

Université de Montréal

**Caractérisation de nouveaux modèles TDP-43/TDP-1 de
Caenorhabditis elegans pour la maladie sclérose latérale
amyotrophique**

Par

Sarah Duhaime

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
en Biochimie, option générale

Décembre 2020

© Sarah Duhaime, 2020

Université de Montréal

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Caractérisation de nouveaux modèles TDP-43/TDP-1 de *Caenorhabditis elegans* pour la maladie sclérose latérale amyotrophique

Présenté par

Sarah Duhaime

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dre Marlene Oeffinger
Présidente-rapporteuse

Dr J Alex Parker
Directeur de recherche

Dre Janelle Drouin-Ouellet
Membre du jury

Résumé

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale caractérisée par une perte progressive et sélective des neurones moteurs. La SLA est incurable et il n'existe aucun traitement efficace pour les personnes atteintes de cette maladie. Environ 90% des cas sont sporadiques tandis que 10% sont familiaux, et les patients décèdent généralement deux à cinq ans après l'apparition des premiers symptômes. De nombreuses anomalies génétiques sont associées à la SLA, incluant des mutations dans les protéines FUS, C9orf72, SOD-1 et TDP-43. Le laboratoire a développé un modèle transgénique de *Caenorhabditis elegans* surexprimant la protéine humaine mutante TDP-43(Q331K) dans les neurones moteurs GABAergiques. Nous avons également obtenu par mutagenèse et CRISPR-Cas9 des modèles physiologiquement représentatifs du nématode basés sur des mutations dans *tdp-1*, l'orthologue de *TARDBP* chez le *C. elegans*. L'objectif est de caractériser ces modèles et de déterminer s'ils peuvent récapituler certains aspects phénotypiques clés de la SLA, tels que des déficits moteurs et une neurodégénérescence dépendante de l'âge générant une paralysie. L'hypothèse est que le modèle TDP-1 pourra refléter plus précisément l'expression physiologique du gène dans la maladie humaine grâce à la mutation dans un gène endogène, l'absence de surexpression et l'expression ubiquitaire de la protéine TDP-1. Les résultats montrent que les modèles TDP-43/TDP-1 ont des déficits moteurs, une transmission synaptique altérée et une neurodégénérescence liée à l'âge. Cependant, seule la mutation dans TDP-43 semble avoir un effet sur la durée de vie. Ces modèles procurent différentes expressions physiologiques des protéines mutantes et donc, des phénotypes de niveaux d'intensité variables. Ils constitueront des outils utiles pour élucider de nouveaux mécanismes pathogéniques de la SLA ainsi que de bons candidats pour le criblage de médicaments et le développement de stratégies thérapeutiques.

Mots-clés: SLA, neurodégénérescence, neurones moteurs GABAergiques, TDP-43, TDP-1, *C. elegans*, modèle.

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by a progressive and selective loss of motor neurons. ALS is incurable and there are no effective treatments available for people living with the disease. About 90% of the cases are sporadic whereas 10% are familial, and patients usually die two to five years after symptom onset. Many gene defects are associated with ALS, including mutations in genes encoding FUS, C9orf72, SOD-1 and TDP-43 proteins. We have developed a transgenic *Caenorhabditis elegans* model expressing human mutant TDP-43(Q331K) in GABAergic motor neurons. We have also obtained by mutagenesis and CRISPR-Cas9 physiologically accurate models based on mutations in *tdp-1*, the *C. elegans* ortholog of *TARDBP*. Our objective is to characterize these models and determine if they can recapitulate key aspects of the disease such as motor deficits and age-dependent neurodegeneration causing paralysis. We believe that the TDP-1 model will reflect more precisely the physiological expression of the gene in the human disease because of its mutation in an endogenous gene, the absence of overexpression and ubiquitous protein expression. Our results show that both TDP-43 and TDP-1 models have motor deficits, synaptic transmission impairments and age-dependent neurodegeneration. However, only the TDP-43 mutation seems to have an effect on lifespan. These models provide different physiological expression of mutant proteins and thus phenotypes of varying intensity levels. They will be useful tools to elucidate new pathogenic mechanisms of ALS as well as being good candidates for drug screening and developing therapeutic strategies.

Keywords: ALS, neurodegeneration, GABAergic motoneurons, TDP-43, TDP-1, *C. elegans*, model.

Table des matières

Résumé	1
Abstract	3
Table des matières	5
Liste des tableaux	9
Liste des figures	11
Liste des sigles et abréviations	13
Remerciements	15
Chapitre 1 – Introduction	17
1.1 La sclérose latérale amyotrophique (SLA).....	17
1.1.1 Portrait général et statistiques	17
1.1.2 Symptômes cliniques	18
1.1.3 Gènes associés à la SLA	18
1.1.4 Possibilités thérapeutiques.....	20
1.2 Protéine TDP-43	21
1.2.1 Structures et caractéristiques	21
1.2.2 Fonctions physiologiques normales et pathologiques.....	24
1.3 L'organisme modèle <i>Caenorhabditis elegans</i>	27
1.3.1 Pertinence de <i>C. elegans</i> comme modèle de recherche.....	27
1.3.2 Anatomie du système nerveux de <i>C. elegans</i>	28
1.3.3 Protéine TDP-1	30
1.3.4 Différents modèles de <i>C. elegans</i> pour la SLA.....	31
1.4 Autres modèles de recherche pour la SLA	33

1.5 Objectifs du projet recherche	35
1.5.1 Problématique	35
1.5.2 Hypothèse et objectifs	35
Chapitre 2 – Matériels et méthodes	37
2.1 Maintenance des souches <i>C. elegans</i>	37
2.2 Construction de plasmides et transgénése	37
2.3 Synchronisation d'une population selon l'âge	38
2.4 Synchronisation d'une population selon l'âge par blanchissement	38
2.5 Analyse de l'expression quantitative	39
2.6 Essai de durée de vie.....	40
2.7 WormLab® : Vitesse de reptation sur milieu solide	40
2.8 WormLab® : Vitesse de nage, activité et taux de départs en milieu liquide	41
2.9 Essai de paralysie sur milieu solide	41
2.10 Essai d'aldicarbe.....	41
2.11 Microscopie à fluorescence neuronale.....	42
2.12 Essai de composés sur milieu solide	42
2.13 Tests statistiques.....	43
Chapitre 3 – Résultats	45
3.1 Génération des souches TDP-43 et TDP-1	45
3.1.1 Niveaux d'expression quantitative d'ARNm	47
3.2 Caractérisation des modèles mutants TDP-43 et TDP-1	49
3.2.1 L'aspect physiologique des modèles.....	49
3.2.1.1 Essai de durée de vie.....	49
3.2.1.2 WormLab®	50

3.2.2 L'intégrité du système nerveux moteur	57
3.2.2.1 Essai de paralysie	57
3.2.2.2 Essai d'aldicarbe.....	58
3.2.2.3 Essai de neurodégénérescence.....	60
3.2 L'effet de médicaments pour la SLA sur les modèles mutants TDP-43 et TDP-1	68
3.3 Autre mutation endogène dans <i>tdp-1</i>	72
Chapitre 4 – Discussion	83
4.1 Niveaux d'expression quantitative d'ARNm	85
4.2 L'aspect physiologique des modèles.....	86
4.3 L'intégrité du système nerveux moteur.....	89
4.4 L'effet de médicaments pour la SLA sur les modèles mutants TDP-43 et TDP-1	93
4.5 Autre mutation endogène dans <i>tdp-1</i>	95
4.6 Perspectives futures.....	97
4.6.1 Transfert de la pathologie de TDP-43	97
4.6.2 Agrégation de TDP-43/TDP-1	97
4.6.3 Interactions génétiques	98
4.6.4 Étude des dérégulations de TDP-43/TDP-1.....	98
4.6.5 La voie de signalisation de l'insuline	99
4.6.6 Criblage de molécules thérapeutiques	101
Chapitre 5 – Conclusion.....	103
Références bibliographiques	105
Annexes.....	119
1. Souches de <i>C. elegans</i> utilisées.....	119
2. Amorces	121

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Caractéristiques des différents modèles TDP-43 et TDP-1 générés.....	47
Tableau 2. –	Caractéristiques du mutant endogène TDP-1(R258C) non phénotypique.....	73
Tableau 3. –	Liste des noms et génotypes des différentes souches.....	119
Tableau 4. –	Amorces utilisées pour le séquençage.....	121
Tableau 5. –	Amorces utilisées pour le génotypage (PCR ou HRM).	121

Liste des figures

Figure 1. –	Organisation des éléments structurels de TDP-43.....	23
Figure 2. –	Les différentes fonctions cellulaires de TDP-43.	25
Figure 3. –	Les différents stades du cycle de vie de <i>C. elegans</i> à 22 °C de la fertilisation jusqu'au stade adulte.	28
Figure 4. –	Le système nerveux moteur GABAergique.	29
Figure 5. –	Comparaison entre les protéines orthologues TDP-43 et TDP-1.	31
Figure 6. –	Schématisation des modèles transgéniques TDP-43 (de type sauvage et mutant) et du modèle endogène TDP-1 de <i>Caenorhabditis elegans</i>	46
Figure 7. –	Niveaux d'expression quantitative d'ARNm de <i>TARDBP</i> pour les modèles transgéniques et de <i>tdp-1</i> pour le modèle endogène.	48
Figure 8. –	Les mutations dans TDP-43 et TDP-1 n'ont pas ou peu d'effet sur la durée de vie des nématodes.	50
Figure 9. –	Le mutant transgénique TDP-43 présente un phénotype de motilité selon plusieurs paramètres du logiciel Wormlab®.	53
Figure 10. –	Le mutant endogène TDP-1 présente un phénotype de motilité selon plusieurs paramètres du logiciel WormLab®.	56
Figure 11. –	Le mutant transgénique TDP-43 et le mutant endogène TDP-1 présentent un phénotype de déficit moteur.	58
Figure 12. –	Défauts de transmission synaptique chez le mutant transgénique TDP-43 et le mutant endogène TDP-1.....	59
Figure 13. –	Le mutant transgénique TDP-43 présente une neurodégénérescence dépendante de l'âge.	62
Figure 14. –	Le mutant transgénique TDP-43 semble développer une neurodégénérescence davantage ventrale.	63
Figure 15. –	Le mutant endogène TDP-1 présente une neurodégénérescence dépendante de l'âge.	66

Figure 16. –	Le mutant endogène TDP-1 semble développer une neurodégénérescence davantage dorsale.	67
Figure 17. –	Le composé riluzole n’a pas d’effet neuroprotecteur sur le mutant transgénique TDP-43 et endogène TDP-1.....	69
Figure 18. –	Le composé Edaravone possède un effet neuroprotecteur sur le mutant transgénique TDP-43 et endogène TDP-1.....	71
Figure 19. –	Schématisation d’un autre modèle endogène TDP-1 non phénotypique de <i>Caenorhabditis elegans</i>	72
Figure 20. –	Niveaux d’expression quantitative d’ARNm de <i>tdp-1</i>	74
Figure 21. –	Pas toutes les mutations endogènes dans <i>tdp-1</i> ont un effet sur la motilité et la durée de vie des nématodes.....	76
Figure 22. –	Le mutant endogène TDP-1(R258C) ne semble pas présenter une neurodégénérescence dépendante de l’âge.	80
Figure 23. –	Le mutant endogène TDP-1(R258C) présente une neurodégénérescence davantage dorsale.....	81
Figure 24. –	L’effet du pesticide aldicarbe sur les jonctions neuromusculaires (JNM).	90
Figure 25. –	Schématisation des différentes pathologies induites par TDP-43.	99
Figure 26. –	Composantes régulatrices conservées de la longévité de la voie de signalisation de l’insuline/IGF-1 chez <i>C. elegans</i>	100

Liste des sigles et abréviations

AC : anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

C. elegans : *Caenorhabditis elegans*

DFT : Démences fronto-temporales

E. coli : *Escherichia coli*

FDA : Food and drugs administration; Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

GABA : acide γ -aminobutyrique

GFP : Green fluorescent protein; protéine fluorescente verte

GS : Granule de stress

HRM : High resolution melt; courbes de fusion à haute résolution

JNM : Jonction neuromusculaire

kDa : kilo Dalton

mCherry : Monomeric red fluorescent protein; protéine fluorescente rouge monomérique

MPT : Modifications post-traductionnelles

NGM : Nematode growth media; milieu de croissance des nématodes

NLS : Nuclear localization signal; Signal de localisation nucléaire

ns : non significatif

N2 : Souche de *C. elegans* de type sauvage (WT)

PCR : Polymerase chain reaction; réaction en chaîne par polymérase

RE : Réticulum endoplasmique

RRM : RNA recognition motif, motif de reconnaissance d'ARN

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

TARDBP : TAR DNA binding protein; protéine TAR de liaison à l'ADN

TDP-1 : Tar DNA-binding protein homolog 1; protéine homologue TAR de liaison à l'ADN 1

TDP-43 : TAR DNA binding protein 43 kDa; protéine TAR de liaison à l'ADN 43 kDa

TAR : Transactive response; réponse transactive

WT : Wild-type; type sauvage

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Dr J Alex Parker, qui m'a donné l'opportunité d'être initiée à la recherche lors de mon premier stage en 2017 durant mon baccalauréat. J'ai immédiatement pris goût à la recherche ce qui m'a amené à faire un deuxième stage dans le laboratoire et finalement, ma maîtrise. Merci d'avoir été disponible, à l'écoute et pour les conseils qui m'ont permis de poursuivre mon cheminement. Je suis très reconnaissante d'avoir eu la possibilité d'assister et de présenter mon projet de recherche à plusieurs congrès, dont un international, à l'Université de Californie à Los Angeles (UCLA). Je vais y garder de très bons souvenirs.

Je voudrais remercier également tous les membres du laboratoire Parker (passés et présents) dont Asma, Audrey, Claudia, Ericka, Gilles, Hiba, James, Rachel, et Yasmin pour leurs conseils, soutien et bonne humeur. C'était un réel plaisir de me lever chaque matin pour aller travailler et c'est, en grande partie, grâce à vous tous.

Merci à Hadjara Sidibé (laboratoire du Dre Christine Vande Velde) pour son aide (et son document Excel) concernant l'analyse des qPCR.

Merci également à ma marraine de maîtrise, Dre Martine Tétreault, pour son temps, son écoute et ses suggestions qui m'ont permis d'avoir une opinion extérieure sur mon projet ainsi que sur le cheminement de mes études.

Un énorme merci à tous/es mes amis/es, en particulier Clothilde, Alexandra, Corinne et Ericka. Merci d'avoir toujours été présente pour moi durant mes hauts et mes bas, et ce, à n'importe quelle heure de la journée. Merci pour votre écoute, vos encouragements et tous les moments passés ensemble. Je suis choyée d'avoir des amies en or comme vous.

Finalement, un merci tout particulier à mes parents pour votre présence, votre support, vos recommandations et vos encouragements. Merci d'avoir cru en moi et d'être continuellement fiers de moi.

Chapitre 1 – Introduction

1.1 La sclérose latérale amyotrophique (SLA)

1.1.1 Portrait général et statistiques

La SLA est une maladie neurodégénérative en lien avec le vieillissement tout comme l'Alzheimer, le Parkinson et Huntington (1). Elle a été découverte en 1869 par le neurologue français Jean-Martin Charcot (2). Plusieurs personnalités publiques ont reçu le diagnostic de la SLA dont l'ancien joueur de baseball Lou Gehrig, et le physicien, théoricien, cosmologiste et auteur Stephen Hawking (3). Il s'agit d'une maladie fatale caractérisée par la perte progressive et sélective des neurones moteurs supérieurs et inférieurs. Au fur et à mesure que les neurones moteurs dégèrent, la communication entre le cerveau et les muscles est perdue. Ce manque de stimulation fait en sorte que les muscles du corps s'atrophient (4). La paralysie s'installe progressivement jusqu'à ce que celle-ci provoque une insuffisance respiratoire. Les patients atteints de la SLA meurent généralement 2 à 5 ans à la suite de l'apparition des premiers symptômes (5, 6).

La SLA est une maladie qui touche de nombreuses personnes à travers le monde et affecte tant les hommes que les femmes, mais avec un plus haut risque pour les hommes (ratio estimé à 1.8:1) (7). Cette maladie apparaît de façon tardive avec une moyenne d'âge de 55 ans, et une médiane d'environ 64 ans pour les hommes et 67 ans pour les femmes (7, 8). Plus de 200 000 personnes vivent actuellement à travers le monde avec la maladie avec une incidence de 2 à 5 personnes sur 100 000 (9). Au Canada, environ 3 000 personnes sont touchées par la maladie et le taux d'incidence est de 2/100 000 personnes par année. Chaque année, approximativement 1 000 Canadiens meurent de la SLA et un nombre similaire reçoivent le diagnostic (10).

Environ 90% des cas de SLA sont sporadiques, c'est-à-dire que les causes sont multifactorielles et aléatoires, et 10% sont familiaux, transmis de façon héréditaire (11). De nombreux facteurs de risques peuvent être impliqués dans la forme sporadique incluant des facteurs environnementaux et alimentaires. Il peut s'agir, entre autres, de la fumée de cigarette, de certains gènes associés à

l'exercice physique, d'une exposition chimique ou de métaux, de rayonnement et champs électromagnétiques ou d'un ensemble de plusieurs facteurs (11, 12). Toujours à ce jour, la SLA est incurable et il n'existe aucun traitement efficace pour les personnes atteintes de cette maladie.

1.1.2 Symptômes cliniques

Il existe deux différentes formes de la SLA, soit la forme spinale et la forme bulbaire (13). Environ 70% des patients présentent la forme spinale qui est caractérisée par des faiblesses, des contractions et des crampes musculaires des membres aboutissant à une atrophie des muscles. Cette forme est responsable de la dégénérescence des neurones moteurs de la moelle épinière. Environ 30% des patients développent plutôt la forme bulbaire dans laquelle les muscles de l'élocution, de la déglutition et de la respiration dégénèrent en premier. (14). Cette forme se manifeste chez les patients par une désorganisation des mots due à une altération des mouvements de la langue et une difficulté à avaler (15). La forme bulbaire est la forme la plus dévastatrice puisque ce sont ces patients qui déclinent le plus rapidement. Ils survivent en général moins longtemps que les patients atteints de la forme spinale (moins que 2 ans après le diagnostic) et leur qualité de vie est réduite de façon significative. De plus, des études suggèrent que la forme bulbaire pourrait présenter un fardeau accru de troubles cognitifs et/ou du langage. Par contre, la majorité des patients atteints de la forme spinale, soit environ 85%, vont développer des symptômes bulbaires avec la progression de la maladie (14). Environ 20% des individus vivant avec la SLA vont aussi développer une démence fronto-temporale (DFT) qui est un trouble cérébral progressif qui affecte la personnalité, le comportement et le langage. Au niveau clinique, ces deux maladies peuvent se chevaucher et générer le trouble du spectre fronto-temporal de la SLA. La communication devient donc très difficile avec la progression de la maladie pour ces patients SLA-DFT (16, 17).

1.1.3 Gènes associés à la SLA

Depuis quelques décennies, plusieurs anomalies génétiques ont été associées à la SLA, dont des mutations dans des gènes causant la forme familiale et qui peuvent aussi contribuer au développement de la forme sporadique.

Des mutations dans le gène *C9orf72* représentent la plus grande proportion soit 30-40% des patients atteints de la SLA familiale. La protéine encodée par ce gène joue un rôle dans la régulation du trafic des endosomes. Elle semble également interagir avec les protéines Rab qui sont impliquées dans l'autophagie et le transport endocytaire. Une expansion répétée de la séquence GGGGCC dans le premier intron du gène *C9orf72* semble être la cause la plus fréquente de la SLA et la DFT, mais le mécanisme pathologique reste encore incompris (18). Trois mécanismes pathologiques différents ont été proposés soit la perte de fonction de la protéine *C9orf72*, le gain de fonction toxique de l'ARN répété *C9orf72* ou encore la production de protéines dipeptidiques due à la répétition par une traduction sans codon d'initiation. Cela dit, il se peut également que la pathogénicité passe par la combinaison de ces trois mécanismes (19).

Des mutations dans le gène *SOD1* (superoxyde dismutase 1) représentent environ 15-20% des cas de SLA familiale (20). La protéine *SOD1* se lie aux ions de cuivre et de zinc et est une isoenzyme responsable de la destruction des radicaux libres superoxydes dans le corps. Environ 185 mutations différentes associées à la SLA ont été identifiées dans les exons de *SOD1* et elles semblent toutes passer par un mécanisme de gain de fonction toxique en augmentant le stress oxydatif (21, 22). Plusieurs mécanismes de toxicité ont été proposés incluant une excitotoxicité, une neuroinflammation, une perte d'homéostasie protéique, un dysfonctionnement mitochondrial et un transport axonal défectueux. Les neurones sont particulièrement vulnérables à ce type de perturbations et celles-ci peuvent contribuer au développement de maladies neurodégénératives (22).

