MK, Balakrishnan S, Ebert S, Mitchell T, Carri MT, Keller BU, Nau R (2007) Expression of a Cu, Zn superoxide dismutase typical for familial amyotrophic lateral sclerosis increases the vulnerability of neuroblastoma cells to infectious injury. *BMC Infect Dis* 7:131. doi:10.1186/1471-2334-7-131
150. Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10(5):615–622. doi:10.1038/nn1876
151. Bilsland LG, Nimalanathan N, Yip J, Greensmith L, Duchen MR (2008) Expression of mutant SOD1 in astrocytes induces functional deficits in motoneuron mitochondria. *J Neurochem* 107(5):1271–1283. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05699.x
152. Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, Messing A, Johnson JA (2008) Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Official J Soc Neurosci* 28(50):13574–13581. doi:10.1523/jneurosci.4099-08.2008
153. Barbeito AG, Martinez-Palma L, Vargas MR, Pehar M, Manay N, Beckman JS, Barbeito L, Cassina P (2010) Lead exposure stimulates VEGF expression in the spinal cord and extends survival in a mouse model of ALS. *Neurobiol Dis* 37(3):574–580. doi:10.1016/j.nbd.2009.11.007
154. Miquel E, Cassina A, Martinez-Palma L, Bolatto C, Trias E, Gandelman M, Radi R, Barbeito L, Cassina P (2012) Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 7(4):e34776. doi:10.1371/journal.pone.0034776
155. Sun H, Knippenberg S, Thau N, Ragancokova D, Komer S, Huang D, Dengler R, Dohler K, Petri S (2013) Therapeutic potential of *N*-acetyl-glucagon-like peptide-1 in primary motor neuron cultures derived from non-transgenic and SOD1-G93A ALS Mice. *Cell Mol Neurobiol* 33(3):347–357. doi:10.1007/s10571-012-9900-9
156. Lasiene J, Yamanaka K (2011) Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int* 2011:718987. doi:10.1155/2011/718987
157. Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW (2008) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11(3):251–253. doi:10.1038/nn2047
158. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302(5642):113–117. doi:10.1126/science.1086071
159. Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW (2006) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312(5778):1389–1392
160. Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB (2004) Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15(3):601–609. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.012
161. Philips T, Bento-Abreu A, Nonneman A, Haecck W, Staats K, Geelen V, Hersmus N, Kuusters B, Van Den Bosch L, Van Damme P, Richardson WD, Robberecht W (2013) Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J Neurol* 136(Pt 2):471–482. doi:10.1093/brain/aww339
162. Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, Rothstein JD, Bergles DE (2013) Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 16(5):571–579. doi:10.1038/nn.3357
163. Audet JN, Gowing G, Paradis R, Soucy G, Julien JP (2012) Ablation of proliferating cells in the CNS exacerbates motor neuron disease caused by mutant superoxide dismutase. *PLoS ONE* 7(4):e34932. doi:10.1371/journal.pone.0034932
164. Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, Yamanaka K, Cleveland DW (2009) Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(11):4465–4470. doi:10.1073/pnas.0813339106
165. Wang L, Pytel P, Feltri ML, Wrabetz L, Roos RP (2012) Selective knockdown of mutant SOD1 in Schwann cells ameliorates disease in G85R mutant SOD1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 48(1):52–57. doi:10.1016/j.nbd.2012.05.014
166. Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K (2007) Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10(5):608–614
167. Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B (2002) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35(6):1067–1083
168. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW (2009) Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 187(6):761–772. doi:10.1083/jcb.200908164
169. Pramatarova A, Laganieri J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA (2001) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21(10):3369–3374
170. Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Mikse OR, Cleveland DW, Goldstein LS (2008) Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(21):7594–7599. doi:10.1073/pnas.0802556105
171. Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL (2000) Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrogliosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 20(2):660–665
172. Skorupa A, King MA, Aparicio IM, Dussmann H, Coughlan K, Breen B, Kieran D, Concannon CG, Marin P, Prehn JH (2012) Motoneurons secrete angiogenin to induce RNA cleavage in astroglia. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 32(15):5024–5038. doi:10.1523/jneurosci.6366-11.2012
173. Philips T, Robberecht W (2011) Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* 10(3):253–263. doi:10.1016/s1474-4422(11)70015-1
174. Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185(2):232–240
175. Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D (2011) The “dying-back” phenomenon of motor neurons in ALS. *J Mol Neurosci* 43(3):470–477. doi:10.1007/s12031-010-9467-1
176. Eisen A, Weber M (2001) The motor cortex and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 24(4):564–573
177. Belzung C, Leman S, Vouret P, Andres CR (2005) Rodent models for autism: a critical review. *Drug Discov Today Dis Model* 2(2):93–101
178. Ni M, Aschner M (2010) Neonatal rat primary microglia: isolation, culturing, and selected applications. Current protocols in toxicology/editorial board, Mahin D Maines (editor-in-chief) [et al.] Chapter 12:Unit 12 17. doi:10.1002/0471140856.tx1217s43
179. Redler RL, Dokholyan NV (2012) The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Prog Mol Biol Transl Sci* 107:215–262. doi:10.1016/b978-0-12-385883-2.00002-3