Environ 5% des cas de SLA de type familial comportent des mutations dans le gène *TARDBP* (« TAR DNA Binding Protein-43 ») qui code pour la protéine TDP-43 (23). TDP-43 est une protéine de liaison à l'ADN/ARN localisée majoritairement dans le noyau, et qui joue un rôle dans la régulation de la transcription, de l'épissage et de la stabilité de l'ARN (24). Dans des cas pathologiques, TDP-43 est hyperphosphorylée, ubiquitinée, clivée et se retrouve majoritairement dans le cytoplasme où elle s'agrège et forme des inclusions dans les neurones moteurs (25). De plus, TDP-43 s'assemble dans des granules de stress (GS) à la suite d'une exposition au stress que ce soit par stress oxydatif, choc thermique, infection virale ou produits chimiques. En fait, TDP-43 est également impliquée dans l'assemblage et la maintenance des GS. Plusieurs mutations dans

le gène *TARDBP* affectent différemment la dynamique des GS de façon à ce que ces dernières puissent être protectrices pour la cellule ou non. Ainsi, l'accumulation et l'agrégation cytoplasmique de TDP-43 dans des corps d'inclusions confèrent une perte de fonction ainsi qu'un gain de fonction toxique (26).

Comme pour le gène *TARDBP*, des mutations dans l'oncogène *FUS* (« Fused in Sarcoma ») représentent environ 5% des cas de SLA familial (27). *FUS* est également une protéine de liaison à l'ADN/ARN qui possède un rôle dans plusieurs processus cellulaires comme la régulation de la transcription, de l'épissage, du transport de l'ARN et la réparation de l'ADN (28). Étant donné que TDP-43 et *FUS* possèdent certaines similarités de fonctions, il est possible de supposer que ces deux protéines pourraient avoir les mêmes mécanismes pathologiques générant une neurodégénérescence. Tout comme TDP-43, la pathologie de *FUS* est caractérisée par une mauvaise localisation de la protéine au cytoplasme et simultanément, une réduction de son expression nucléaire dans les neurones affectés (29). Par contre, de plus en plus d'études suggèrent que des mutations dans *FUS* ciblent des mécanismes différents pour engendrer une apparition précoce et une progression agressive de la maladie (30).

1.1.4 Possibilités thérapeutiques

Le développement de thérapies efficaces représente un réel défi pour la communauté scientifique. Ceci peut être expliqué par le fait que la SLA est une maladie complexe et multifactorielle. Encore à ce jour, aucun traitement ne permet de ralentir de manière significative ou d'arrêter la progression de la maladie. Malgré plusieurs essais cliniques, les seuls médicaments approuvés par la FDA américaine (« Food and Drug Administration ») sont le riluzole et le Radicava (edaravone) (31). Ces deux médicaments semblent être en mesure de ralentir la progression de la maladie et prolonger l'espérance de vie des patients. Par contre, leurs effets sur ces deux paramètres sont très modestes et peu convaincants (32).

Le riluzole est le premier traitement systémique qui a été approuvé par la FDA en 1995 (33). Ce médicament retarde le déclin de la capacité respiratoire et prolonge la survie moyenne des patients atteints de la SLA (34). Le riluzole est un inhibiteur de la neurotransmission glutamatergique et donc empêche la libération du glutamate dans la fente synaptique. Les

niveaux de glutamate semblent augmenter de façon significative dans le cerveau et la moelle épinière des patients ce qui endommage les cellules nerveuses. Le mécanisme d'action repose sur le fait qu'en diminuant l'accumulation du glutamate dans la fente synaptique, la détérioration des neurones moteurs est ralentie (35).

L'edaravone a récemment été approuvé par la FDA en mai 2017 et par Santé Canada en octobre 2018 (36). Le mécanisme d'action exacte de ce traitement pour la SLA reste encore inconnu, mais son effet thérapeutique semble passer par ses propriétés antioxydantes. En effet, le stress oxydatif est un des processus qui est impliqué dans la dégénérescence des neurones. Ainsi, l'edaravone diminuerait les effets du stress oxydatif dans la SLA (31).

D'autres thérapies sont présentement en investigation et semblent prometteuses. En effet, l'apilimod est une molécule inhibitrice de PIKFYVE, une enzyme également connue sous le nom de phosphoinositide 3-kinase. Cette enzyme est impliquée dans de nombreux processus incluant le trafic membranaire. Ainsi, l'inhibition de PIKFYVE semble améliorer ce processus dans les neurones, puisque la modulation du trafic vésiculaire est normalement affectée dans la SLA impliquant *C9orf72* (18).

Le pimozide est un médicament antipsychotique déjà approuvé par la FDA et utilisé pour traiter des psychoses chroniques, comme la schizophrénie. Dans ce contexte, le pimozide possède principalement une activité de blocage des récepteurs de la dopamine D2. Dans un contexte de neurodégénérescence, l'évaluation de comportements moteurs est indépendante de l'action de la dopamine. Son mécanisme d'action repose sur le fait qu'il bloque les canaux Ca^{2+} de type T ce qui semble améliorer la transmission dans les jonctions neuromusculaires. Ce médicament est présentement en phase 2 clinique pour évaluer s'il peut, par son mécanisme d'action, retarder la progression de la maladie chez des patients atteints de la SLA (37).

1.2 Protéine TDP-43

1.2.1 Structures et caractéristiques

La protéine TDP-43 (« TAR DNA binding protein-43 ») a été identifiée en 1995 comme répresseur de la transcription de VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine) et est importante pour la

régulation de l'expression du gène viral. Cette protéine de liaison à l'ARN et l'ADN de masse molaire de 43 kDa est hautement conservée, exprimée de façon ubiquitaire et fait partie de la grande famille hnRNP (« heterogeneous nuclear ribonucleoprotein ») (24). Cette famille comprend des protéines qui peuvent se lier à l'ARN de façon séquence-spécifique via la présence de RRM (« RNA recognition motifs »). TDP-43 contient 414 acides aminés (aa) et son gène codant, *TARDBP*, se situe sur le chromosome 1. Cette protéine comprend une région N-terminal (1-102 aa) avec un signal de localisation nucléaire (NLS, 82-98 aa), deux RRM : RRM1 (104-176 aa) et RRM2 (192-262 aa), un signal d'export nucléaire (NES, 239-250 aa), et une région C-terminal (274-414 aa) qui contient un domaine riche en glutamine et asparagine (345-366 aa) ainsi qu'une région riche en glycine (366-414 aa) (Figure 1). La structure complète de TDP-43 n'a pas encore été déterminée à cause de sa faible solubilité *in vitro* et de sa haute capacité à s'agréger. Par contre, certains groupes de recherche ont été en mesure de déterminer des structures de hautes résolutions de certains domaines de la protéine (26).

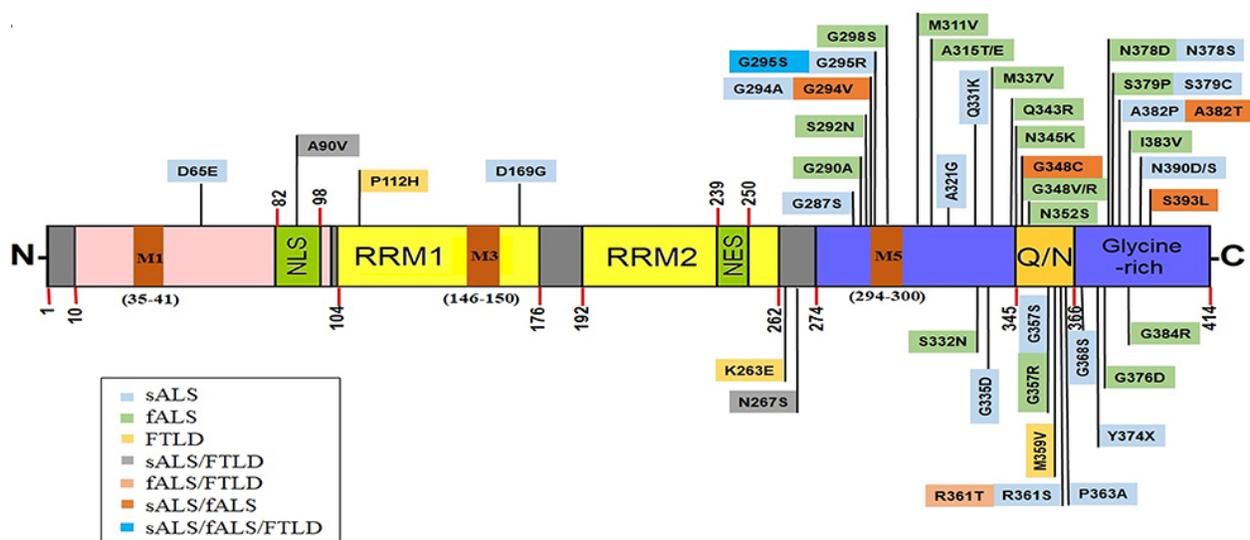


Figure 1. – Organisation des éléments structurels de TDP-43.

TDP-43 comprend un domaine N-terminal, deux domaines « RNA recognition motifs » (RRMs), un signal d’export nucléaire (NES), un signal de localisation nucléaire (NLS), un domaine C-terminal de type « prion-like » (avec des régions riches en glutamine/asparagine et glycine) et des motifs de localisation mitochondriale. Des mutations de type sporadique ou familial liées à la SLA et à la DFT y sont illustrées. Figure adaptée de (26).

Dans des conditions physiologiques normales, TDP-43 serait nativement dimérique ou en équilibre entre un monomère et un dimère. La dimérisation de TDP-43 se produit grâce à des interactions entre des résidus du domaine N-terminal. Par contre, certains disent que la dimérisation est nécessaire pour ses fonctions physiologiques tandis que d’autres prétendent qu’elle serait impliquée dans l’agrégation. Des mutations dans le signal de localisation nucléaire (NLS) qui se situe dans le domaine N-terminal induit une relocalisation cytoplasmique et une agrégation de TDP-43 (26).

Les protéines de liaison à l’ARN possèdent des « RNA recognition motifs » (RRM) hautement conservés et ceux-ci sont parmi les domaines protéiques les plus abondants chez les eucaryotes. Ces domaines séparés de 15 acides aminés dans TDP-43 sont responsables des interactions directes avec les molécules d’ARN/ADN cibles. Des mutations dans les RRM semblent empêcher la capacité de liaison sans interférer de façon significative avec la reconnaissance de l’ARN. La

liaison à l'ADN et l'ARN simple brin semble augmenter la solubilité de TDP-43 et par le fait même, prévenir son agrégation. La protéine TDP-43 se lie à la région 3' non-traduite (UTR) de plusieurs transcrits ARNm, mais également à son propre ARNm comme mécanisme d'autorégulation pour réguler sa concentration intracellulaire (26, 38).

La région C-terminal de TDP-43 est très hétérogène et comprend une région riche en glycine et aussi un segment enrichi en glutamine (Q) et asparagine (N). Cette composition est très similaire aux domaines « prion-like » et beaucoup de protéines de liaisons à l'ARN/ADN arborent ce genre de domaine. La région C-terminal semble particulièrement impliquée dans la pathologie de TDP-43. Comme les domaines « prion-like », ce domaine est désordonné et prédisposé à une agrégation pathologique. C'est également dans la région C-terminal que l'on retrouve la majorité des mutations et sites de phosphorylation associés à la SLA (Figure 1). De plus, dû à une activité aberrante de caspases, certains fragments de 25-35 kDa de la région C-terminal sont produits (26). Ces fragments sont très délétères pour les cellules et se retrouvent majoritairement dans les corps d'inclusions. Plus récemment, la région C-terminal de TDP-43 semble pouvoir subir une séparation de phase liquide-liquide (LLPS) pour former des gouttelettes de protéines dynamiques. Les résidus de la région C-terminal peuvent engendrer des interactions modérées au sein des gouttelettes pour générer la formation de granules de stress. La formation d'agrégats irréversibles est causée par les gouttelettes qui subissent une séparation de phase liquide à solide due à des mutations, du stress ou le vieillissement (26, 38).

Ainsi, la compréhension de la fonction de chacun des domaines de TDP-43 est indispensable pour pouvoir tenter d'élucider son rôle et sa pathologie dans les protéinopathies où elle est impliquée. En effet, l'accumulation de TDP-43 en inclusions est liée à de nombreuses conditions neurodégénératives autres que la SLA, de sorte que les protéinopathies de TDP-43 peuvent être considérées comme une catégorie à part entière (39, 40).

1.2.2 Fonctions physiologiques normales et pathologiques

TDP-43 est principalement localisée dans le noyau où elle exerce ses fonctions principales, mais elle peut également transférer dans le cytoplasme pour en effectuer d'autres. Cette protéine possède de nombreuses fonctions dont être impliquée dans la transcription, l'épissage, la

traduction, la stabilisation, la maturation et le transport d'ARNm. TDP-43 se lie à environ 6 000 transcrits d'ARNm ce qui représente près de 30% du transcriptome entier (41). Cette protéine se lie avec une haute spécificité à des séquences d'ARN riche en UG, mais également aux 3'UTR d'ARNm lorsque localisée dans le cytoplasme (Figure 2). Dans des conditions pathologiques comme la SLA, la concentration cytoplasmique de TDP-43 augmente ce qui engendre la formation de corps d'inclusions (26). Ces inclusions peuvent être particulièrement dommageables pour des cellules comme les neurones moteurs.

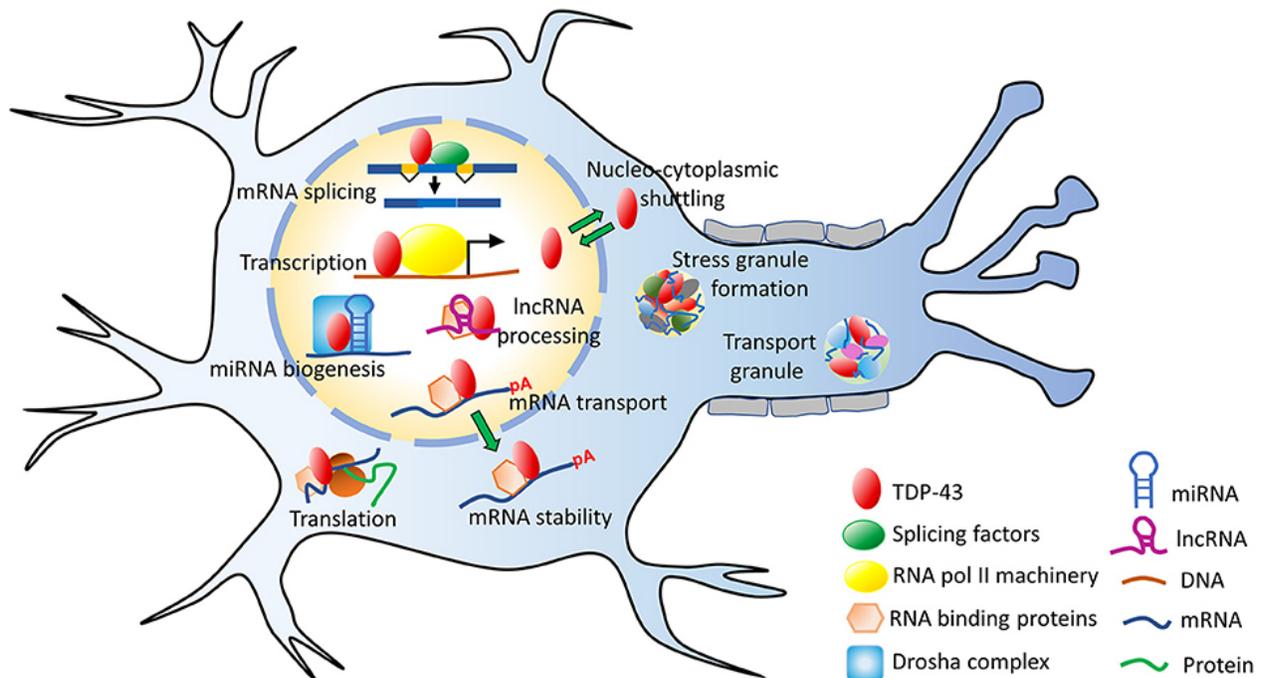


Figure 2. – Les différentes fonctions cellulaires de TDP-43.

TDP-43 est impliquée dans plusieurs processus dont la transcription, l'épissage, le maintien de la stabilité des ARN et plus encore. C'est une protéine majoritairement nucléaire, mais elle peut transloquer au cytoplasme. Dans le cytoplasme, TDP-43 participe à la formation des granules de stress (26).

TDP-43 se localise aux sites de transcription pour réguler l'épissage de plusieurs transcrits de gènes importants comme le régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique (*CFTR*), *FUS* (Fused in Sarcoma), *SNCA* (α -synuclein), *HTT* (Huntingtin), *APP* (précurseur de protéine amyloïde), etc. Une déplétion de TDP-43 au niveau du noyau engendre une déficience de l'épissage d'ARNm. En contrepartie, une abondance de TDP-43 peut former des complexes

non fonctionnels dus à une limitation de la présence des partenaires de liaison protéiques (26). Ainsi, une dérégulation de TDP-43 engendre des problèmes d'épissages dans les neurones moteurs.

En liant des transcrits d'ARNm, TDP-43 stabilise ces derniers incluant son propre ARNm. L'interaction de TDP-43 avec les séquences 3'UTR des ARNm peut les réguler de façon positive ou négative. L'association TDP-43/ARN forme des granules de ribonucléoprotéines (RNP) qui permettent le transport des ARNm à des sites distants dans la cellule (38). Cette fonction est donc très importante pour des types cellulaires très polaires comme les neurones.

Des études protéomiques ont généré le profil d'interaction protéique de TDP-43 ce qui a permis d'identifier des partenaires d'interaction impliqués dans le métabolisme d'ARN. TDP-43 peut former des complexes avec d'autres protéines impliquées dans la machinerie de traduction comme les ribosomes. De plus, TDP-43 peut réguler de façon négative la traduction de plusieurs ARNm en séquestrant des facteurs de traduction dans des granules de stress (26).

La formation rapide de granules de stress (GS) sans membrane dans le cytoplasme est un mécanisme de protection cellulaire engendré par une exposition au stress comme un stress oxydatif, un choc thermique, une infection virale, une exposition chimique, etc. Dans des conditions normales, le processus de formation des GS est réversible et elles se dissolvent une fois que le stress est terminé. Les cellules neuronales semblent particulièrement sensibles à celui-ci et un dysfonctionnement au niveau des mécanismes de réponse au stress pourrait contribuer à la conversion des GS en corps d'inclusion qui sont retrouvés chez des patients atteints de la SLA. TDP-43 s'assemble en GS et est également impliquée dans l'assemblage et le maintien de l'intégrité de ceux-ci. Ainsi, des mutations associées à la SLA dans la protéine TDP-43 peuvent affecter différemment la dynamique des GS (38).