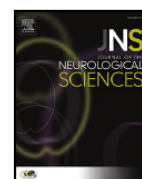
180. Sasaki S (2011) Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 70(5):349–359. doi:10.1097/NEN.0b013e3182160690
181. Cassina P, Peluffo H, Pehar M, Martinez-Palma L, Ressa A, Beckman JS, Estevez AG, Barbeito L (2002) Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J Neurosci Res* 67(1):21–29
182. Mahajan SS, Ziff EB (2007) Novel toxicity of the unedited GluR2 AMPA receptor subunit dependent on surface trafficking and increased Ca²⁺-permeability. *Mol Cell Neurosci* 35(3):470–481. doi:10.1016/j.mcn.2007.04.006
183. Taghibiglou C, Lu J, Mackenzie IR, Wang YT, Cashman NR (2011) Sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP1) activation in motor neurons in excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis (ALS): Indip, a potential therapeutic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 413(2):159–163. doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.011
184. Tortarolo M, Crossthwaite AJ, Conforti L, Spencer JP, Williams RJ, Bendotti C, Rattray M (2004) Expression of SOD1 G93A or wild-type SOD1 in primary cultures of astrocytes down-regulates the glutamate transporter GLT-1: lack of involvement of oxidative stress. *J Neurochem* 88(2):481–493
185. Mori K, Weng SM, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, Schmid B, Kretzschmar HA, Cruts M, Van Broeckhoven C, Haass C, Edbauer D (2013) The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science* 339(6125):1335–1338. doi:10.1126/science.1232927
186. Xu Z, Poidevin M, Li X, Li Y, Shu L, Nelson DL, Li H, Hales CM, Gearing M, Wingo TS, Jin P (2013) Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi:10.1073/pnas.1219643110
187. Silani V, Braga M, Ciammola A, Cardin V, Scarlato G (2000) Motor neurones in culture as a model to study ALS. *J Neurol* 247(Suppl 1): I28–I36
188. Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14(6):724–738. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.016

ANNEXE 3



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Neurological Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jns

Short communication

Association of a paraneoplastic motor neuron disease with anti-Ri antibodies and a novel *SOD1 I18del* mutation[☆]Capucine Diard-Detoeuf^{a,*,1}, Audrey Dangoumau^{b,c,2}, Nadège Limousin^{a,3}, Julien Biberon^{a,3}, Patrick Vourc'h^{b,c,4}, Christian R. Andres^{b,c,3}, Bertrand de Toffol^{a,3}, Julien Praline^{a,5}^a Service de Neurologie et Neurophysiologie Clinique, CHRU Tours, France^b Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire, CHRU Tours, France^c UMR INSERM U930, Université François-Rabelais, Tours, PRES Centre, Val de Loire Université, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 September 2013

Received in revised form 16 November 2013

Accepted 18 November 2013

Available online xxxx

Keywords:

Amyotrophic lateral sclerosis

Motor neuron disease

Paraneoplastic syndrome

Genetic predisposition

SOD1 mutations

Onconeural antibodies

Nova antigen

ABSTRACT

Introduction: Whether motor neuron diseases (MNDs) can be considered in some cases of paraneoplastic syndromes is controversial. We report a case of rapidly progressive motor neuronopathy following a diagnosis of breast carcinoma, with a presence of anti-Ri antibodies, and a novel *SOD1* gene mutation.