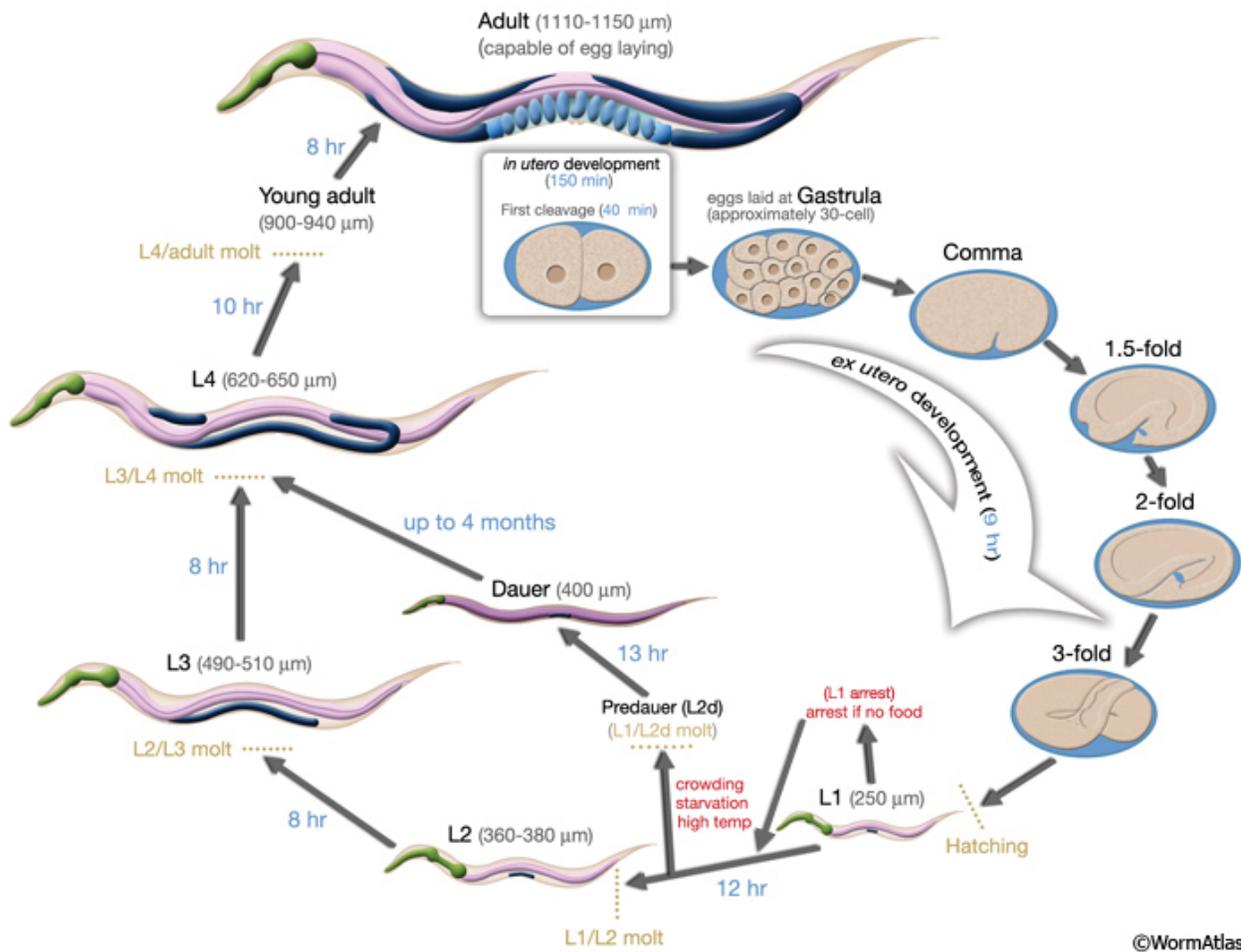
La phosphorylation et l'ubiquitination sont les deux modifications post-traductionnelles (MPT) les plus souvent retrouvées dans TDP-43 dans un contexte pathologique (42). TDP-43 possède plusieurs acides aminés qui peuvent être de potentiels sites de phosphorylation. L'augmentation de la mauvaise localisation cytoplasmique de TDP-43 ainsi que de son agrégation dans les cellules neuronales est directement liée à sa phosphorylation (26). Des inclusions de TDP-43

phosphorylée ont été retrouvées dans le cortex cérébral et des cellules de la moelle épinière de patients SLA. Des inclusions de TDP-43 ubiquitinée ont également été observées dans le cerveau de patients atteints de la SLA (43). Des mutations sur les sites d'ubiquitination ont pour effet de diminuer l'accumulation de TDP-43, ce qui suggère que l'ubiquitination pourrait moduler l'agrégation de TDP-43 (44). TDP-43 peut également subir d'autres MPT comme l'acétylation, l'ADP-ribosylation ou encore l'oxydation de cystéine (26).

1.3 L'organisme modèle *Caenorhabditis elegans*

1.3.1 Pertinence de *C. elegans* comme modèle de recherche

L'organisme *Caenorhabditis elegans* a été publié pour la première fois en 1899 par Émile Maupas qui s'intéressait à son mode de reproduction (45). Ce modèle a pris une importance remarquable grâce aux travaux de Sydney Brenner dans les années 1960. Il recherchait un organisme multicellulaire qui serait un bon modèle de recherche pour étudier simultanément la génétique, l'anatomie neuronale et le développement (46). En effet, le nématode *C. elegans* comporte plusieurs avantages dont une petite taille (1 mm à l'âge adulte), un génome compact, un cycle de développement rapide (3 à 5 jours à 20°C), un cycle de vie relativement court (20-30 jours), une reproduction hermaphrodite rapide, une simple manipulation génétique (présence de mâle), un simple système nerveux ainsi qu'une transparence constante durant son cycle de vie (Figure 3) (47-49). Entre 60-80% des gènes humains possèdent un orthologue chez le *C. elegans* selon l'approche bio-informatique utilisée (50, 51). Ainsi, la conservation des gènes, des molécules et des interactions génétiques constitue un net avantage pour étudier la génétique avec ce modèle. Dans le contexte de l'étude de maladies neurodégénératives, le nématode devient un modèle de choix si celui-ci possède un homologue du gène causant de la maladie humaine. En effet, il est estimé qu'environ 40% des gènes de maladies humaines ont un orthologue dans le génome de *C. elegans* (52). L'utilisation de ce modèle constitue un moyen simple et rapide pour identifier des modificateurs par criblage génétique ou de médicaments de manière non biaisée *in vivo*.



©WormAtlas

Figure 3. – Les différents stades du cycle de vie de *C. elegans* à 22 °C de la fertilisation jusqu’au stade adulte.

Les nombres en bleu correspondent à la durée de chaque stade (47).

1.3.2 Anatomie du système nerveux de *C. elegans*

C. elegans possède un simple système nerveux, mais qui a été largement étudié. Chez l’adulte hermaphrodite, il est constitué de 302 neurones au total. Ces neurones appartiennent à deux systèmes nerveux indépendants, soit le système nerveux somatique (282 neurones) et le système nerveux du pharynx (20 neurones) (53). Les neurones du nématode communiquent à travers environ 6400 synapses chimiques, 900 jonctions gap et 1500 jonctions neuromusculaires (54). Les neurones de *C. elegans* peuvent être classés selon quatre catégories fonctionnelles, soit les neurones moteurs (contacts synaptiques avec les cellules musculaires), les neurones sensoriels (spécialisation sensorielle, exemple : comportementale), les interneurons (reçoivent et envoient

des synapses sur d'autres neurones) et les neurones polymodaux (qui possèdent plusieurs fonctions) (55).

La catégorie des neurones moteurs comprend 113 des 302 neurones de *C. elegans*. Ceux-ci contrôlent la reptation (« crawling »), la nage ainsi que la motilité des systèmes alimentaires et reproducteurs des nématodes. Cette catégorie se subdivise en 8 classes supplémentaires : AS, DA, DB, DD, VA, VB, VC, et VD (55). Les neurones moteurs de type A,B- sont cholinergiques et excitateurs tandis que ceux de type D- sont GABAergiques et inhibiteurs. Les 26 neurones moteurs GABAergiques sécrétant l'acide γ -aminobutyrique est le principal neurotransmetteur inhibiteur chez le *C. elegans* (Figure 4) (56). Le préfixe V- ou D- correspond à la localisation d'innervation, soit ventrale ou dorsale. Les corps cellulaires des neurones moteurs GABAergiques se retrouvent sur la corde ventrale du nématode.

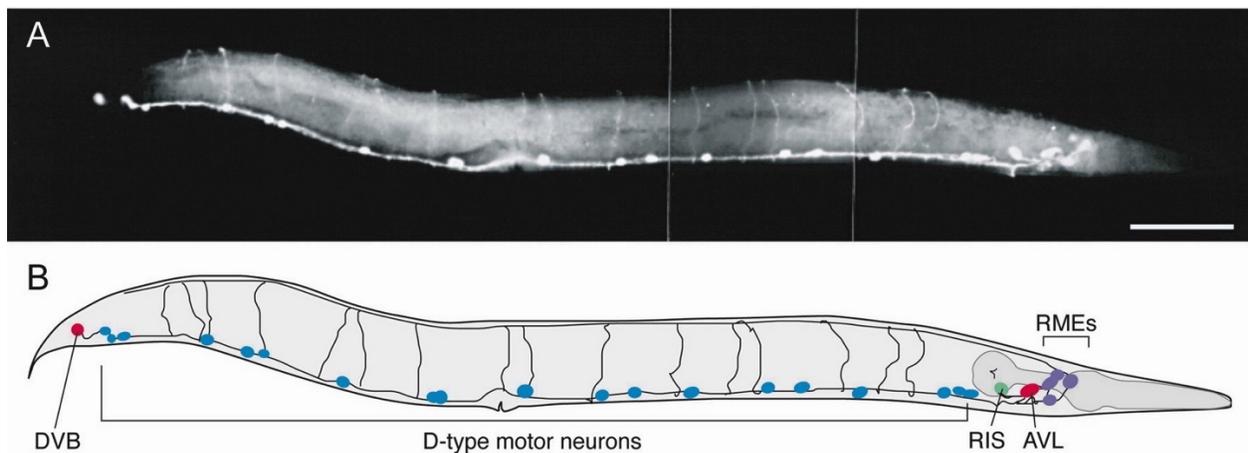


Figure 4. – Le système nerveux moteur GABAergique.

(A) Représentation fluorescente des 26 neurones GABAergiques d'un hermaphrodite adulte. (B) Représentation schématique de la position des 26 neurones GABAergiques (57).

Les neurones moteurs de type D- reçoivent au niveau post-synaptique des JNM des innervations des neurones moteurs excitateurs (de type A- ou B-). Les neurones de type D- ventral ou dorsal interagissent comme des inhibiteurs croisés. Ainsi, lorsqu'un groupe de muscles ventraux ou dorsaux est activé par un neurone moteur cholinergique, le groupe de muscles opposé est inhibé et donc, détendu (54).

Figure 5. – Comparaison entre les protéines orthologues TDP-43 et TDP-1.

(A) Alignement des séquences d'acides aminés entre TDP-43 (isoforme 1, humain) et TDP-1 (isoforme c, *C. elegans*) (61). (B) Comparaison schématique des différents domaines des protéines TDP-43 (isoforme 1, humain) et TDP-1 (isoforme a, *C. elegans*). Figure adaptée de (62).

1.3.4 Différents modèles de *C. elegans* pour la SLA

Plusieurs modèles de *C. elegans* pour la SLA ont été générés dans les dernières années possédant chacun leurs caractéristiques et leurs phénotypes propres.

Des modèles de *C. elegans* ont été produits pour étudier l'agrégation toxique de la protéine SOD1. Comme mentionné précédemment, des mutations dans SOD1 sont retrouvées dans des cas de SLA familiale. Le groupe de recherche a exprimé des protéines SOD1 mutantes et de type sauvage (WT SOD1) dans les cellules de la paroi musculaire du nématode sous le promoteur tissu-spécifique *unc-54*. Les modèles transgéniques expriment trois mutations distinctes de la protéine associées à la SLA, soit G85R, G93A et 127X. Leurs résultats montrent que l'expression dans les muscles de ces trois mutations entraîne une faible toxicité dont un dysfonctionnement cellulaire léger et une apparition d'agrégats de protéines possédant des caractéristiques morphologiques distinctes. Par contre, ils ont trouvé qu'en intégrant des mutations sensibles à la température en arrière-plan, les modèles révèlent d'autres phénotypes davantage toxiques qui ne sont pas présents dans les souches exprimant uniquement les mutants SOD1 (63).

Un autre groupe a généré un modèle exprimant la protéine humaine SOD1 avec la mutation associée à la SLA, G85R, dans les neurones de *C. elegans* sous le promoteur pan-neuronal *snb-1*. Leur modèle arbore des défauts de locomotion associés à une agrégation et un dysfonctionnement synaptique (64).

Les deux exemples précédents sont des modèles de surexpression qui décrivent un gain de fonction toxique de SOD1 qui est retrouvé dans la pathogénèse de la SLA. Par contre, l'impact de la perte de fonction de SOD1 ne peut pas être étudié dans ces modèles. Un groupe de recherche a donc généré plusieurs modèles « knock-in » à copie unique du gène endogène *sod-1* ayant des mutations retrouvées chez des patients atteints de la SLA. Il a été observé que les mutations avaient un impact différent sur la neurodégénérescence glutamatergique et cholinergique.

Cependant, aucune neurodégénérescence n'a été observée dans les populations de neurones dopaminergiques et sérotoninergiques (65).

Des modèles transgéniques de *C. elegans* ont été générés intégrant le gène humain *tdp-43* dans le système nerveux sous le promoteur pan-neuronal *snb-1*. Un groupe a exprimé la protéine humaine TDP-43 de type sauvage ainsi que des formes mutantes associées à la SLA, Q331K et M337V, de façon pan-neuronale. Ces modèles de *C. elegans* développent de sévères défauts de locomotions liés à l'agrégation de TDP-43 dans les neurones. Par contre, ils ne présentent pas de perte significative de neurones ni d'anomalies dans la morphologie de ceux-ci. Les défauts de locomotions semblent plutôt passer par une faible efficacité de la transmission synaptique (66). Un autre groupe a exprimé les mutations suivantes associées à la SLA dans les neurones de *C. elegans* (promoteur *snb-1*): G290A, A315T et M337V. Leurs modèles sont en mesure de reproduire certaines caractéristiques clés de la SLA comme une diminution de la fonction motrice induite par l'âge, une réduction de la durée de vie, une dégénérescence des neurones moteurs, et une hyperphosphorylation, troncation et ubiquitination de TDP-43 qui s'accumule dans des dépôts protéiques insolubles (67).

Plus récemment, des souches transgéniques de *C. elegans* ont été générées exprimant les protéines humaines de type sauvage TDP-43 et FUS dans les neurones moteurs GABAergiques (promoteur *unc-47*) ainsi que des souches arborant des mutations cliniques, A315T et S57Δ dans les protéines respectives. Ces modèles mutants présentent une perte de motilité, une paralysie progressive et une dégénérescence neuronale en fonction de l'âge comparativement aux souches de type sauvage. De plus, les protéines TDP-43 et FUS mutantes semblent hautement insolubles contrairement à celles de type sauvage suggérant que la toxicité engendrée pourrait passer par un défaut de repliement de ces protéines (68).

Un autre groupe a généré une série de modèles de *C. elegans* ayant diverses mutations liées à la SLA dans la protéine humaine FUS selon leur sévérité clinique. Chaque modèle exprime la protéine FUS avec une des mutations suivantes R514G, R521G, R522G ou P525L de façon pan-neuronale sous le promoteur *snb-1*. Ces mutants provoquent, par un effet de gain de fonction

dominant, une mauvaise localisation cytoplasmique de la protéine, un dysfonctionnement moteur progressif et une réduction de la durée de vie des nématodes (69).

Il y a quelques années, un groupe de recherche a élaboré un modèle de *C. elegans* exprimant des protéines de répétitions dipeptidiques dans les neurones moteurs GABAergiques (promoteur *unc-47*) pour tenter de reproduire la toxicité liée au gène humain *C9orf72* dans la SLA. En effet, le *C. elegans* contient un gène homologue, *alfa-1*, mais celui-ci ne contient pas la séquence répétitive GGGGCC (voir la section 1.1.3). Ainsi, leur modèle démontre des rôles importants pour le vieillissement et la localisation des protéines dans la toxicité des dipeptides (70).

1.4 Autres modèles de recherche pour la SLA

Outre les modèles de *C. elegans*, plusieurs autres types de modèles ont été et doivent être générés pour pouvoir étudier les mécanismes de développement de la SLA et d'autres protéinopathies.

Des modèles de levures utilisant l'organisme *Saccharomyces cerevisiae* ont été développés pour pouvoir étudier les mécanismes pathologiques de TDP-43 dans la SLA. Ces études ont permis d'examiner la délocalisation et l'agrégation de TDP-43 entre autres. Des modèles de levure présentant une toxicité liée à l'agrégation des protéines FUS ou SOD1 ont également été répertoriés (71).

La drosophile présente plusieurs caractéristiques communes avec le nématode *C. elegans* soit un simple système nerveux, une courte espérance de vie et le fait de posséder plusieurs gènes hautement conservés avec l'humain. Les effets de plusieurs mutations associées à la SLA ont été caractérisés chez la mouche, dont des mutations dans les protéines SOD1, FUS, TARDBP, C9orf72 et plus encore. En effet, les études d'interactions génétiques dans la drosophile ont été innovatrices dans la découverte de mécanismes moléculaires et cellulaires pathologiques de la SLA (72).

Un modèle vertébré plus élaboré comme le poisson-zèbre permet de partager davantage d'aspects anatomiques et développementaux avec l'humain tout en restant petit et relativement simple. Des modèles de gain et de perte de fonctions de la protéine C9orf72 ont été développés

chez le poisson-zèbre tout comme un modèle mutant de la protéine SOD1 (G93R) et de TDP-43 (A315T et Q331K). Chacun de ces modèles présente un certain nombre de caractéristiques associées à la SLA (73).

Des modèles comme la souris ou le rat ont l'avantage de posséder des systèmes plus gros et complexes qui se rapprochent davantage de l'humain, et qui sont utiles pour développer des thérapies potentielles. Le modèle de souris le plus utilisé pour étudier la SLA est celui qui exprime la protéine humaine SOD1 avec la mutation G93A. L'avantage de ce modèle est qu'il présente une dégénérescence rapide des neurones moteurs conduisant à une paralysie et une mort dans les 5 premiers mois de vie. Par contre, ces souris ont tendance à supprimer un nombre de copies de façon spontanée ce qui peut affecter directement la gravité de la maladie (73). Un autre modèle de souris a été développé exprimant la protéine humaine mutante TDP-43(Q331K). Ce modèle possède plusieurs caractéristiques clés de la SLA comme un dysfonctionnement moteur progressif, une atrophie musculaire, une perturbation de l'intégrité des jonctions neuromusculaires, une dégénérescence des neurones moteurs, et ce, à l'âge de 10 mois. Par contre, le phénotype moteur de ce modèle est limité aux neurones moteurs inférieurs et aucune agrégation cytoplasmique ou exportation nucléaire de TDP-43 n'a été identifiée (73).

Ainsi, l'élaboration de ces différents modèles a pour but de les employer comme outils pour étudier les mécanismes de toxicité mettant en jeu TDP-43 ou d'autres protéines impliquées dans la SLA. Chaque modèle possède ses avantages et inconvénients, il s'agit de choisir ou de générer celui qui permettra de répondre à la problématique posée.

1.5 Objectifs du projet recherche

1.5.1 Problématique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale caractérisée par une perte progressive et sélective des neurones moteurs supérieurs et inférieurs. Cette maladie apparaît de façon tardive avec une moyenne d'âge de 55 ans et les patients atteints de la SLA meurent généralement d'une insuffisance ventilatoire 2 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes (4-8). La SLA est incurable et il n'existe aucun traitement efficace pour les personnes atteintes de cette maladie.

Ainsi, l'étude des mécanismes moléculaires et des voies de signalisation impliqués dans la SLA est primordiale pour être en mesure d'en apprendre davantage sur cette maladie. Une meilleure compréhension de la SLA permettra, éventuellement, de développer de nouveaux traitements qui pourront ralentir de façon significative la progression de la maladie et dans le meilleur des cas, traiter efficacement les patients atteints. Par conséquent, l'élaboration de modèles de recherche est essentielle pour pouvoir étudier les mécanismes intrinsèques de la SLA avant de poursuivre à la recherche clinique.

Le laboratoire a précédemment développé un modèle transgénique de *C. elegans* surexprimant la protéine humaine TDP-43 de type sauvage (WT) et mutante (Q331K) sous le promoteur spécifique des neurones moteurs GABAergiques, *unc-47*. La mutation Q331K est un défaut génétique que l'on retrouve chez des patients atteints de la SLA. Le laboratoire a également obtenu par mutagenèse et CRISPR/Cas9 des modèles physiologiquement représentatifs du nématode basés sur des mutations endogènes dans *tdp-1*, l'orthologue de TARDBP.

1.5.2 Hypothèse et objectifs

Le but du projet est de caractériser les modèles transgéniques TDP-43 et endogènes TDP-1 de *C. elegans* pour déterminer si ceux-ci peuvent récapituler certains aspects phénotypiques clés de la maladie SLA tels que des déficits moteurs et une neurodégénérescence liée à l'âge générant une paralysie.

L'hypothèse est que le modèle TDP-1 pourra refléter plus précisément l'expression physiologique du gène dans la maladie humaine grâce à la mutation dans un gène endogène, l'absence de surexpression et l'expression ubiquitaire de la protéine TDP-1.

Pour être en mesure de répondre à l'hypothèse du projet de recherche, deux objectifs sont proposés :

- I. Explorer l'impact des mutations TDP-43/TDP-1 sur l'aspect physiologique des modèles.
- II. Évaluer les répercussions de ces défauts génétiques sur l'intégrité du système nerveux moteur.