Observation: An 80-year-old woman with mucinous adenocarcinoma of the left breast for 4 years developed sub-acute quadriparesis. Myography revealed chronic denervation signs. The patient had serum anti-Ri onconeural antibodies. The diagnosis of paraneoplastic MND was established. Because of a familial history of ALS, a genetic analysis for familial ALS was performed. We identified a novel heterozygous mutation in *SOD1* gene, *SOD1 I18del*. This mutation may reflect a genetic predisposition to develop a MND, inducing fragility of motor neurons. Neurological improvement was observed after three months of both intravenous gamma globulin and corticosteroids.

Conclusion: The present observation supports the idea that MND can be considered as a paraneoplastic syndrome. A combination of anti-Ri onconeural antibodies and a particular *SOD1* gene mutation, consisting in risk factor, might be in cause in the process of motor neuron death. When in doubt, paraneoplastic cause should be suspected in the differential diagnosis of MND. Immunotherapy treatment may lead to a favorable outcome.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Paraneoplastic neurological disorders (PNS) are rare disorders linked to an autoimmune response to cancer that can affect any part of the nervous system. PNS are estimated to be present in 0.01% of patients with cancer [1]. Motor neuron disease (MND) consists in a group of neurological disorders, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a neurodegenerative disorder of motor neurons in the cortex, brainstem and spinal cord. Reports of patients with typical motor neuron disease (MND) who had improvement following treatment of their malignancy suggest that MND could occur as a paraneoplastic phenomenon [2]. Moreover, few reports indicate a possible link

between upper motor neuron (UMN) syndrome resembling primary lateral sclerosis and breast carcinoma [3].

We report the case of an 80-year-old woman who presented MND associated with anti-Ri antibodies in relation to a breast carcinoma and a novel *SOD1* gene mutation (*delI18*).

2. Case report

An 80-year-old woman had a left breast mass for about 4 years and had refused any medical exploration until May 2010. A biopsy was finally performed on May 22nd, and histological examination identified a mucinous adenocarcinoma. She refused any surgical treatment. Hormonal therapy by tamoxifen was initiated. At the end of June 2010, she noted a bilateral upper extremity weakness with rapid worsening. On July 16th 2010, she was admitted to the Department of Neurology. Her past medical history included hypothyroidism, hip dysplasia requiring bilateral prostheses, and surgery for bilateral cataract. Her brother died from ALS with spinal onset, twenty years ago, when he was 65 years old. On admission, the physical examination revealed a symmetrical lower motor neuron (LMN) pattern of weakness in several muscle groups of upper limbs valued at 3/5 (MRC score). There was no sensitive deficit, no sign of bulbar impairment. Tendon reflexes were present and lively. Plantar cutaneous responses were flexor. The large

[☆] Sponsorship or funding: None.

* Corresponding author at: Service de Neurologie, CHRU Bretonneau, 2 Boulevard Tonnellé, 37044 Tours Cedex 9, France. Tel.: +33 2 47 47 38 25; fax: +33 2 47 47 82 81.

E-mail address: capucine.diarddetoeuf@gmail.com (C. Diard-Detoeuf).¹ Diard-Detoeuf drafted the manuscript and reports no disclosures.² Dangoumau helped acquire data, modeled the variant *SOD1* protein and reports no disclosures.³ Limousin helped acquire data and reports no disclosures.⁴ Vourc'h carried out the molecular genetic study, modeled the variant *SOD1* protein, corrected the manuscript and reports no disclosures.⁵ Praline developed the idea, supervised the study, corrected the manuscript, and reports no disclosures.

0022-510X/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2013.11.025>

tumor of the left breast was visible, with an inflammatory aspect of the skin. Spinal MRI was normal. CSF analysis showed a moderate increase of protein level to 0.57 g/l, without abnormal cell count. Nerve conduction studies were normal. Motor and sensory nerve action potential amplitudes were normal. There was no conduction block. F-wave latencies were not obtained. Electromyography showed chronic denervation signs with neurogenic motor unit potentials in several distal arm muscle groups.