Chapitre 2 – Matériels et méthodes

2.1 Maintenance des souches *C. elegans*

Des méthodes standard de culture et de manipulation des nématodes ont été utilisées, comme déjà décrites précédemment (74). Les nématodes ont été maintenus sur des boîtes de Petri standards de milieux de croissance de nématodes (NGM) qui ont été striées avec la source de nourriture OP50 *Escherichia coli* à 15 °C. Toutes les expériences ont été réalisées à 20 °C. La souche N2 de type sauvage (wild-type, WT) ainsi que *unc-47p::GFP* et *unc-17p::GFP;unc-47p::mCherry* ont été obtenues par le «Caenorhabditis Genetics Center» de l'Université du Minnesota. Les souches *tdp-1(gk736460)* et *tdp-1(gk149996)* (TDP-1(R393C) et TDP-1(R258C)) ont été obtenues du Million Mutation Project (75). Les souches *tdp-1(syb1989)* et *tdp-1(syb1905)* (crTDP-1(R393C) et crTDP-1(R258C)) ont été générées par CRISPR-Cas9 et obtenues de SunyBiotech (ville de Fuzhough, Fujian, Chine). Les autres souches de *C. elegans* utilisées dans cette étude se trouvent dans le Tableau 3 (annexe 1). Les souches mutantes ont été croisées avec la souche WT au moins 3 fois. L'homozygotie de tous les génotypes a été confirmée par PCR ou HRM. Les amorces utilisées pour le séquençage et le génotypage sont énumérées à l'annexe 2.

2.2 Construction de plasmides et transgénèse

Le plasmide d'ADN contenant *tdp-43* WT ou mutant sous le contrôle du promoteur spécifique des neurones moteurs GABAergiques (*unc-47*) a été préparé par Mutagenex, Inc. en utilisant le vecteur pCFJ212 et le marqueur transgénique *unc-119(ed3)*. Le plasmide de co-injection *myo-2::mCherry* a également été utilisé comme marqueur fluorescent. Les micro-injections des plasmides et les services de réseaux extrachromosomiques ont été effectués par Knudra (maintenant appelé InVivo Biosystems). Les plasmides ont été intégrés dans le génome des nématodes à l'aide d'UV. Les souches ont été croisées 6 fois avec la souche WT. Les nématodes positifs pour le marqueur *mCherry* ont été sélectionnés et la présence du transgène a été vérifiée par PCR. Ceci a été fait précédemment dans le laboratoire.

2.3 Synchronisation d'une population selon l'âge

Pour obtenir une population de nématodes synchronisée selon l'âge, environ 4-5 hermaphrodites adultes gravides ont été mis sur 6-8 boîtes de Petri contenant du NGM etensemencées avec de l'OP50 *E. coli* en fonction de la taille de la population souhaitée. Les hermaphrodites gravides ont pondu des œufs pendant 4-5 heures à température ambiante avant d'être retirés des boîtes de Petri NGM. Celles-ci ont été conservées à 20 °C jusqu'à ce que la descendance atteigne le jour 1 d'âge adulte (environ 3 jours).

2.4 Synchronisation d'une population selon l'âge par blanchissement

Pour obtenir une population de nématodes synchronisée selon l'âge, environ 4-5 hermaphrodites adultes gravides ont été mis sur 8-10 boîtes de Petri contenant du NGM etensemencées avec de l'OP50 *E. coli* en fonction de la taille de la population souhaitée. Les boîtes de Petri sont entreposées à 20 °C jusqu'à ce qu'elles deviennent confluentes (~3 jours). Récolter les nématodes à l'aide du tampon M9 (1 M KH_2PO_4 , 1 M Na_2HPO_4 , 1 M NaCl et 1 M MgSO_4) dans des tubes Falcon de 15 mL. Effectuer une centrifugation à 4000 rpm pendant 4 minutes à température pièce. Enlever le surnageant pour ne laisser que 7 mL de tampon dans les tubes. Ajouter 1 mL de 1M NaOH et 2 mL d'eau de Javel. Vortexer pendant 5 minutes. Effectuer une centrifugation à 4000 rpm pendant 4 minutes à température pièce. Enlever le maximum de surnageant. Ajouter du tampon M9 jusqu'à obtenir un volume total de 10 mL. Vortexer pour dissoudre le culot. Effectuer une centrifugation à 4000 rpm pendant 4 minutes à température pièce. Répéter le lavage deux autres fois. Après le dernier lavage, enlever le maximum de surnageant. Dissoudre le culot dans 1-2 mL de tampon M9 et distribuer le contenu sur 8-10 boîtes de Pétri sans OP50 *E. coli*. Laisser évaporer le tampon M9 avant d'entreposer les boîtes de Petri à 20 °C. Après 48h, transférer les larves à l'aide de 1-2 mL de tampon M9 sur des boîtes de Petri avec OP50 *E. coli*. Laisser évaporer le tampon M9 avant d'entreposer les boîtes de Petri à 20 °C. Après ~48h, les nématodes seront au stade de jour 1 adulte.

2.5 Analyse de l'expression quantitative

Pré-extraction :

Une synchronisation par blanchissement est effectuée afin d'obtenir une population de nématodes à jour 1 adulte. Récolter les nématodes à l'aide du tampon M9 (1 M KH_2PO_4 , 1 M Na_2HPO_4 , 1 M NaCl et 1 M MgSO_4) dans des tubes Falcon de 15 mL. Effectuer une centrifugation à 4000 rpm pendant 4 minutes à température pièce. Enlever le maximum de surnageant et ensuite ajouter du tampon M9 jusqu'à obtenir un volume total de 10 mL. Vortexer pour dissoudre le culot. Effectuer une centrifugation à 4000 rpm pendant 4 minutes à température pièce. Répéter le lavage deux autres fois. Après le dernier lavage, enlever le surnageant pour ne laisser que 1-2 mL. Transférer le contenu restant dans des Eppendorf de 2 mL. Effectuer une centrifugation à 4000 rpm pendant quelques minutes à température pièce. Enlever le maximum de surnageant. Ajouter 500 μL de phénol (Trizol) et entreposer les échantillons à -80°C .

Extraction de l'ARN :

Les échantillons sont homogénéisés par trituration à l'aide de seringues. L'extraction a été effectuée en suivant le protocole de l'ensemble RNeasy® Lipid Tissue Mini kit par Qiagen® (Cat. No :74804). L'ARN extrait a ensuite été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop.

Transcription inverse (RT) :

L'ARN extrait est ensuite converti en ADNc par transcription inverse. L'ensemble Invitrogen™ SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Lot : 1756090) a été utilisé. Chaque puits contient 4 μL de 5X VILO Reaction Mix, 2 μL de 10X SuperScript III Enzyme Blend, un volume prédéterminé correspondant à 663ng d'ARN et de l'eau sans ARNase pour compléter jusqu'à 20 μL . Le cycle a été déterminé selon la température optimale proposée par l'ensemble utilisé (42°C).

qPCR :

Les niveaux d'expression d'ARNm des gènes d'intérêts ont été mesurés par qPCR à l'aide du Taqman Universal Master Mix II® par ThermoFisher® (Lot : 00764872). Chaque puits contient 0,5 μL de la sonde du gène d'intérêt, 5 μL du Master Mix, 3,5 μL d' H_2O et 1 μL d'ADNc pour un total de 10 μL . Les amorces utilisées provenant de Applied Biosystems® par Thermo Fisher Scientific®

sont spécifiques pour les gènes cibles *TARDBP* (No. Hs00606522_m1) et *tdp-1* (No. Ce02436691_g1), et pour les gènes constitutifs (« housekeeping genes ») *ama-1* (No. Ce02462726_m1) et *unc-47* (No. Ce02451914_g1). L'appareil utilisé est le QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Cat. No. 4485701). Toutes ces expériences ont été répliquées en triplicata.

2.6 Essai de durée de vie

Les nématodes des différentes souches ont été évalués tous les deux jours, du jour 1 d'âge adulte jusqu'à leur mort. Pour chaque souche, entre 30 et 40 nématodes jour 1 adulte (obtenus par synchronisation) ont été transférés sur chacune des 3 boîtes de Petri NGM avec de l'OP50 *E. coli*. Les nématodes ont été transférés sur de nouvelles boîtes de Petri avec OP50 *E. coli* tous les deux jours jusqu'à l'arrêt de la production de progéniture. Les nématodes étaient considérés comme morts s'ils ne répondaient pas à un stimulus tactile et ne montraient aucun mouvement ou réponse spontanée. Les nématodes morts ayant des œufs éclos à l'intérieur d'eux, les gonades extrudées ou les vers ayant rampé hors de la boîte de Petri ont été exclus de l'expérience. Toutes les expériences ont été effectuées à 20 °C et répétées en triplicata.

2.7 WormLab® : Vitesse de reptation sur milieu solide

Pour chaque souche, entre 30 et 40 nématodes jour 1 adulte (obtenus par synchronisation) ont été transférés sur chacune des 3 boîtes de Petri NGM sans OP50 *E. coli*. Une vidéo de 30 secondes a été prise pour chaque boîte de Petri en utilisant une caméra CMOS fixée sur un microscope à dissection Stéréomicroscope Leica S9i. Les nématodes ont ensuite été transférés sur des boîtes de Petri NGM avec OP50 *E. coli* et l'expérience a été répétée à jour 5 et 9 d'âge adulte. Les vidéos ont été analysées à l'aide du logiciel WormLab® et la vitesse de reptation a été déterminée pour chaque nématode détecté par le logiciel. Les vidéos ont été prises sur des boîtes de Petri NGM sans OP50 *E. coli* pour favoriser la locomotion (les nématodes sont alors à la recherche active de nourriture) et pour une meilleure détection des nématodes par le logiciel. Toutes les expériences ont été effectuées à 20 °C et répétées en triplicata.

2.8 WormLab® : Vitesse de nage, activité et taux de départs en milieu liquide

Pour les paramètres de nage, il s'agit du même protocole que la section 2.7, excepté que 100 µL de tampon M9 (1 M KH₂PO₄, 1 M Na₂HPO₄, 1 M NaCl et 1 M MgSO₄) ont été ajoutés aux boîtes de Petri NGM sans OP50 pour immerger les nématodes. Une vidéo de 30 secondes a ensuite été prise utilisant la même caméra et le même microscope. L'analyse des vidéos a été effectuée avec le logiciel WormLab® pour les paramètres de nage suivants : la vitesse de nage, l'activité et le taux de départs. Toutes les expériences ont été effectuées à 20 °C et répétées en triplicata.

2.9 Essai de paralysie sur milieu solide

Les nématodes des différentes souches ont été évalués tous les jours, du jour 1 jusqu'au jour 12 d'âge adulte. Pour chaque souche, entre 30 et 40 nématodes jour 1 adulte (obtenus par synchronisation) ont été transférés sur chacune des 3 boîtes de Petri NGM avec de l'OP50 *E. coli*. Les nématodes ont été comptés comme paralysés s'ils ne se déplaçaient pas à la suite d'un stimulus tactile sans être morts. Les nématodes morts ayant des œufs éclos à l'intérieur d'eux, les gonades extrudées ou les vers ayant rampé hors de la boîte de Petri ont été exclus de l'expérience. Les nématodes ont été transférés sur de nouvelles boîtes de Petri avec OP50 *E. coli* tous les deux jours jusqu'à l'arrêt de la production de progéniture. Toutes les expériences ont été effectuées à 20 °C et répétées en triplicata.

2.10 Essai d'aldicarbe

Pour évaluer la transmission synaptique, les nématodes synchronisés des différentes souches ont grandi sur des boîtes de Petri NGM avec de l'OP50 *E. coli* jusqu'au jour 1 d'âge adulte. Ensuite, pour chaque souche, entre 30 et 40 nématodes ont été transférés sur chacune des 3 boîtes de Petri NGM + 1 mM d'aldicarbe avec de l'OP50 *E. coli*. Les nématodes étaient considérés comme

paralysés s'ils ne se déplaçaient pas à la suite d'un stimulus tactile. Toutes les expériences ont été effectuées à 20 °C et répétées en triplicata.

2.11 Microscopie à fluorescence neuronale

Pour l'évaluation *in vivo* des ruptures dans les projections axonales des neurones moteurs GABAergiques (neurodégénérescence), les différentes souches ont été croisées avec un marqueur fluorescent (GFP ou mCherry) des neurones moteurs GABAergiques (promoteur *unc-47*). Les nématodes synchronisés sur des boîtes de Petri NGM avec de l'OP50 *E. coli* ont été collectés aux jours 1, 5 et 9 d'âge adulte, placés sur des lames de microscopie munies de coussins (« pads ») d'agarose 2% et immobilisés à l'aide du lévamisole 5mM dilué dans du tampon M9. Les marqueurs fluorescents mCherry et GFP ont été visualisés à 590 nm et 470 nm respectivement en utilisant le microscope Zeiss Axio Imager M2. Le logiciel AxioVision 4.8.2.0 a été utilisé. La neurodégénérescence est caractérisée par des ruptures de fluorescence sur les projections axonales des neurones moteurs GABAergiques. Un nématode est compté comme ayant de la neurodégénérescence lorsque minimum une rupture de fluorescence est observée, peu importe la longueur de celle-ci. Environ 25 nématodes ont été visualisés par souche et par n, et l'expérience a été répétée 4 fois. Chaque n correspond au ratio (en %) du nombre de nématodes possédant de la neurodégénérescence sur le nombre total de nématodes. Le test t de Student non-apparié a été appliqué pour les ensembles de deux jeux de données et le test de Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni pour les ensembles de plus de deux jeux de données.

2.12 Essai de composés sur milieu solide

Les composés Riluzole hydrochloride (Cat. No. 0768, TOCRIS®) et Edaravone (MCI-186, Cat. No. 13320, Cayman Chemical Company) ont été dilués dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) pour obtenir une concentration stock de 10mM. Ces échantillons stock sont entreposés à -20 °C. La concentration finale dans les boîtes de Petri NGM avec de l'OP50 *E. coli* est de 20 µM pour les

deux composés. Chaque composé possède son contrôle négatif avec la même concentration de DMSO dans les boîtes de Petri NGM avec de l'OP50 *E. coli*. Les essais de paralysie ont été effectués comme décrit à la section 2.9.

2.13 Tests statistiques

Les courbes des essais de durée de vie et de paralysie ont été comparées en utilisant le test statistique de log-rank (Mantel-Cox). Pour l'analyse statistique des figures obtenues avec le logiciel WormLab®, le test de Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni a été utilisé. Pour la neurodégénérescence (microscopie à fluorescence) ainsi que pour l'analyse de l'expression quantitative (qPCR), le test t de Student non-apparié a été appliqué pour les ensembles de deux jeux de données et le test de Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni pour les ensembles de plus de deux jeux de données. Toutes les expériences ont été répétées au moins 3 fois. Le logiciel GraphPad Prism version 9.0.0 (86) a été utilisé pour toutes les analyses statistiques.

Chapitre 3 – Résultats

3.1 Génération des souches TDP-43 et TDP-1

Pour être en mesure de répondre au but du projet de recherche qui est de caractériser le modèle transgénique TDP-43 et endogène TDP-1 de *C. elegans* pour déterminer s'ils peuvent récapituler certains aspects phénotypiques clés de la maladie SLA, les modèles en question ont dû être générés.

Le laboratoire a précédemment développé deux modèles transgéniques de *C. elegans* surexprimant la protéine humaine TDP-43 de type sauvage (WT) et mutante (Q331K) sous le promoteur spécifique des neurones moteurs GABAergiques, *unc-47* (Figure 6AB). La mutation humaine Q331K est située dans le domaine riche en glycine, domaine où l'on retrouve la majorité des mutations chez les patients atteints de la SLA (Figure 1). Le laboratoire a également obtenu par mutagenèse un modèle physiologiquement représentatif du nématode basé sur une mutation endogène (R393C) dans *tdp-1*, l'orthologue de TARDBP (Figure 6D) (75). La mutation R393C se situe dans le domaine équivalent chez le *C. elegans*, soit le domaine C-terminal. Le résidu spécifique Q331K de la protéine humaine TDP-43 n'étant pas conservé dans la protéine TDP-1 du *C. elegans*, la mutation R393C à proximité de cette dernière a été choisie parmi une sélection de mutations endogènes dans *tdp-1* fournie par « The million mutation project » (75). Étant donné qu'il s'agit d'une mutation dans un gène endogène, la protéine mutante est exprimée de façon ubiquitaire. La protéine TDP-1 de type sauvage (WT) de *C. elegans* est représentée par la Figure 6C. Un modèle endogène agissant comme contrôle positif a également été obtenu par CRISPR-Cas9 (par SunyBiotech) (Tableau 1). Ce contrôle permet de s'assurer de l'absence de mutations indésirables en arrière-plan par rapport au modèle endogène obtenu par mutagenèse pour ne conserver que la mutation d'intérêt (R393C).

Ainsi, l'élaboration de ces différents modèles transgéniques et endogènes permettra d'effectuer leur caractérisation pour voir s'ils possèdent des traits phénotypiques de la SLA. Ceci permettra ensuite d'affirmer ou d'infirmer l'hypothèse de recherche qui est que le modèle TDP-1 pourra refléter plus précisément l'expression physiologique du gène dans la maladie humaine grâce à la

mutation dans un gène endogène, l'absence de surexpression et l'expression ubiquitaire de la protéine TDP-1.

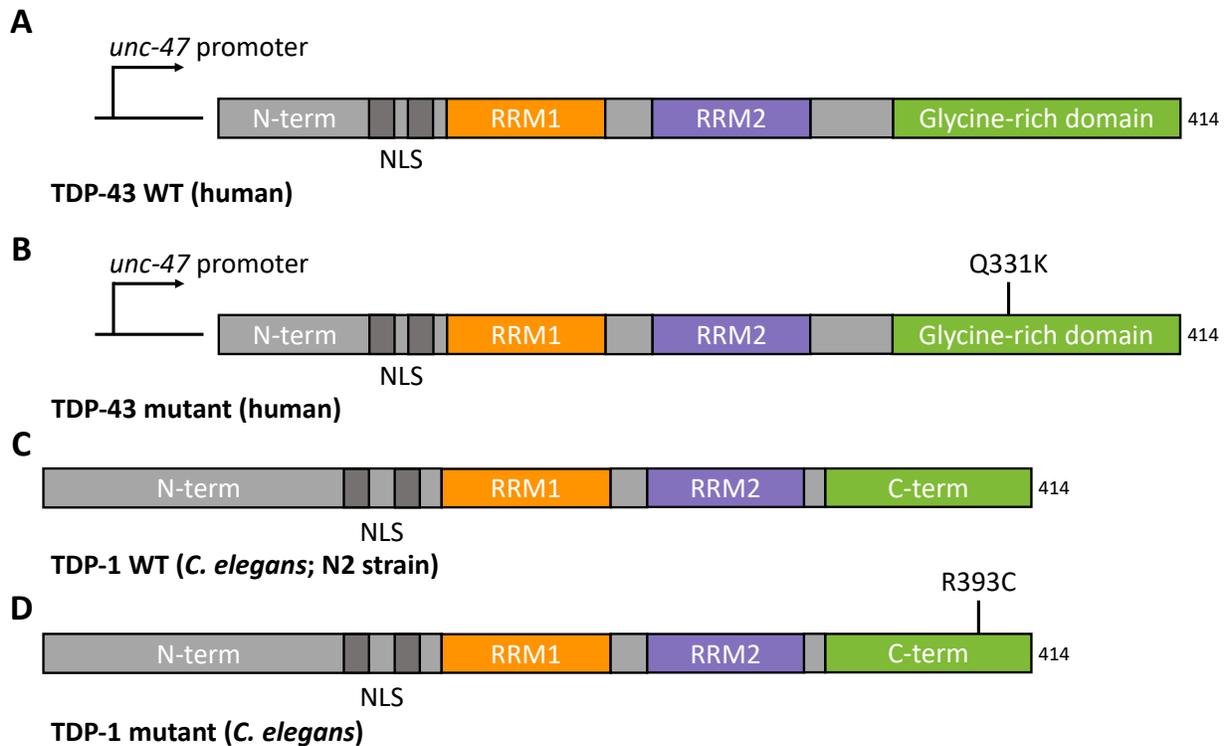


Figure 6. – Schématisation des modèles transgéniques TDP-43 (de type sauvage et mutant) et du modèle endogène TDP-1 de *Caenorhabditis elegans*. Les modèles ayant (A) la protéine humaine complète TDP-43 (isoforme 1) de type sauvage (WT) ou (B) la protéine humaine complète TDP-43 ayant la mutation Q331K ont été obtenus par transgénèse et les protéines ont été exprimées sous le promoteur *unc-47*. N-term, région N-terminale; NLS, signal de localisation nucléaire; RRM1, motif de reconnaissance de l'ARN 1; RRM2, motif de reconnaissance de l'ARN 2; Glycine-rich domain, région C-terminale contenant un domaine riche en glycine. (C) Protéine complète TDP-1 de *C. elegans* retrouvée dans la souche de type sauvage N2 (isoforme c). (D) Modèle possédant la protéine complète TDP-1 de *C. elegans* (isoforme c) avec la mutation R393C a été obtenue par mutagenèse ou CRISPR-Cas9. N-term, région N-terminale; NLS, signal de localisation nucléaire; RRM1, motif de reconnaissance de l'ARN 1; RRM2, motif de reconnaissance de l'ARN 2; C-term, région C-terminale n'ayant pas de domaine riche en glycine.

Le tableau 1 résume les caractéristiques des différents modèles obtenus pour le projet incluant le promoteur sous lequel la mutation est induite, la localisation de l'expression de la protéine ainsi que la méthode utilisée.

Tableau 1. – Caractéristiques des différents modèles TDP-43 et TDP-1 générés.

Souche	Promoteur	Expression	Méthode
TDP-43(WT)	<i>unc-47</i>	Motoneurones GABAergiques	Transgénèse
TDP-43(Q331K)	<i>unc-47</i>	Motoneurones GABAergiques	Transgénèse
TDP-1(R393C)	<i>tdp-1</i>	Ubiquitaire	Mutagénèse
crTDP-1(R393C)	<i>tdp-1</i>	Ubiquitaire	CRISPR-Cas9

3.1.1 Niveaux d'expression quantitative d'ARNm

Une fois les modèles transgéniques TDP-43(WT) et TDP-43(Q331K) générés (voir section 2.2), il est important de confirmer que le transgène est bel et bien exprimé dans le *C. elegans*. En effet, suite à l'intégration des plasmides dans le génome, il faut s'assurer que le transgène est transcrit et que la protéine d'intérêt est exprimée. Pour ce faire, les niveaux d'expression relative de l'ARNm *TARDBP* sont mesurés dans les modèles transgéniques TDP-43(WT) et TDP-43(Q331K) par RT-qPCR (voir section 2.5) (Figure 7A). Le gène endogène *unc-47* a été utilisé pour la normalisation puisque le transgène a été exprimé uniquement dans les neurones moteurs GABAergiques. Le gène *unc-47* code pour un transporteur transmembranaire de GABA dans les neurones moteurs GABAergiques chez le *C. elegans* (76). Selon la Figure 7A, le niveau d'expression de *TARDBP* normalisé par *unc-47* du modèle TDP-43(WT) est environ 24,8 fois plus élevé comparativement au contrôle négatif de type sauvage (WT). Pour ce qui est du mutant TDP-43(Q331K), le niveau d'expression de *TARDBP* normalisé par *unc-47* est environ 88 fois plus élevé que celui du contrôle WT et environ 3,5 fois plus élevé que TDP-43(WT). Ainsi, il est possible de conclure que le transgène est exprimé dans les modèles puisque les niveaux d'ARNm de *TARDBP* sont plus élevés que la souche de type sauvage WT qui n'exprime aucun transgène. Bien que le modèle TDP-1(R393C) ne soit pas transgénique et comporte une mutation dans un gène endogène, il est également important de vérifier que la mutation présente n'impact pas le niveau d'expression du

transcrit *tdp-1*. Ainsi, les niveaux d'expression de l'ARNm *tdp-1* normalisés par ceux du gène endogène *ama-1* ont été mesurés dans ce modèle par RT-qPCR (Figure 7B). Le gène *ama-1* code pour une sous-unité de l'ARN polymérase II chez le *C. elegans* (77). Selon la Figure 7B, le niveau d'expression de *tdp-1* normalisé par *ama-1* du mutant TDP-1(R393C) est environ 1,2 fois plus élevé comparativement au contrôle négatif de type sauvage (WT). Ainsi, le niveau d'expression de l'ARNm *tdp-1* dans ce mutant est sensiblement au même niveau endogène que le contrôle WT.

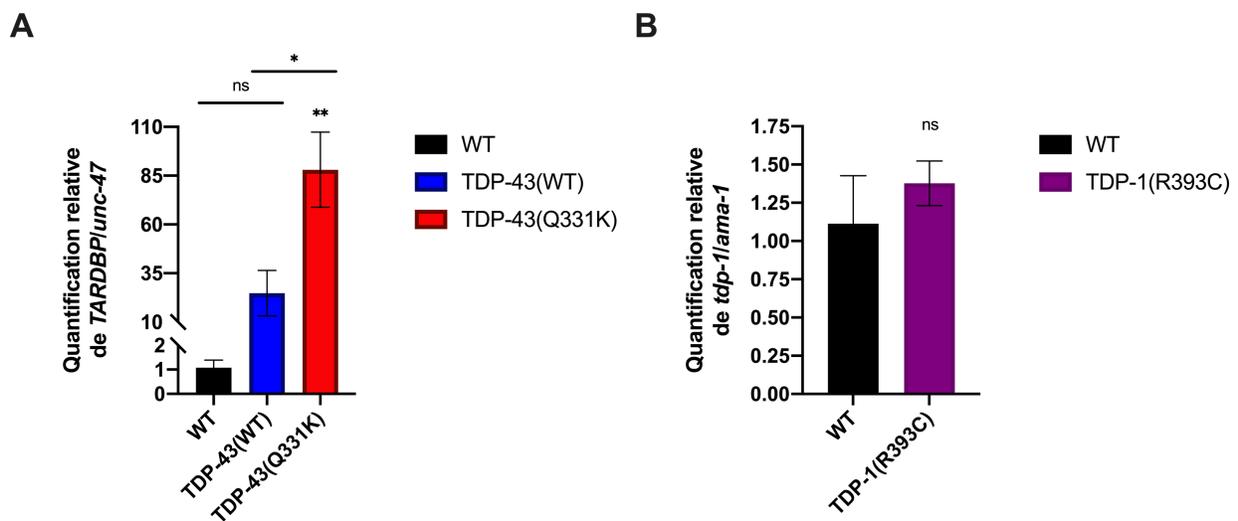


Figure 7. – Niveaux d'expression quantitative d'ARNm de *TARDBP* pour les modèles transgéniques et de *tdp-1* pour le modèle endogène.

(A) Quantification relative par RT-qPCR du niveau d'expression d'ARNm de *TARDBP* normalisé par le gène endogène *unc-47* (code pour un transporteur vésiculaire transmembranaire de GABA dans les neurones GABAergiques chez le *C. elegans*) (76) pour les modèles transgéniques TDP-43 [$*P < 0.05$, $**P < 0,01$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni]. (B) Quantification relative par RT-qPCR du niveau d'expression d'ARNm de *tdp-1* normalisé par le gène endogène *ama-1* (une sous-unité de l'ARN polymérase II chez le *C. elegans*) (77) pour le modèle endogène TDP-1 [ns : non significatif, par le test t de Student non-apparié]. L'expérience a été répétée en triplicata.

3.2 Caractérisation des modèles mutants TDP-43 et TDP-1

Pour être en mesure de répondre à l'hypothèse, le but du projet est de caractériser les modèles transgéniques TDP-43 et endogènes TDP-1 de *C. elegans* pour déterminer si ceux-ci peuvent récapituler certains aspects phénotypiques clés de la maladie SLA tels que des déficits moteurs et une neurodégénérescence liés à l'âge générant une paralysie. Pour ce faire, les approches expérimentales ont été classées en deux objectifs.

3.2.1 L'aspect physiologique des modèles

Le premier objectif est d'explorer l'impact des mutations TDP-43/TDP-1 sur l'aspect physiologique des modèles.

3.2.1.1 Essai de durée de vie

Comme mentionné précédemment, la SLA étant une maladie neurodégénérative liée à l'âge, l'espérance de vie des patients atteints se voit diminuée. L'âge moyen de l'apparition de cette maladie est de 55 ans et les patients décèdent généralement 2 à 5 ans suite à la manifestation des premiers symptômes (5-8). Le but de cette expérience est d'observer si les mutations dans TDP-43 et TDP-1 engendrent une diminution de la durée de vie des *C. elegans* (voir section 2.6). La Figure 8, illustre le pourcentage de survie (%) des nématodes en fonction du nombre de jours de vie adulte. Selon la Figure 8A, le mutant transgénique TDP-43(Q331K) possède une espérance de vie significativement diminuée comparativement au contrôle WT, mais pas avec TDP-43(WT). Les contrôles WT et TDP-43(WT) possèdent un pourcentage de survie non significativement différent. Selon la Figure 8B, la durée de vie du mutant endogène TDP-1(R393C) ne semble pas diminuée comparativement au contrôle WT. Ainsi, seule la mutation dans TDP-43 a un effet significatif sur la durée de vie des nématodes, et ce, majoritairement au début de leur vie adulte.

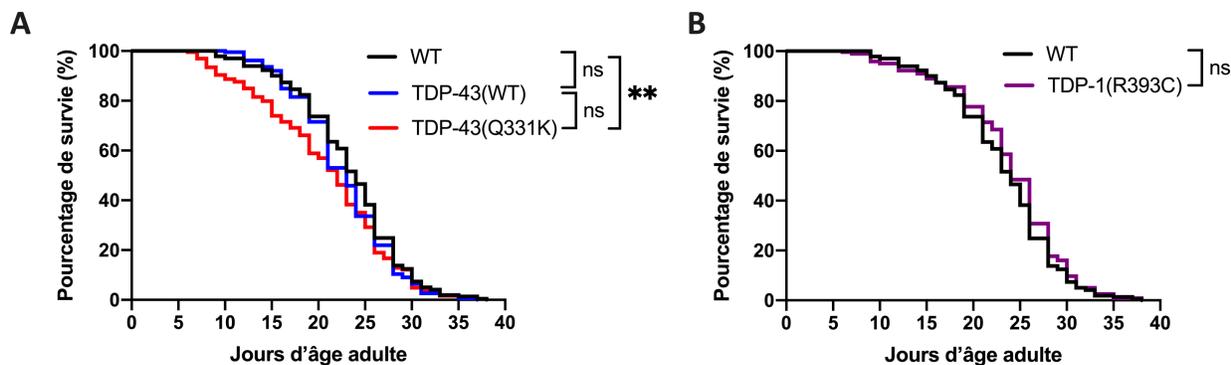


Figure 8. – Les mutations dans TDP-43 et TDP-1 n’ont pas ou peu d’effet sur la durée de vie des nématodes.

Pourcentage de survie (%) des nématodes en fonction du nombre de jours d’âge adulte. (A) La souche mutante TDP-43(Q331K) possède une durée de vie réduite comparativement à la souche de type sauvage N2 (WT), mais pas avec TDP-43(WT) [$**P < 0.01$, par le test de log-rank (Mantel-Cox); $n = 240-280$]. (B) La mutation dans TDP-1 n’a pas d’effet sur la durée de vie des nématodes [ns: non significatif, par le test de log-rank (Mantel-Cox); $n = 280-315$]. L’expérience a été répétée en triplicata.

3.2.1.2 WormLab®

Le logiciel WormLab est un outil récent qui permet d’étudier de nombreux paramètres sur le *C. elegans*, entre autres. Ainsi, ce logiciel a été utilisé pour vérifier si les mutations dans TDP-43 et TDP-1 ont des répercussions sur certains aspects physiologiques des modèles transgéniques et endogènes (voir section 2.7 et 2.8). Brièvement, l’expérience consiste à prendre une vidéo de 30 secondes d’environ 30 nématodes en reptation ou à la nage sur des boîtes de Petri NGM sans OP50 *E. coli* à jour 1, 5 et 9 de vie adulte. Ces jours de vie adulte ont été sélectionnés pour visualiser l’effet des mutations sur un large spectre de la durée de vie des nématodes. Le logiciel WormLab détecte ensuite les nématodes et plusieurs paramètres peuvent être analysés. Des paramètres de locomotions ont été priorisés pour déterminer si les mutants transgéniques et endogènes possèdent un phénotype moteur. Ainsi, la vitesse de reptation, la vitesse de nage, l’activité et le taux de départ ont été analysés. Le premier paramètre est en milieu solide et les trois derniers sont en milieu liquide.

Selon la Figure 9A, la vitesse de reptation ($\mu\text{m/s}$) du mutant TDP-43(Q331K) est significativement réduite à jour 1 de vie adulte comparativement aux contrôles TDP-43(WT) et WT et cette vitesse

tend à rester la même à jour 5 et 9. La Figure 9B présente la vitesse de nage ($\mu\text{m/s}$) des modèles transgéniques. La vitesse de nage du mutant TDP-43(Q331K) est significativement plus basse à jour 1,5 et 9 de vie adulte comparée aux contrôles TDP-43(WT) et WT. La vitesse de nage du mutant transgénique tend également à rester la même à travers les jours. La Figure 9C décrit l'activité ($\mu\text{m}^2/\text{min}$) des nématodes qui correspond à la surface (μm^2) couverte par ceux-ci durant une minute de nage. L'activité du mutant TDP-43(Q331K) est significativement plus faible que celle des contrôles TDP-43(WT) et WT à jour 1, 5 et 9 de vie adulte. Les niveaux d'activité du mutant transgénique semblent constants à travers les jours. Finalement, la Figure 9D montre le taux de départs (min^{-1}) des nématodes qui correspond au nombre d'ondes corporelles initiées par la tête ou la queue par minute de nage. Le taux de départs du mutant TDP-43(Q331K) est significativement plus bas à jour 1, 5 et 9 de vie adulte comparativement aux contrôles TDP-43(WT) et WT. Les taux de départs du mutant transgénique semblent également similaires à jour 1,5 et 9 de vie adulte. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que le mutant transgénique TDP-43(Q331K) possède un phénotype de motilité dès le jour 1 de vie adulte et que ces problèmes de locomotion persistent jusqu'à jour 9.

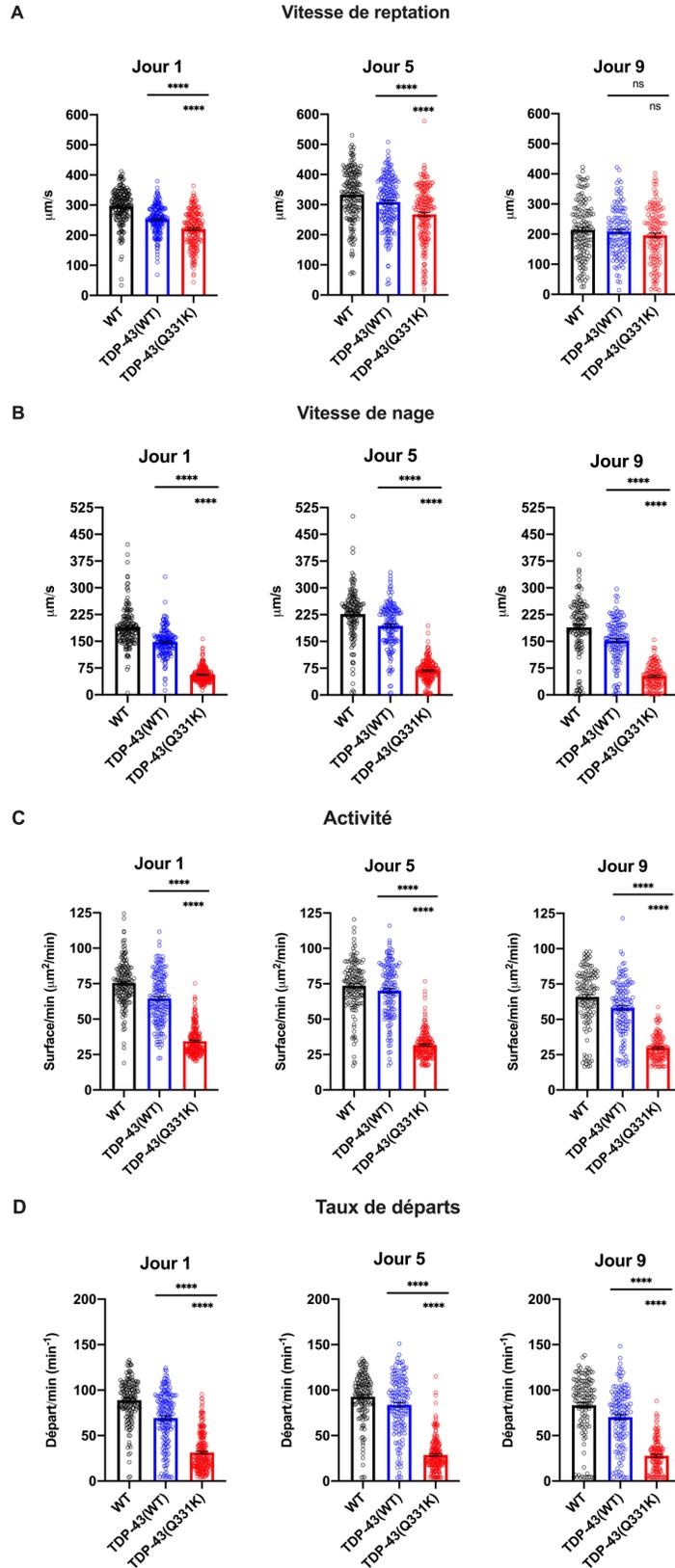


Figure 9. – Le mutant transgénique TDP-43 présente un phénotype de motilité selon plusieurs paramètres du logiciel Wormlab®.

(A) La vitesse de reptation ($\mu\text{m/s}$) des nématodes à jour 1,5 et 9 adulte. Le mutant TDP-43(Q331K) possède une vitesse de reptation significativement plus réduite comparativement aux contrôles TDP-43(WT) et WT à jour 1 et 5 adulte [**** $P < 0.0001$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni; $n=123-220$]. Toutes les vitesses de reptation semblent se stabiliser à jour 9 adulte. (B) La vitesse de nage ($\mu\text{m/s}$) des nématodes à jour 1,5 et 9 adulte. Le mutant TDP-43(Q331K) possède une vitesse de nage significativement inférieure aux contrôles WT et TDP-43(WT) à jour 1,5 et 9 adulte [**** $P < 0.0001$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni; $n=129-239$]. (C) L'activité ($\mu\text{m}^2/\text{min}$) des nématodes à jour 1,5 et 9 adulte. L'activité correspond à la surface (μm^2) couverte par les vers durant une minute de nage. L'activité du mutant TDP-43(Q331K) est significativement plus faible à jour 1, 5 et 9 comparativement aux contrôles WT et TDP-43(WT) [**** $P < 0.0001$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni; $n=129-239$]. (D) Le taux de départs (min^{-1}) des nématodes à jour 1,5 et 9 adulte. Le taux de départs correspond au nombre d'ondes corporelles initiées par la tête ou la queue par minute de nage. Le taux de départs du mutant TDP-43(Q331K) est significativement plus faible que celui des contrôles WT et TDP-43(WT) à jour 1, 5 et 9 [**** $P < 0.0001$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni; $n=129-239$]. Les expériences ont été répétées en triplicata.

La Figure 10 comporte les mêmes paramètres que la Figure 9, mais pour le mutant endogène TDP-1(R393C). Selon la Figure 10A, la vitesse de reptation ($\mu\text{m/s}$) du mutant TDP-1(R393C) est significativement différente du contrôle WT à jour 1 et 5 de vie adulte et cette diminution de vitesse semble progressive. À jour 9 de vie adulte, toutes les vitesses de reptation se stabilisent. Le mutant crTDP-1(R393C), obtenu par CRISPR-Cas9, constitue un contrôle positif pour s'assurer de l'absence de mutations indésirables en arrière-plan du mutant obtenu par mutagenèse pour ne conserver que la mutation d'intérêt. Dans la Figure 10A, la vitesse de reptation du contrôle positif crTDP-1(R393C) semble au même niveau que le mutant endogène à jour 5 et 9 de vie adulte. La vitesse de reptation de crTDP-1(R393C) est un peu plus basse à jour 1. Dans la Figure 10B, la vitesse de nage ($\mu\text{m/s}$) du mutant TDP-1(R393C) est significativement diminuée à jour 5 et 9 de vie adulte comparativement au contrôle WT, mais pas à jour 1. La vitesse de nage du contrôle crTDP-1(R393C) est significativement différente du mutant endogène à jour 1, légèrement différente à jour 5 et non différente à jour 9 de vie adulte. La Figure 10C décrit l'activité ($\mu\text{m}^2/\text{min}$) des nématodes ce qui correspond à la surface (μm^2) couverte par ceux-ci durant une minute de nage. L'activité du mutant TDP-1(R393C) est significativement plus faible que celle du contrôle WT à jour 5 et 9 de vie adulte. L'activité du contrôle positif crTDP-1(R393C) est significativement plus basse que le mutant endogène à jour 1, mais très similaire à jour 5 et 9 de vie adulte. Finalement, la Figure 10D montre le taux de départs (min^{-1}) des nématodes qui correspond au nombre d'ondes corporelles initiées par la tête ou la queue par minute de nage. Le taux de départs du mutant TDP-1(R393C) est légèrement plus bas à jour 5 comparativement au contrôle WT, mais pas à jour 1 et 9 de vie adulte. Le taux de départ du contrôle crTDP-1(R393C) est significativement différent du contrôle endogène à jour 1, 5 et 9 de vie adulte. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que le mutant endogène TDP-1(R393C) possède un phénotype de motilité selon plusieurs paramètres du logiciel WormLab et que celui-ci se développe progressivement avec l'âge des nématodes.