Antineuronal-nuclear autoantibodies type 2 (anti-Ri antibodies) were found in the serum (qualitative assay). Other onconeural antibodies (anti-Hu, anti-Yo, anti-CV2, anti-amphiphysine, anti-Ma1 and anti-Ma2) were absent. Given the first-degree family history of ALS and the clinical presentation, genetic analysis of ALS was performed. Sequencing analysis indicated a novel heterozygous mutation in *SOD1* gene. A deletion c.56_58delTCA resulted in a deletion of an amino acid p.I18del (Fig. 1A). No variation was found in the genes *C9ORF72* and *TARDBP*. This deletion was absent in our cohort of 600 ALS patients of French origin and was not reported in the ALSod database. The deleted isoleucine was highly conserved during species evolution, suggesting an important role (Fig. 1B). Using the modeling server Swiss-model (a web-based server for automated comparative modeling of three-dimensional protein structures) [4], we observed that the deletion of the Isoleucine 18 in the second β -strand could strongly modify the shape of first loop in *SOD1* protein (Fig. 1C).

Four months later, her clinical state worsened with extension of the motor deficit to the lower limbs with twitching and cramps. Second

electromyogram showed a worsening of denervation signs in the upper limbs with spontaneous activity at rest in distal arm muscles and the appearance of neurogenic motor unit potentials in several leg muscles. Nerve conduction studies showed mildly reduced bilateral median compound muscle action potential amplitudes and motor nerve conduction velocities. Three months after beginning of intravenous gamma globulin (IVGG) [2 g/kg in 5 days] and high oral dose of corticosteroids (prednisone 1 mg/kg/d), a moderate clinical improvement was observed. She continued to improve over cures, from a bedridden state to a more tonic condition allowing her to sit in a chair. Her dexterity improved to eat and drink alone, to turn herself the pages of a book. In May 2011, with her consent, a left mastectomy was scheduled followed by a local radiotherapy. In 2013, there was a clinical stability. The monthly cures of IVGG continued and corticosteroids were in decay.

3. Discussion

Clinical examination and electromyography results were both consistent with LMN dysfunction. The presence of tendon reflexes could reflect an impairment of UMN, but this sign was insufficient to affirm UMN involvement. These clinical findings did not fulfill diagnostic criteria for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) according to the World Federation of Neurology [5]. Another diagnostic hypothesis was a multifocal motor neuropathy, but nerve conduction studies did not show conduction block and clinical motor impairment of the limbs