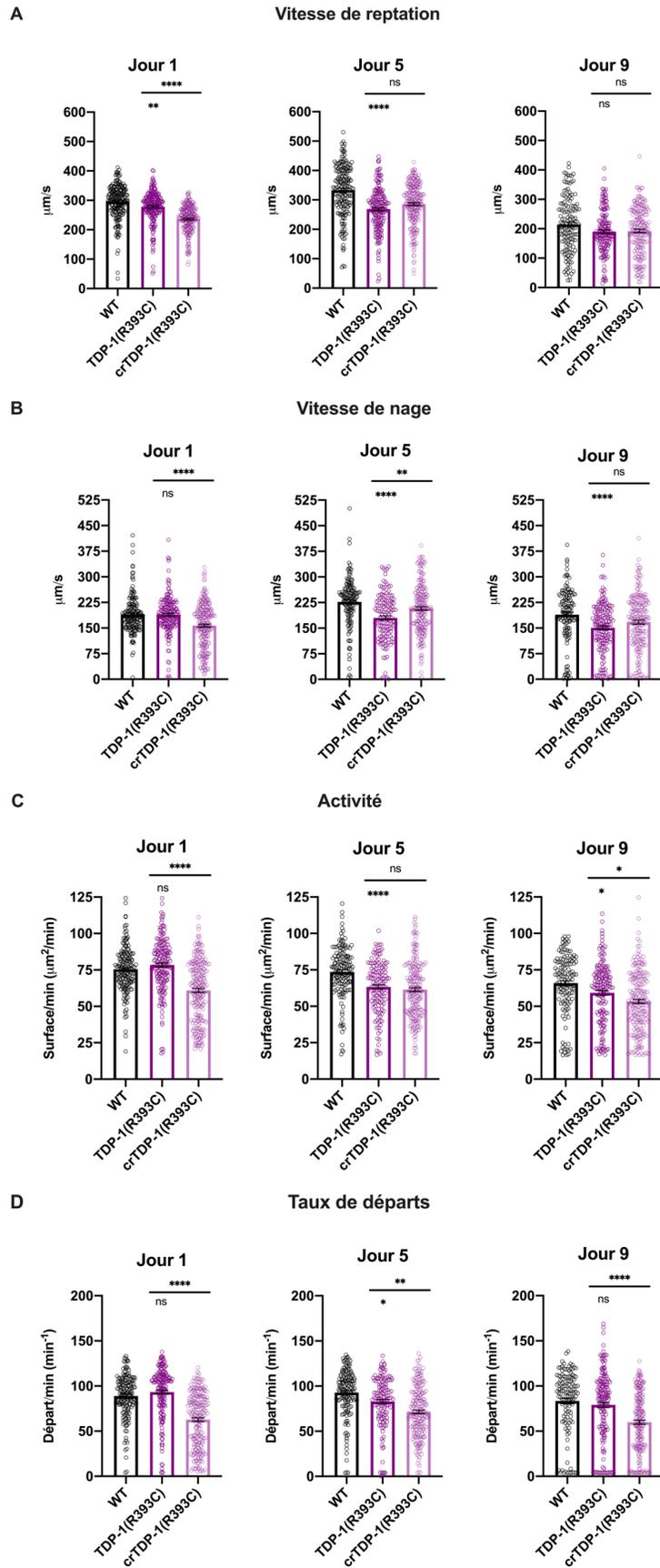


Figure 10. – Le mutant endogène TDP-1 présente un phénotype de motilité selon plusieurs paramètres du logiciel WormLab®.

(A) La vitesse de reptation ($\mu\text{m/s}$) des nématodes à jour 1,5 et 9 adulte. Le mutant TDP-1(R393C) possède une vitesse de reptation significativement inférieure au contrôle WT à jour 1 adulte. Cette vitesse de reptation de TDP-1(R393C) diminue davantage à jour 5 adulte comparativement au contrôle WT. Toutes les vitesses de reptation semblent se stabiliser à jour 9 adulte. La vitesse de reptation du contrôle positif crTDP-1(R393C) est similaire au mutant TDP-1(R393C) à jour 5 et 9 seulement [$**P<0.005$, $****P<0.0001$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni; $n=140-230$]. (B) La vitesse de nage ($\mu\text{m/s}$) des nématodes à jour 1,5 et 9 adulte. Le mutant TDP-1(R393C) n'a pas une vitesse de nage significativement différente du contrôle wild-type N2 à jour 1 adulte. Cette vitesse de nage diminue significativement à jour 5 et 9 adulte par rapport au contrôle WT. La vitesse de nage du contrôle positif crTDP-1(R393C) est similaire au mutant TDP-1(R393C) excepté à jour 1 [$**P<0.005$, $****P<0.0001$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni; $n=129-226$]. (C) L'activité ($\mu\text{m}^2/\text{min}$) des nématodes à jour 1,5 et 9 adulte. L'activité correspond à la surface (μm^2) couverte par les vers durant une minute de nage. L'activité du mutant TDP-1(R393C) n'est pas significativement différente que celle du contrôle WT à jour 1 adulte. L'activité de TDP-1(R393C) diminue significativement à jour 5 adulte comparativement au contrôle WT, mais augmente légèrement ensuite à jour 9 adulte. L'activité du contrôle positif crTDP-1(R393C) est similaire au mutant TDP-1(R393C) exceptée à jour 1 [$*P<0.05$, $****P<0.0001$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni; $n=129-226$]. (D) Le taux de départs (min^{-1}) des nématodes à jour 1,5 et 9 adulte. Le taux de départs correspond au nombre d'ondes corporelles initiées par la tête ou la queue par minute de nage. Le taux de départs du mutant TDP-1(R393C) n'est pas significativement différent comparativement à celui du contrôle WT à jour 1 adulte. Le taux de départs de TDP-1(R393C) diminue significativement à jour 5 adulte comparativement au contrôle WT, mais redevient non significatif à jour 9 adulte. Le taux de départ du contrôle positif crTDP-1(R393C) est significativement différent du mutant TDP-1(R393C) [$*P<0.05$, $**P<0.001$, $****P<0.0001$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni; $n=129-226$]. Les expériences ont été répétées en triplicata.

3.2.2 L'intégrité du système nerveux moteur

Le deuxième objectif pour être en mesure de répondre au but et ensuite, à l'hypothèse du projet est d'évaluer les répercussions des défauts génétiques sur l'intégrité du système nerveux moteur des modèles mutants TDP-43 et TDP-1.

3.2.2.1 Essai de paralysie

La SLA est une maladie neurodégénérative qui résulte en la perte progressive et sélective des neurones moteurs supérieurs et inférieurs chez l'humain. Ainsi, une étape de la caractérisation des modèles transgéniques et endogènes de *C. elegans* est d'évaluer si ces modèles arborent une neurodégénérescence prématurée qui entraînerait une paralysie. L'essai de paralysie consiste à évaluer la paralysie des nématodes chaque jour, du jour 1 de vie adulte au jour 12. Les nématodes sont considérés comme paralysés s'ils ne se déplacent pas à la suite d'un stimulus tactile sans être morts (voir section 2.9). La Figure 11 décrit le pourcentage de paralysie des nématodes (%) en fonction du nombre de jours de vie adulte. Selon la Figure 11A, le mutant transgénique TDP-43(Q331K) possède un taux de paralysie significativement plus élevé que les contrôles TDP-43(WT) et WT. La paralysie commence à se manifester chez le mutant transgénique vers le jour 5-6 de vie adulte comparativement aux contrôles. Au jour 12, environ 40% des nématodes TDP-43(Q331K) sont paralysés comparativement à 17% pour les contrôles TDP-43(WT) et WT. Ces derniers présentent d'ailleurs un taux de paralysie très similaire entre eux. Selon la Figure 11B, le mutant endogène TDP-1(R393C) possède un taux de paralysie significativement plus élevé que le contrôle WT. La paralysie commence à se manifester chez le mutant endogène vers le jour 6-7 de vie adulte comparativement au contrôle WT. Le contrôle positif crTDP-1(R393C) possède également un pourcentage de paralysie significativement différent du contrôle WT, mais non différent du mutant endogène TDP-1(R393C). Au jour 12, environ 35% des nématodes TDP-1(R393C) sont paralysés comparativement à 28% pour crTDP-1(R393C) et 17% pour WT. Ainsi, ces résultats suggèrent que le mutant transgénique TDP-43 et endogène TDP-1 présentent des déficits moteurs causant un phénotype de paralysie lié à l'âge.

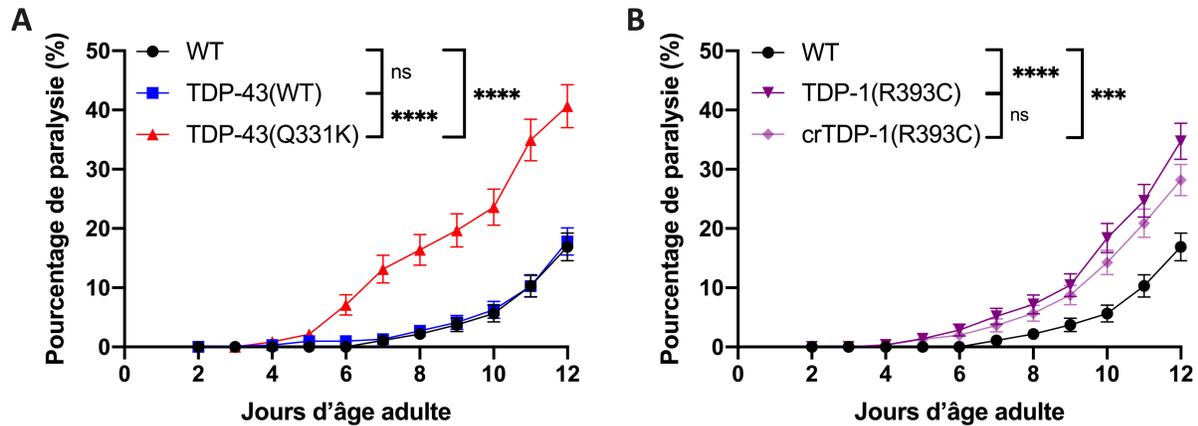


Figure 11. – Le mutant transgénique TDP-43 et le mutant endogène TDP-1 présentent un phénotype de déficit moteur.

Pourcentage de nématodes paralysés en fonction du nombre de jours d'âge adulte. (A) Le mutant TDP-43(Q331K) possède un phénotype de paralysie significativement plus élevé que les contrôles WT et TDP-43(WT) [**** $P < 0.0001$, par le test de log-rank (Mantel-Cox); $n = 248-315$]. (B) Le mutant TDP-1(R393C) possède un taux de paralysie moins élevé que le mutant transgénique, mais toujours significativement supérieur au contrôle WT. Le taux de paralysie du contrôle positif crTDP-1(R393C) est significativement différent du contrôle WT. Le contrôle positif possède un phénotype de paralysie similaire au mutant endogène TDP-1(R393C) [*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, par le test de log-rank (Mantel-Cox); $n = 248-314$]. L'expérience a été répétée en triplicata.

3.2.2.2 Essai d'aldicarbe

Une autre façon d'évaluer l'intégrité du système nerveux des modèles TDP-43/TDP-1 est d'estimer la sensibilité de la transmission synaptique au pesticide aldicarbe. Le mouvement des nématodes est contrôlé par les neurones moteurs excitateurs qui libèrent l'acétylcholine et les neurones moteurs inhibiteurs qui libèrent le GABA (acide γ -aminobutyrique). L'acétylcholine libérée dans la fente synaptique active les récepteurs correspondant au niveau post-synaptique sur la membrane musculaire, ce qui entraîne une excitation et une contraction musculaire. L'acétylcholinestérase dégrade l'acétylcholine dans la fente synaptique ce qui met fin à la neurotransmission. L'aldicarbe est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase. Ainsi, en présence de cet inhibiteur, le neurotransmetteur acétylcholine s'accumule dans la fente synaptique ce qui entraîne une hypercontraction musculaire constante et éventuellement, une paralysie (78). Les nématodes mutants peuvent soit exhiber une hypersensibilité à l'aldicarbe et paralyser plus rapidement que la souche de type sauvage ou montrer une résistance à l'aldicarbe en paralysant

plus lentement. L'essai d'aldicarbe consiste à évaluer la paralysie des modèles TDP-43/TDP-1 à jour 1 de vie adulte en présence de 1 mM d'aldicarbe toutes les 30 minutes pendant 2h (voir section 2.10). Selon la Figure 12A, les deux souches transgéniques TDP-43(WT) et TDP-43(Q331K) ont un taux de paralysie significativement supérieur au contrôle WT. Selon la Figure 12B, le mutant endogène TDP-1(R393C) présente également un pourcentage de paralysie qui est supérieur au contrôle WT. Ainsi, ces résultats suggèrent que les souches transgéniques TDP-43(WT) et TDP-43(Q331K), et endogènes TDP-1(R393C) arborent des défauts de transmission synaptique qui se traduisent par une hypersensibilité à l'inhibiteur de l'acétylcholinestérase aldicarbe.

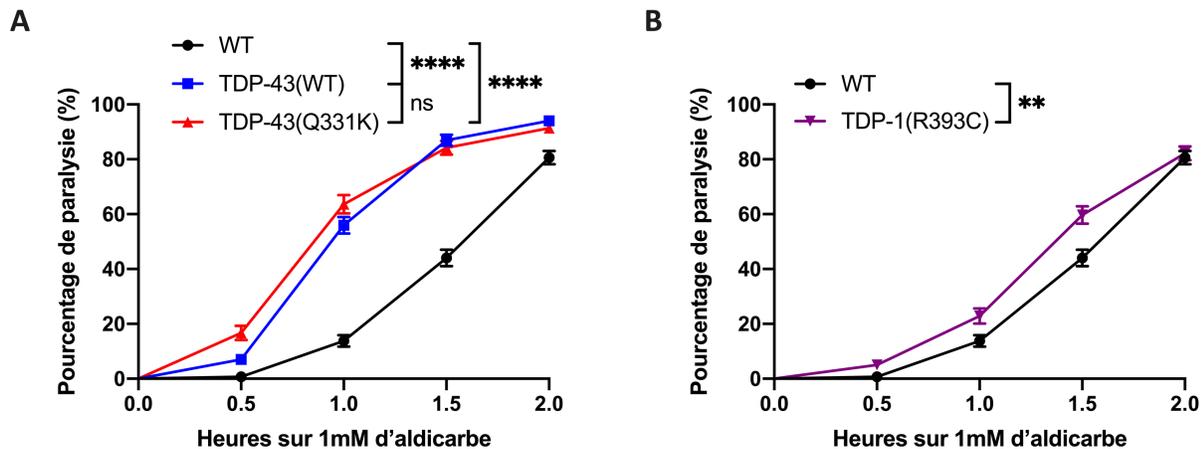


Figure 12. – Défauts de transmission synaptique chez le mutant transgénique TDP-43 et le mutant endogène TDP-1.

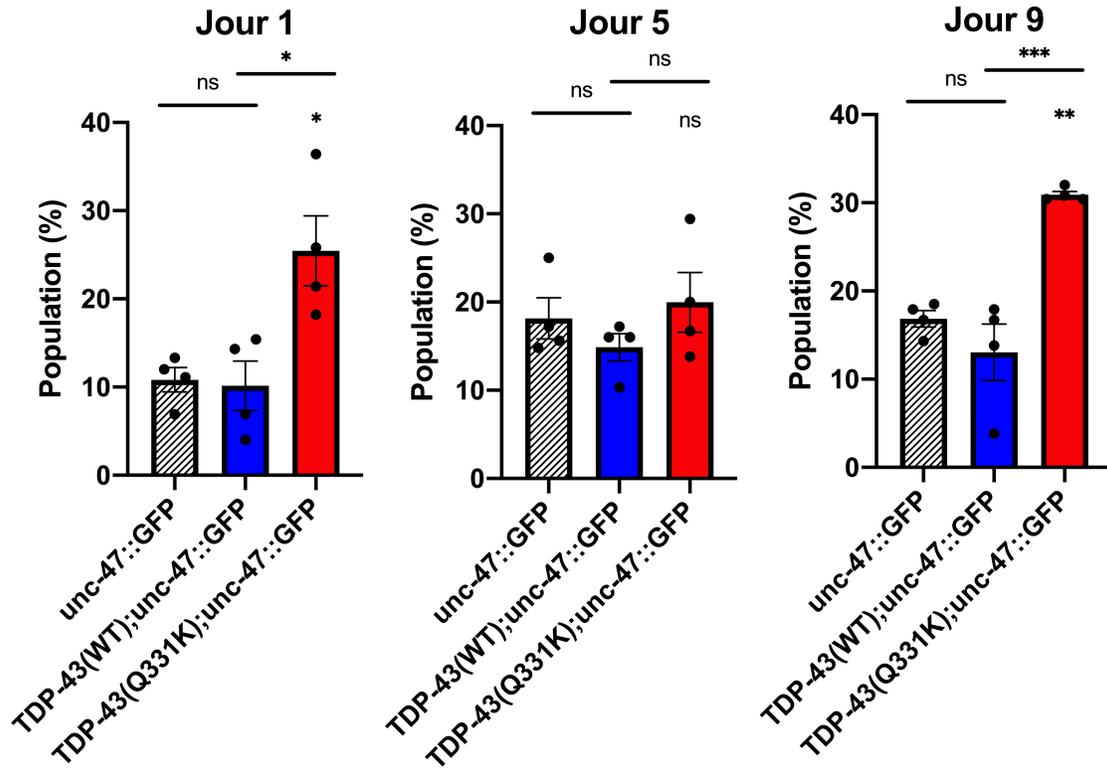
Pourcentage de nématodes paralysés en fonction du nombre d'heures passées en présence de 1mM d'aldicarbe. La transmission neuronale cholinergique a été mesurée en déterminant le début de la paralysie induite par l'inhibiteur de l'acétylcholinestérase, aldicarbe, à jour 1 d'âge adulte. (A) Les deux souches transgéniques TDP-43, wild-type et mutant, montrent un phénotype d'hypersensibilité à l'aldicarbe comparativement au contrôle WT [**** $P < 0.0001$, par le test de log-rank (Mantel-Cox); $n=209-270$]. (B) Le mutant TDP-1(R393C) présente une hypersensibilité plus accrue à l'aldicarbe que le contrôle WT [** $P < 0.01$, par le test de log-rank (Mantel-Cox); $n=237-268$]. L'expérience a été répétée en triplicata.

3.2.2.3 Essai de neurodégénérescence

Une méthode plus concrète afin d'évaluer l'intégrité du système nerveux moteur est d'observer s'il y a une neurodégénérescence liée à l'âge au niveau des neurones moteurs GABAergiques. Pour ce faire, les souches transgéniques et endogènes sont croisées avec une souche de *C. elegans* dans laquelle les neurones moteurs GABAergiques (*unc-47*) sont couplés à une protéine fluorescente GFP (verte) ou mCherry (rouge). Les nématodes sont immobilisés sur des lamelles de verre à l'aide du lévamisole qui est un antagoniste des neurones cholinergiques (79). Les neurones moteurs GABAergiques ont été observés à jour 1, 5 et 9 de vie adulte à l'aide de la microscopie à fluorescence (voir section 2.11). La neurodégénérescence est caractérisée par des ruptures de fluorescence sur les projections axonales des neurones moteurs GABAergiques.

Selon la Figure 13A, le mutant transgénique TDP-43(Q331K) possède un pourcentage de neurodégénérescence supérieur aux contrôles TDP-43(WT) et *unc-47::GFP* (WT) à jour 1 et 9 de vie adulte. La souche transgénique contrôle TDP-43(WT) a un pourcentage de neurodégénérescence non significativement différent du contrôle WT à jour 1, 5 et 9 de vie adulte. À jour 1, 25% des mutants TDP-43(Q331K) présentent une neurodégénérescence comparativement à 10% et 11% pour les contrôles TDP-43(WT) et WT respectivement. À jour 5 de vie adulte, les pourcentages de neurodégénérescence des trois souches semblent similaires. À jour 9, le pourcentage de la population de nématodes TDP-43(Q331K) ayant une neurodégénérescence est d'environ 31% comparativement à 13% et 17% pour TDP-43(WT) et WT respectivement. La Figure 13B montre des images de microscopie à fluorescence à jour 1 et 9 du mutant transgénique TDP-43(Q331K) ainsi que des deux contrôles TDP-43(WT) et *unc-47::GFP* (WT). Les flèches blanches indiquent les ruptures de fluorescence sur les projections axonales de la corde ventrale. Le mutant transgénique comporte davantage de ruptures de fluorescence à jour 1 et 9 de vie adulte que les deux autres souches contrôles. Ainsi, ces résultats suggèrent que le mutant TDP-43(Q331K) présente une neurodégénérescence liée à l'âge.