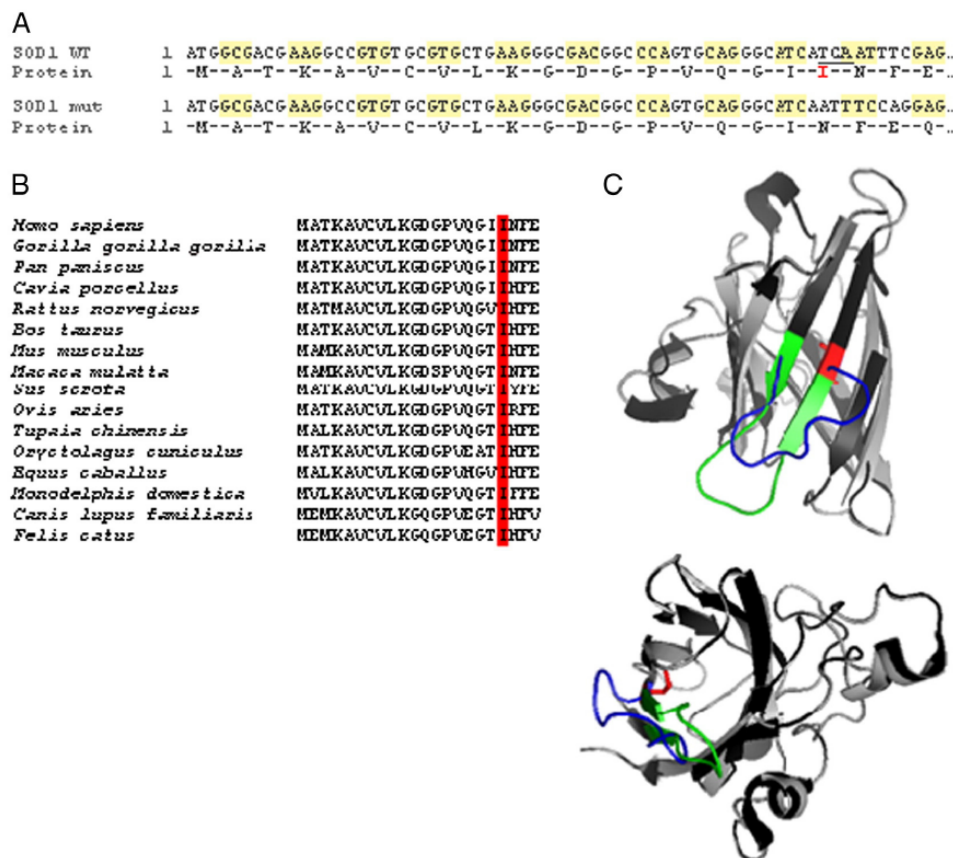


Fig. 1. Alignments of the N-terminal sequence of the human wild type form of SOD1 with (A) the mutant SOD1 I18del (Isoleucine 18 underlined) and (B) the SOD1 proteins in 15 species. (C) Three-dimensional structures (2 views) of the normal human SOD1 protein (PDB ID 2C9V) superposed with the model of the SOD1 variant I18del. In red, isoleucine; in green, normal shape of the first loop in wild type SOD1; in blue, abnormal shape of the first loop proposed by the model SOD1 I18del. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

was symmetric and without truncular distribution [6]. In our case, the diagnosis of paraneoplastic MND was evoked because of the clinical presentation with unusually sub-acute symptom-onset of MND and rapid worsening. Furthermore it was supported by three evidences: (a) the identification of anti-Ri onconeural antibodies which could be used to classify the associated disorder as a definite PNS regardless the symptoms are classical or not [7]; (b) the presence of a breast cancer; and (c) the clinical improvement after immunotherapy. Anti-Ri antibodies are more commonly associated with paraneoplastic opsoclonus-myoclonus in the context of breast cancer [8]. They belong to the class of neuronal nuclear antibodies. They are highly specific for the presence of cancer and predictive of the cancer type, but do not appear to be directly pathogenic [9]. Anti-Ri antibodies bind *in vitro* to antigens restricted to central nervous system neurons, including the RNA-binding proteins Nova-1 and Nova-2, specifically expressed in the developing ventral brainstem and the spinal cord motor system [10]. Jensen et al. experienced a Nova-1 null mice model: all mice died postnatally from a motor deficit associated with apoptotic death of spinal and brainstem neurons [11]. They concluded that Nova-1 could regulate neuron-specific alternative splicing and, thus would be essential for neuronal viability. This role of Nova-1 is noteworthy because two ALS-related genes, TARDBP (TAR DNA-binding protein, TDP43) and FUS/TLS (FUsed in Sarcoma, Translocated in LipoSarcoma), encode proteins that are involved in mRNA splicing [12]. Also, the identification of a hexanucleotide repeat expansion in the first intron of *C9orf72* gene in 26% to 50% of cases of familial ALS and 6% of sporadic ALS, supports the hypothesis that alterations in RNA metabolism are critical in the pathogenesis of ALS [13,14].

Also, this patient carried a novel heterozygous mutation in *SOD1* gene. More than one hundred *SOD1* mutations have been reported in about 10% of familial ALS cases, most often with dominant inheritance. In some cases, it remains difficult to ascertain that the mutation is responsible for the disease [15]. In the present case, the novel heterozygous *I18del* mutation may have no link at all with the MND causation. Some *SOD1* mutations are apparently non-pathogenic *SOD1* variants, carried by unaffected individuals as the *A95T* mutation described by Gellera et al. [16]. A second hypothesis is that it predisposes, but is not sufficient, to the development of a MND. This is supported by a probable modification of the 3D-structure of *SOD1* protein. The presence of the mutation could not be tested in her brother because he died before she was examined. The hypothesis of a genetic predisposition has already been considered. First according to Mayeux et al. [15], the heterozygote *SOD1 N19S* mutation is carried by ten subjects but only two of them developed ALS, strongly suggesting that *N19S* alone was not responsible for the disease. The second case was a 66-year-old woman who developed progressive weakness, fasciculation and UMN signs one year after mastectomy and chemotherapy for a breast carcinoma [17]. The authors suggested that the simultaneous appearance of breast cancer and ALS with a heterozygous *SOD1 I113T* mutation made it possible that this was a paraneoplastic form of MND, even though onconeural antibodies (anti-Hu, anti-Ri, anti-Yo) were absent. The autopsy showed not only characteristic features of ALS but also posterior column degeneration and conglomerate hyaline inclusions [17], nearly specific for the autosomal dominant form of ALS caused by mutations of the *SOD1* gene [18]. This result supports the hypothesis that genetic predisposition to a MND could have combined with a cancer to induce the disease.

To our knowledge, this is the second reported case of paraneoplastic MND associated with anti-Ri antibodies [19]. Younger et al. described the case of a 49-year-old woman who progressively developed UMN and LMN diseases, and a breast carcinoma was diagnosed three months after. Anti-Ri antibodies were found positive in both serum and CSF. Cancer treatment with chemotherapy and radiotherapy, monthly cures of IVGG for 6 months and plasma exchange (PE) for an additional 6 months led to a sustained clinical improvement and decrease of serum anti-Ri antibody titer.

In the present case, genetic predisposition could be responsible for vulnerability of motor neurons, and a preferential target for anti-Ri antibodies. Although an association by chance cannot be ruled out, a pathogenic role for a combination of anti-Ri onconeural antibodies and a mutation in *SOD1* gene could together be a risk factor. On the one hand, considering this genetic predisposition, genetic studies on larger paraneoplastic syndrome populations could be performed to screen for genes involved in diseases clinically similar, such as paraneoplastic cerebellar degeneration and genes involved in degenerative cerebellar diseases. On the other hand, this observation indicates that paraneoplastic cause should be suspected in the differential diagnosis of MND. Onconeural antibodies should be assessed when in doubt, even after a pathogenic mutation has been identified and an inherited disease suspected. Therapeutic changes are significant. If the paraneoplastic condition can be confirmed, an immunotherapy treatment such as IVGG or PE or corticosteroids should be tried, which could lead to reversibility or at least stability of symptoms, as in the woman described here.

Conflict of Interest

Authors have no conflict of interest.

References

- [1] Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N Engl J Med* 2003;349(16):1543–54.
- [2] Turk HM, Ozet A, Kuzhan O, Komurcu F, Arpacı F, Ozturk B, et al. Paraneoplastic motor neuron disease resembling amyotrophic lateral sclerosis in a patient with renal cell carcinoma. *Med Princ Pract* 2009;18(1):73–5.
- [3] Forsyth PA, Dalmau J, Graus F, Cwik V, Rosenblum MK, Posner JB. Motor neuron syndromes in cancer patients. *Ann Neurol* 1997;41(6):722–30.
- [4] Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 2003;31(13):3381–5.
- [5] Carvalho MD, Swash M. Awaji diagnostic algorithm increases sensitivity of El Escorial criteria for ALS diagnosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10(1):53–7.
- [6] Olney RK, Lewis RA, Putnam TD, Campellone Jr JV, American Association of Electrodiagnostic Medicine. Consensus criteria for the diagnosis of multifocal motor neuropathy. *Muscle Nerve* 2003;27(1):117–21.
- [7] Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, et al. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75(8):1135–40.
- [8] Luque FA, Furneaux HM, Ferziger R, Rosenblum MK, Wray SH, Schold Jr SC, et al. Anti-Ri: an antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. *Ann Neurol* 1991;29(3):241–51.
- [9] Sharp L, Vernino S. Paraneoplastic neuromuscular disorders. *Muscle Nerve* 2012;46(6):841–50.
- [10] Buckanovich RJ, Posner JB, Darnell RB. Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron* 1993;11(4):657–72.
- [11] Jensen KB, Dredge BK, Stefani G, Zhong R, Buckanovich RJ, Okano HJ, et al. Nova-1 regulates neuron-specific alternative splicing and is essential for neuronal viability. *Neuron* 2000;25(2):359–71.
- [12] Lemmens R, Moore MJ, Al-Chalabi A, Brown Jr RH, Robberecht W. RNA metabolism and the pathogenesis of motor neuron diseases. *Trends Neurosci* 2010;33(5):249–58.
- [13] DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of *C9ORF72* causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011;72(2):245–56.
- [14] Keller BA, Volkening K, Droppelmann CA, Ang LC, Rademakers R, Strong MJ. Co-aggregation of RNA binding proteins in ALS spinal motor neurons: evidence of a common pathogenic mechanism. *Acta Neuropathol* 2012;124(5):733–47.
- [15] Mayeux V, Corcia P, Besson G, Jafari-Schluep H-F, Briolotti V, Camu W. N19S, a new *SOD1* mutation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: no evidence for disease causation. *Ann Neurol* 2003;53(6):815–8.
- [16] Gellera C, Castellotti B, Riggio MC, Silani V, Morandi L, Testa D, et al. Superoxide dismutase gene mutations in Italian patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis: identification of three novel missense mutations. *Neuromuscul Disord* 2001;11(4):404–10.
- [17] Hays AP, Naini A, He CZ, Mitsumoto H, Rowland LP. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis and breast cancer: hyaline conglomerate inclusions lead to identification of *SOD1* mutation. *J Neurol Sci* 2006;242(1–2):67–9.
- [18] Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, Siddique T, Deng HX, Hung WY, et al. Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55(4):481–90.
- [19] Younger DS, Graber J, Hayakawa-Yano Y, Parveen S, Frank M, Darnell RB. Ri/Nova gene-associated paraneoplastic subacute motor neuropathy. *Muscle Nerve* 2013;47(4):617–8.