A



B

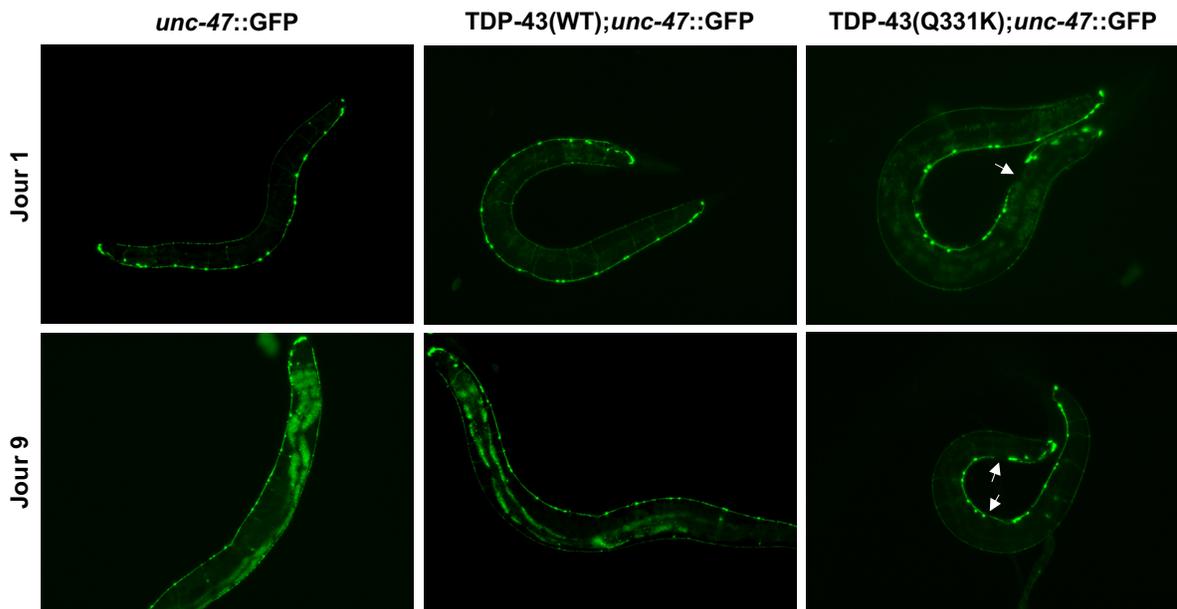


Figure 13. – Le mutant transgénique TDP-43 présente une neurodégénérescence dépendante de l'âge.

Les souches ont été croisées avec le marqueur fluorescent GFP dans les neurones moteurs GABAergiques. Un nématode possède de la neurodégénérescence lorsque minimum une rupture de fluorescence est observée dans les projections axonales peu importe la longueur de celle-ci. (A) Pourcentage de la population de nématodes présentant une neurodégénérescence à jour 1, 5 et 9 d'âge adulte. Chaque point (n) correspond au ratio (en %) du nombre de nématodes possédant de la neurodégénérescence sur le nombre total de nématodes évalués, par n. Le mutant TDP-43(Q331K) possède un pourcentage de neurodégénérescence significativement supérieur aux contrôles *unc-47::GFP* et TDP-43(WT) à jour 1 et 9 d'âge adulte [$*P<0.05$, $**P<0.005$, $***P<0.0005$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni; $n=97-116$]. (B) Mosaïque d'images de microscopie à fluorescence à jour 1 et 9 d'âge adulte selon le rapporteur *unc-47::GFP* dans les neurones moteurs GABAergiques le long de la corde ventrale et dorsale des nématodes. Les flèches blanches indiquent les ruptures de fluorescence sur les projections axonales de la corde ventrale. L'expérience a été répétée en quadruplicata.

Dans le but de caractériser davantage la neurodégénérescence du modèle transgénique TDP-43(Q331K), les ruptures de fluorescence dans les projections axonales ont été classées selon si elles se trouvaient sur la corde ventrale, dorsale ou les deux des neurones GABAergiques du nématode. Selon la Figure 14, la neurodégénérescence semble apparaître davantage sur la corde ventrale des nématodes du jour 1 à jour 9 de vie adulte, et ce, pour le mutant transgénique et les contrôles. Plus les jours avancent, plus la proportion des ruptures de fluorescence qui se retrouvent à la fois sur la corde ventrale et dorsale augmente. Ces résultats suggèrent que les modèles transgéniques ont une spécificité quant à la localisation de la neurodégénérescence sur les axones des neurones GABAergiques; elle est davantage ventrale.

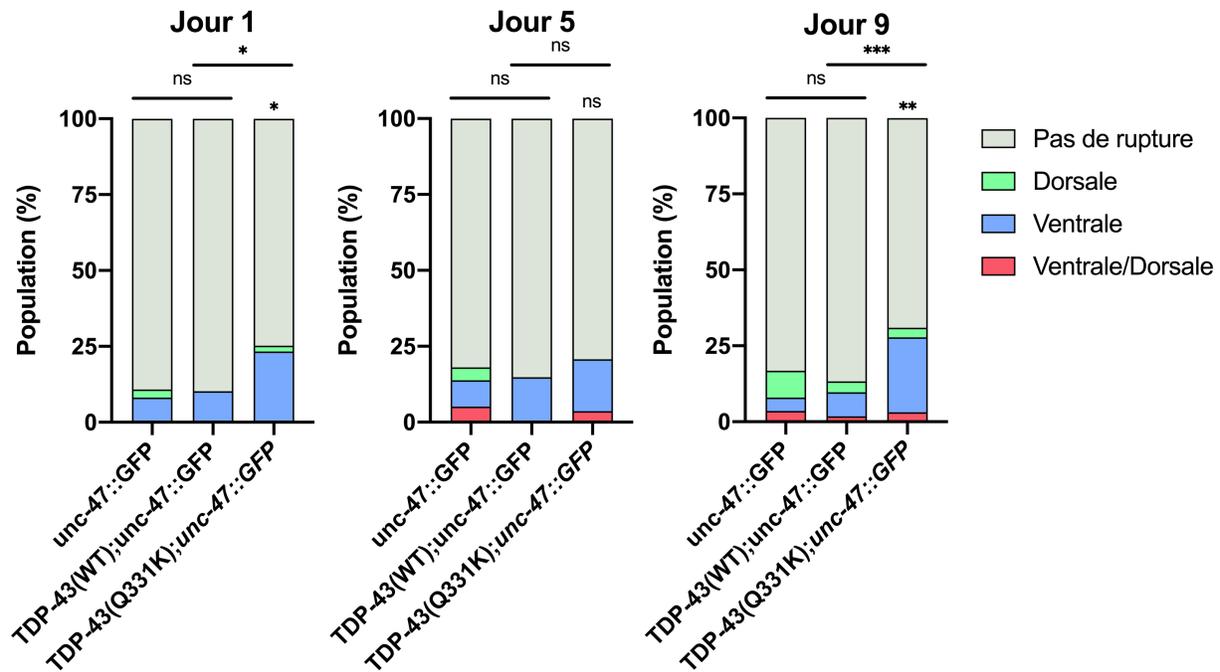


Figure 14. – Le mutant transgénique TDP-43 semble développer une neurodégénérescence davantage ventrale.

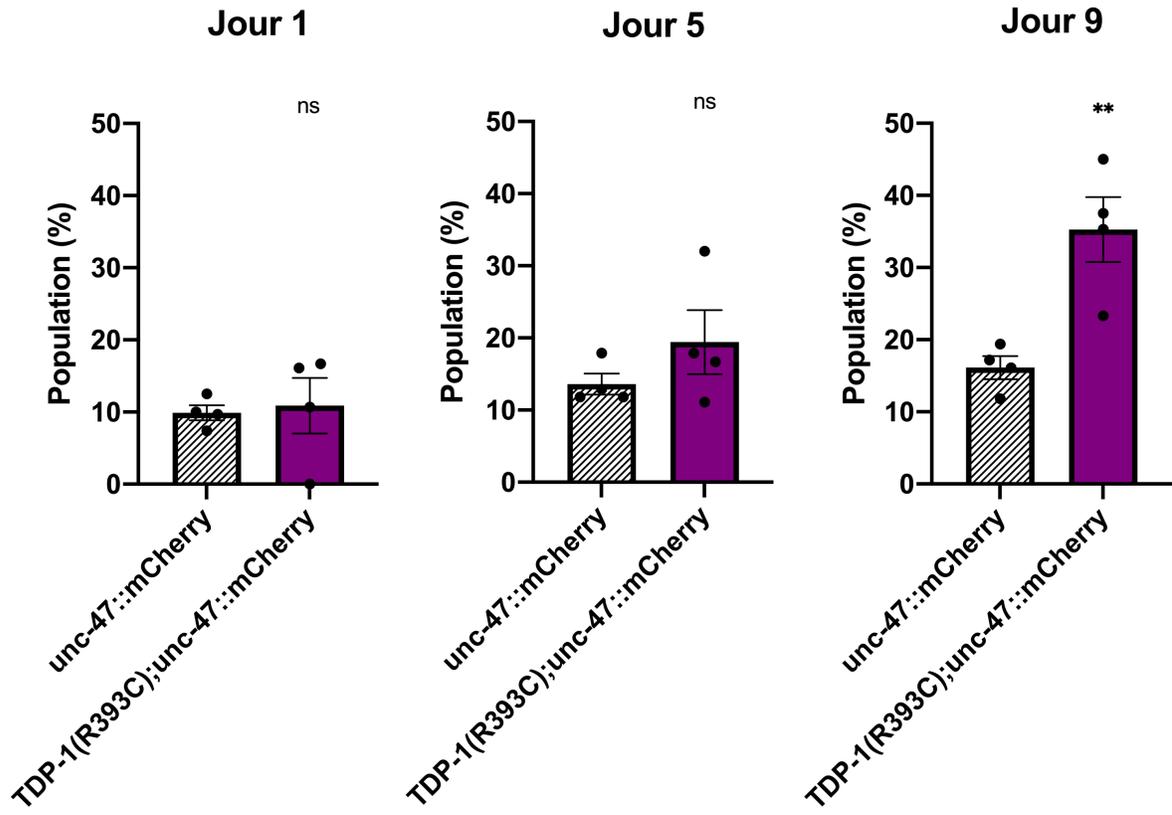
Comptabilisation de la neurodégénérescence à jour 1, 5 et 9 d'âge adulte selon si les ruptures de fluorescence se retrouvent sur la corde ventrale ou dorsale des nématodes. Les souches transgéniques TDP-43(WT) et TDP-43(Q331K) possèdent des ruptures de fluorescence davantage sur la corde ventrale [$*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.0005$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni; $n = 97-116$]. Les tests statistiques concernent le pourcentage de neurodégénérescence total. L'expérience a été répétée en quadruplicate.

L'intégrité des neurones moteurs GABAergiques du mutant endogène TDP-1(R393C) a également été observée pour voir s'il y a présence d'une neurodégénérescence liée à l'âge. Ce modèle a été croisé avec une souche de *C. elegans* où les neurones moteurs GABAergiques (*unc-47*) sont couplés à une protéine fluorescente mCherry (rouge). Les neurones moteurs GABAergiques ont été observés à jour 1, 5 et 9 de vie adulte à l'aide de la microscopie à fluorescence (voir section 2.11). La neurodégénérescence est caractérisée par des ruptures de fluorescence sur les projections axonales des neurones moteurs GABAergiques.

Selon la Figure 15A, le mutant endogène TDP-1(R393C) possède un pourcentage de neurodégénérescence significativement supérieur au contrôle *unc-47::mCherry* (WT) à jour 9 de vie adulte. Il est tout de même possible de constater que le pourcentage de neurodégénérescence

du mutant augmente constamment de jour 1 à jour 9. En effet, à jour 1, 11% des mutants TDP-1(R393C) présentent une neurodégénérescence comparativement à 10% pour le contrôle *unc-47::mCherry*. À jour 5 de vie adulte, les pourcentages de neurodégénérescence augmentent à 19% pour TDP-1(R393C) et 13% pour le contrôle WT. À jour 9, le pourcentage de la population de nématodes TDP-1(R393C) ayant une neurodégénérescence est d'environ 35% comparativement 16% pour WT. La Figure 15B illustre des images de microscopie à fluorescence à jour 1 et 9 du mutant endogène TDP-1(R393C) ainsi que du contrôle *unc-47::mCherry* (WT). Les flèches blanches indiquent les ruptures de fluorescence sur les projections axonales de la corde dorsale. Le mutant endogène comporte davantage de ruptures de fluorescence à jour 9 de vie adulte que le contrôle de type sauvage. Ainsi, ces résultats suggèrent que le mutant TDP-1(R393C) présente une neurodégénérescence liée à l'âge.

A



B

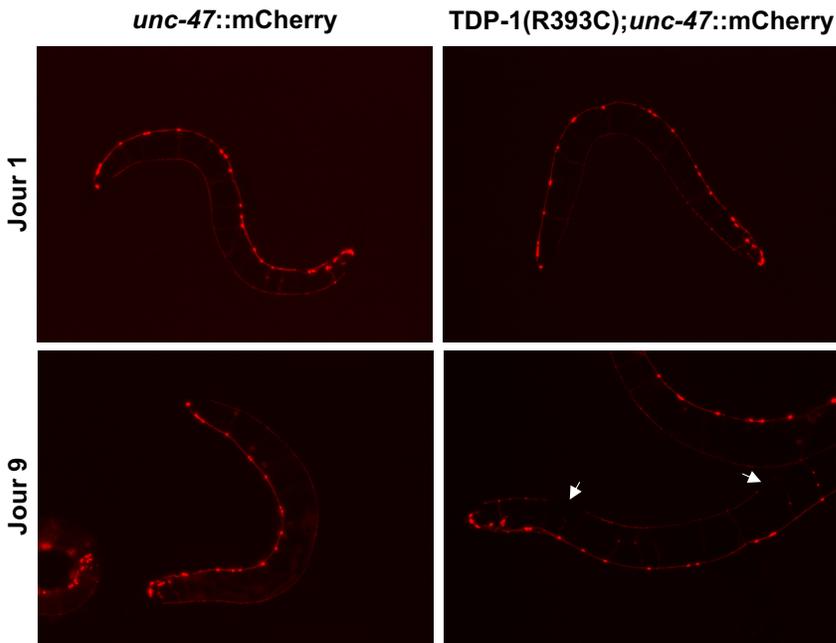


Figure 15. – Le mutant endogène TDP-1 présente une neurodégénérescence dépendante de l'âge.

Les souches ont été croisées avec le marqueur fluorescent mCherry dans les neurones moteurs GABAergiques. Un nématode possède de la neurodégénérescence lorsque minimum une rupture de fluorescence est observée dans les projections axonales peu importe la longueur de celle-ci. (A) Pourcentage de la population de nématodes présentant une neurodégénérescence à jour 1, 5 et 9 d'âge adulte. Chaque point (n) correspond au ratio (en %) du nombre de nématodes possédant de la neurodégénérescence sur le nombre total de nématodes évalués, par n. Le mutant TDP-1(R393C) possède un pourcentage de neurodégénérescence significativement supérieur au contrôle *unc-47::mCherry* à jour 9 d'âge adulte [$**P < 0.01$, par le test t de Student non-apparié; $n = 95-138$]. (B) Mosaïque d'images de microscopie à fluorescence à jour 1 et 9 d'âge adulte selon le rapporteur *unc-47::mCherry* dans les neurones moteurs GABAergiques le long de la corde ventrale et dorsale des nématodes. Les flèches blanches indiquent les ruptures de fluorescence sur les projections axonales de la corde dorsale. L'expérience a été répétée en quadruplicata.

Toujours dans le but d'élaborer sur la caractérisation de la neurodégénérescence du modèle endogène TDP-1(R393C), les ruptures de fluorescence dans les projections axonales ont été classées selon si elles se trouvaient sur la corde ventrale, dorsale ou les deux des neurones GABAergiques du nématode. Selon la Figure 16, la neurodégénérescence semble apparaître davantage sur la corde dorsale des nématodes du jour 1 à jour 9 de vie adulte, et ce, pour le mutant endogène et le contrôle. Plus les jours avancent, plus la proportion des ruptures de fluorescence qui se retrouvent à la fois sur la corde ventrale et dorsale augmente. Cette proportion de neurodégénérescence ventrale/dorsale est d'ailleurs plus élevée à jour 9 de vie adulte qu'uniquement dorsale pour le mutant TDP-1(R393C). Ces résultats suggèrent que le modèle endogène possède une spécificité quant à la localisation de la neurodégénérescence sur les axones des neurones GABAergiques; elle est davantage dorsale.

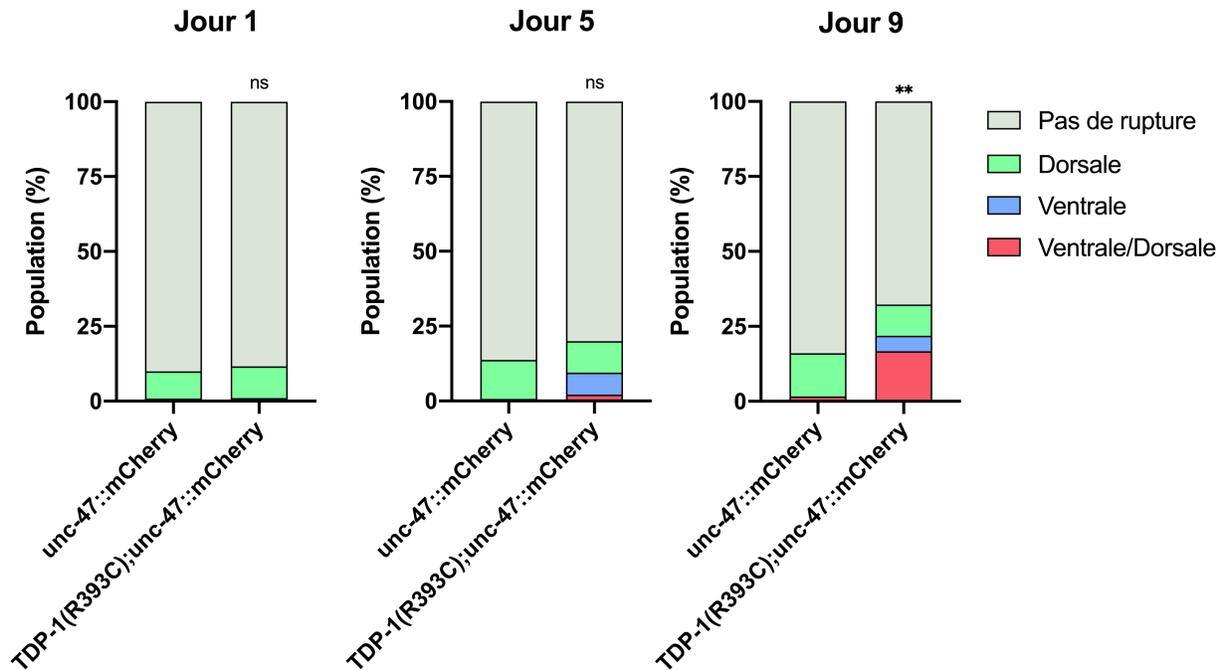


Figure 16. – Le mutant endogène TDP-1 semble développer une neurodégénérescence davantage dorsale.

Comptabilisation de la neurodégénérescence à jour 1,5 et 9 d'âge adulte selon si les ruptures de fluorescence se retrouvent sur la corde ventrale ou dorsale des nématodes. Le mutant endogène TDP-1(R393C) possède des ruptures de fluorescence davantage sur la corde dorsale [****** $P < 0.01$, par le test t de Student non-apparié; $n = 95-138$]. Les tests statistiques concernent le pourcentage de neurodégénérescence total. L'expérience a été répétée en quadruplicata.

3.2 L'effet de médicaments pour la SLA sur les modèles mutants TDP-43 et TDP-1

Le but du projet est de caractériser ces modèles TDP-43/TDP-1 afin de déterminer s'ils peuvent récapituler certains aspects phénotypiques clés de la SLA, tels que des déficits moteurs et une neurodégénérescence dépendante de l'âge générant une paralysie. Le but ultime est que ces modèles constituent des outils utiles pour élucider de nouveaux mécanismes pathogéniques de la SLA ainsi que de bons candidats pour le dépistage de médicaments et le développement de stratégies thérapeutiques. Ainsi, l'objectif de cette expérience est de vérifier si ces modèles transgéniques et endogènes TDP-43/TDP-1 répondent efficacement en présence de médicaments déjà approuvés par la FDA pour la SLA. Ces deux médicaments étant le riluzole et l'edaravone (voir section 1.1.4). L'essai de paralysie a été priorisé puisqu'il s'agit d'une expérience rapide et efficace où la paralysie des nématodes est évaluée chaque jour. De plus, le mutant transgénique TDP-43(Q331K) et endogène TDP-1(R393C) possèdent un taux de paralysie significativement plus élevé que les contrôles lorsqu'ils ne sont pas traités (voir section 3.2.2.1).