Audrey DANGOUMAU

Etude de la voie de la SUMOylation dans la Sclérose Latérale Amyotrophique associée à des mutations de SOD1

La sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative des motoneurones impliquant des facteurs environnementaux et génétiques. Notre étude porte sur l'étude des relations entre la voie de la SUMOylation post-traductionnelle des protéines et les effets du stress oxydant et de mutants *SOD1*.

Nous montrons tout d'abord que 2 nouveaux mutants, *SOD1*^{V31A} et *SOD1*^{E121G} identifiés chez des patients SLA à évolution lente, entraîne la formation d'agrégats cellulaires Ub/SUMO dans la formation des agrégats était suggérée. Nous montrons 1) que les NSC-34 exposées à un stress oxydant et exprimant *SOD1* mutée présentent une modification d'expression de plusieurs gènes des voies de l'Ub/SUMO ; 2) que l'expression de *SOD1* mutée réduit le pool de protéine SUMO-1 libre dans les cellules motoneuronales, possible conséquence d'une séquestration dans les agrégats ; 3) qu'inhiber la SUMOylation de *SOD1* mutée réduit la quantité de cellules avec agrégats.

Nos résultats indiquent qu'une meilleure connaissance de la voie de SUMO pourrait conduire à de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes dans la SLA.

Mots clés : SLA, motoneurones, *SOD1*, agrégats, SUMO, ubiquitine

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease of motor neurones involving a combination of environmental and genetics factors. Ours work focuses on the relationship between the SUMOylation pathway and the effects of oxidative stress and *SOD1* mutants.

We first show that 2 new mutants, *SOD1*^{V31A} and *SOD1*^{E121G} identified in ALS patients with a slowly progressive disease, induce the formation of Ub/SUMO positive aggregates in motor neuronal cells NSC-34. The implication of the Ub/SUMO pathways has been proposed in the formation of aggregates in ALS. We show 1) modification of expression of several genes of the Ub/SUMO pathways in NSC-34 exposed to oxidative stress and expressing various mutated *SOD1* proteins; 2) that the expression of mutants *SOD1* reduces free-SUMO1 concentration in motor neuronal cell, perhaps by a sequestration in aggregates; 3) that the inhibition of SUMylation of various mutants *SOD1* reduces the amount of cells with aggregates.

Our results support further studies on the SUMO pathway that may lead to new therapeutics targets in ALS.

Keywords: ALS, motor neuron, *SOD1*, aggregates, SUMO, Ubiquitin