La Figure 17A illustre le pourcentage de paralysie (%) des nématodes en fonction des jours de vie adulte du mutant transgénique TDP-43(Q331K) et des contrôles TDP-43(WT) et WT selon s'ils sont traités avec 20 μ M de riluzole ou 20 μ M de DMSO (contrôle négatif) (voir section 2.12). Selon la Figure 17A, le taux de paralysie du mutant TDP-43(Q331K) traité avec 20 μ M riluzole n'est pas significativement différent de celui non traité (20 μ M DMSO). De plus, les contrôles TDP-43(WT) et WT traités avec 20 μ M riluzole possèdent un taux de paralysie supérieur à ceux non traités. La Figure 17B montre le même essai de paralysie avec le composé riluzole, mais pour le mutant endogène TDP-1(R393C) et son contrôle WT. Le mutant TDP-1(R393C) ainsi que le contrôle WT traités avec 20 μ M riluzole montrent un taux de paralysie significativement supérieur comparativement aux contrôles traités avec 20 μ M DMSO. Ainsi, ces résultats suggèrent que le composé riluzole n'a pas d'effet neuroprotecteur sur le mutant TDP-43(Q331K) et TDP-1(R393C), même qu'il accentue la paralysie dans certains cas.

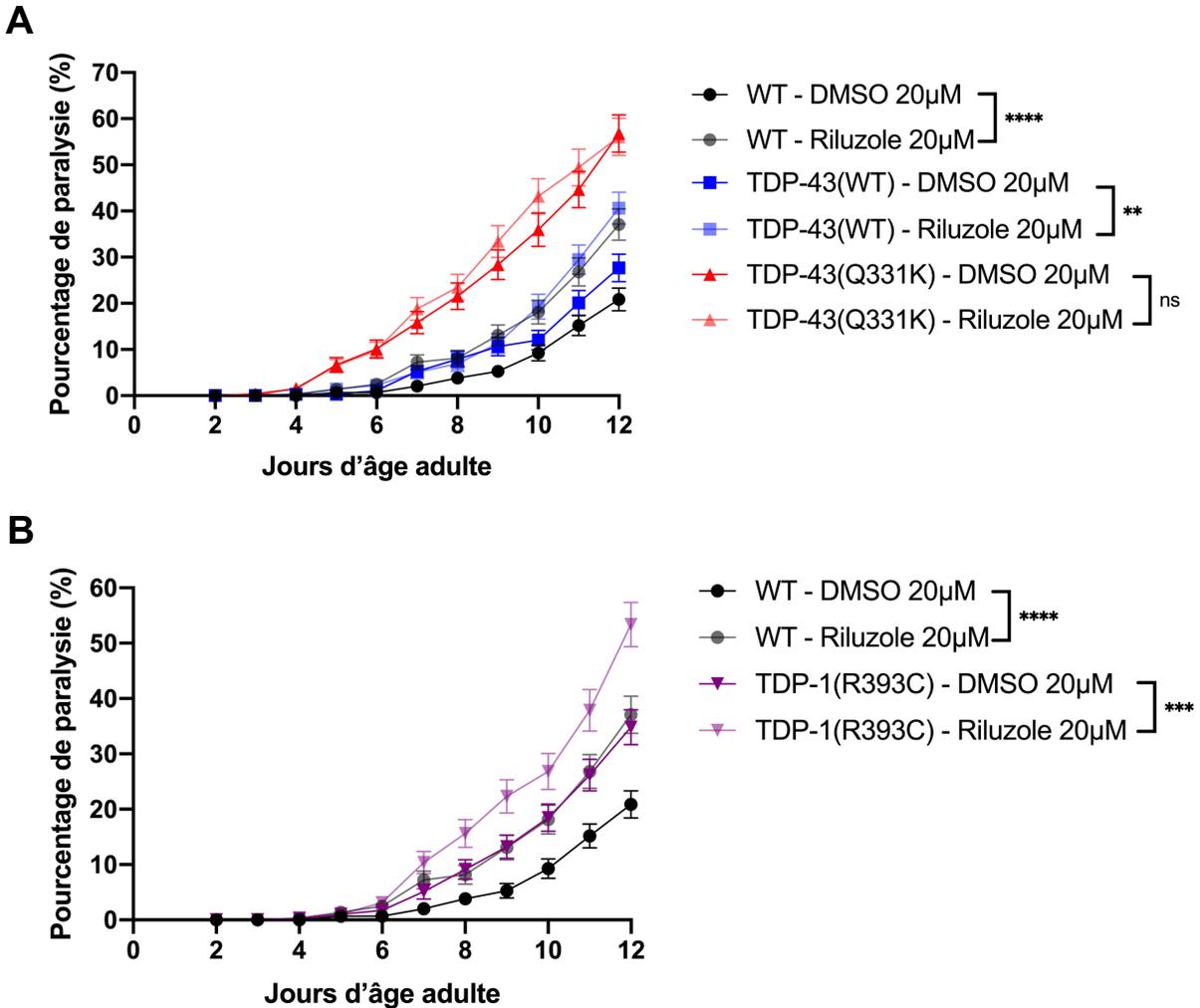


Figure 17. – Le composé riluzole n’a pas d’effet neuroprotecteur sur le mutant transgénique TDP-43 et endogène TDP-1.

Pourcentage de nématodes paralysés en fonction du nombre de jours d’âge adulte. (A) Le mutant TDP-43(Q331K) traité avec 20 µM de riluzole ne possède pas un taux de paralysie significativement différent du mutant transgénique non traité (20 µM DMSO). Les contrôles WT et TDP-43(WT) traités avec 20 µM de riluzole montrent un taux de paralysie significativement supérieur aux contrôles non traités [ns : non significatif $P > 0.5$, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$, par le test de log-rank (Mantel-Cox); $n = 270-325$]. (B) Le contrôle WT et le mutant TDP-1(R393C) traités avec 20 µM de riluzole possèdent un taux de paralysie significativement plus élevé que ceux non traités (20 µM DMSO) [$***P < 0.0005$, $****P < 0.0005$, par le test de log-rank (Mantel-Cox); $n = 307-325$]. L’expérience a été répétée en triplicata.

La Figure 18A illustre le pourcentage de paralysie (%) des nématodes en fonction des jours de vie adulte du mutant transgénique TDP-43(Q331K) et des contrôles TDP-43(WT) et WT selon s'ils sont traités avec 20 μ M d'edaravone ou 20 μ M de DMSO. Selon la Figure 18A, le pourcentage de paralysie du mutant TDP-43(Q331K) traités avec 20 μ M d'edaravone est significativement diminué passant d'environ 57% à 36% à jour 12 de vie adulte. Le composé edaravone ne semble pas ralentir le taux de paralysie des contrôles TDP-43(WT) et WT comparativement à ceux en présence de seulement 20 μ M de DMSO. La Figure 18B montre le même essai de paralysie avec le composé edaravone, mais pour le mutant endogène TDP-1(R393C) et son contrôle WT. Le mutant TDP-1(R393C) traité avec 20 μ M d'edaravone possède un taux de paralysie significativement inférieur comparativement au mutant endogène non traité (20 μ M DMSO), passant d'un pourcentage de paralysie d'environ 35% à 21% à jour 12 de vie adulte. Ces résultats suggèrent que le composé edaravone possède un effet neuroprotecteur sur le mutant transgénique TDP-43(Q331K) et endogène TDP-1(R393C).

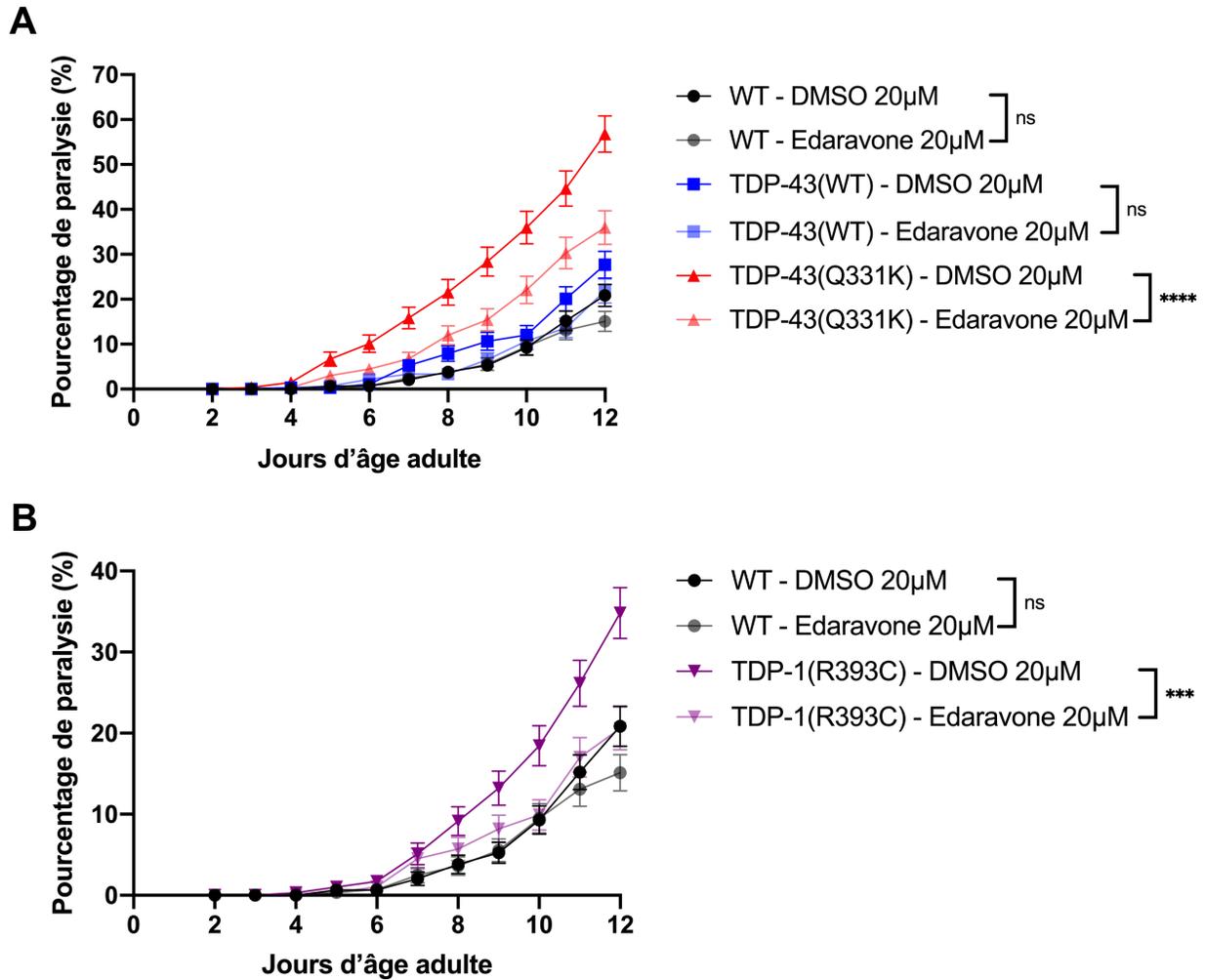


Figure 18. – Le composé Edaravone possède un effet neuroprotecteur sur le mutant transgénique TDP-43 et endogène TDP-1.

Pourcentage de nématodes paralysés en fonction du nombre de jours d'âge adulte. (A) Le mutant TDP-43(Q331K) traité avec 20 μM d'Edaravone possède un taux de paralysie significativement diminué comparativement au mutant transgénique non traité (20 μM DMSO). Les contrôles WT et TDP-43(WT) traités avec 20 μM d'Edaravone ne possèdent pas un taux de paralysie significativement différent de ceux non traités [ns : non significatif $P > 0.1$, **** $P < 0.0001$, par le test de log-rank (Mantel-Cox); $n = 270-325$]. (B) Le mutant TDP-1(R393C) traité avec 20 μM d'Edaravone montre un taux de paralysie significativement plus bas que le mutant endogène non traité (20 μM DMSO). Le contrôle WT traité avec 20 μM d'Edaravone ne possède pas un taux de paralysie significativement différent du contrôle WT non traité [ns : non significatif $P > 0.1$, *** $P < 0.001$, par le test de log-rank (Mantel-Cox); $n = 315-325$]. L'expérience a été répétée en triplicata.

3.3 Autre mutation endogène dans *tdp-1*

Le laboratoire a obtenu par mutagenèse un autre modèle physiologiquement représentatif du nématode basé sur une mutation endogène (R258C) dans *tdp-1*, l'orthologue de *TARDBP* (Figure 19) (75). Le but de ce deuxième modèle endogène est de s'assurer que pas toutes les mutations dans *tdp-1* résultent en un phénotype moteur ou une neurodégénérescence liée à l'âge. La mutation R258C se situe dans le premier domaine de motif de reconnaissance de l'ARN (RRM1) chez le *C. elegans*. Il ne s'agit pas du domaine où l'on retrouve la majorité des mutations, mais certains patients retrouvent des mutations dans ce domaine (Figure 1). Étant donné qu'il s'agit d'une mutation dans un gène endogène, la protéine mutante est exprimée de façon ubiquitaire. Un autre modèle endogène agissant comme contrôle positif a également été obtenu par CRISPR-Cas9 (par SunyBiotech) (Tableau 2). Ce contrôle permet de s'assurer, encore une fois, de l'absence de mutations indésirables en arrière-plan par rapport au modèle endogène obtenu par mutagenèse pour ne conserver que la mutation d'intérêt (R258C).

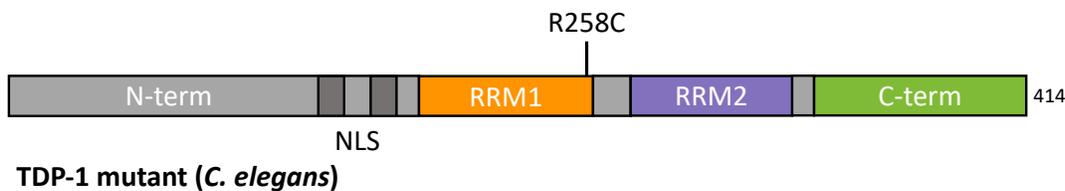


Figure 19. – Schématisation d'un autre modèle endogène TDP-1 non phénotypique de *Caenorhabditis elegans*.

Modèle possédant la protéine complète TDP-1 de *C. elegans* avec la mutation R258C a été obtenue par mutagenèse ou CRISPR-Cas9. N-term, région N-terminale; NLS, signal de localisation nucléaire; RRM1, motif de reconnaissance de l'ARN 1; RRM2, motif de reconnaissance de l'ARN 2; C-term, région C-terminale n'ayant pas de domaine riche en glycine.

Le tableau 2 résume les caractéristiques des deux autres modèles incluant le promoteur sous lequel la mutation est induite, la localisation de l'expression de la protéine ainsi que la méthode utilisée.

Tableau 2. – Caractéristiques du mutant endogène TDP-1(R258C) non phénotypique.

Souche	Promoteur	Expression	Méthode
TDP-1(R258C)	<i>tdp-1</i>	Ubiquitaire	Mutagenèse
crTDP-1(R258C)	<i>tdp-1</i>	Ubiquitaire	CRISPR-Cas9

Tout comme le mutant endogène TDP-1(R393C), il est également important de vérifier que la mutation présente dans ce mutant n'impact pas le niveau d'expression du transcrit *tdp-1*. Ainsi, les niveaux d'expression de l'ARNm *tdp-1* normalisés par ceux du gène endogène *ama-1* ont été mesurés dans ce modèle par RT-qPCR (Figure 20). Le gène *ama-1* code pour une sous-unité de l'ARN polymérase II chez le *C. elegans* (77). Selon la Figure 20, le niveau d'expression de *tdp-1* normalisé par *ama-1* du mutant TDP-1(R258C) est environ 1,2 fois plus élevé comparativement au contrôle négatif de type sauvage (WT). Ainsi, le niveau d'expression de l'ARNm *tdp-1* dans ce mutant TDP-1(R258C) est sensiblement au même niveau endogène que le contrôle de type sauvage WT.

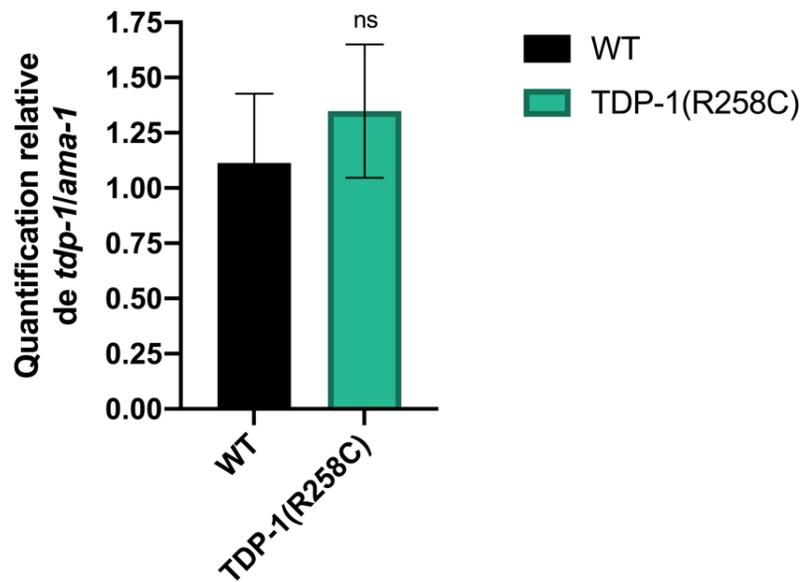


Figure 20. – Niveaux d’expression quantitative d’ARNm de *tdp-1*.

Quantification relative par RT-qPCR du niveau d’expression d’ARNm de *tdp-1* normalisé par le gène endogène *ama-1* (une sous-unité de l’ARN polymérase II chez le *C. elegans*) (77) pour le modèle endogène TDP-1 [ns : non significatif, par le test t de Student non-apparié]. L’expérience a été répétée en triplicata.

Comme mentionné précédemment, le but de ce deuxième modèle endogène est de s'assurer que pas toutes les mutations dans *tdp-1* résultent en un phénotype moteur ou une neurodégénérescence liée à l'âge. Ainsi, quelques essais ont été performés pour confirmer ou non cela. La Figure 21A-C montre plusieurs paramètres de locomotion obtenus par le logiciel WormLab à jour 1, 5 et 9 de vie adulte tels que la vitesse de reptation, l'activité et le taux de départs. Selon la Figure 21A, la vitesse de reptation ($\mu\text{m/s}$) du mutant TDP-1(R258C) semble légèrement supérieure au contrôle WT à jour 1 et 9, mais est non significativement différente de WT à jour 5 de vie adulte. La Figure 21B illustre l'activité ($\mu\text{m}^2/\text{min}$) qui correspond à la surface (μm^2) couverte par les nématodes durant une minute de nage. L'activité du mutant TDP-1(R258C) n'est significativement pas différente du contrôle WT à jour 1,5 et 9 de vie adulte. Selon la Figure 21C, le taux de départs (min^{-1}), qui correspond au nombre d'ondes corporelles initiées par la tête ou la queue par minute de nage, du mutant TDP-1(R258C) est très similaire à celui du contrôle WT à jour 1, 5 et 9. La Figure 21D correspond à un essai de paralysie qui montre le pourcentage de paralysie (%) en fonction du nombre de jours d'âge adulte. Le taux de paralysie du mutant TDP-1(R258C) n'est significativement pas différent des contrôles WT et crTDP-1(R258C). Le pourcentage de paralysie du contrôle positif crTDP-1(R258C) est légèrement supérieur au contrôle WT. La Figure 21E montre l'essai de durée de vie qui correspond au pourcentage de survie (%) des nématodes en fonction du nombre de jours de vie adulte. L'espérance de vie du mutant TDP-1(R258C) est significativement similaire à celle du contrôle WT. Finalement, l'essai d'aldicarbe consiste à évaluer la sensibilité de la transmission synaptique à cet inhibiteur de l'acétylcholinestérase. La Figure 21F illustre le pourcentage de paralysie (%) des nématodes en fonction du nombre d'heures passées en contact avec 1mM d'aldicarbe. Le pourcentage de paralysie du mutant TDP-1(R258C) est légèrement supérieur à celui du contrôle WT résultant en une faible sensibilité à l'aldicarbe. Tous ces résultats suggèrent que la mutation endogène R258C dans *tdp-1* n'engendre pas de phénotype moteur et n'a pas d'impact sur la durée de vie des nématodes.

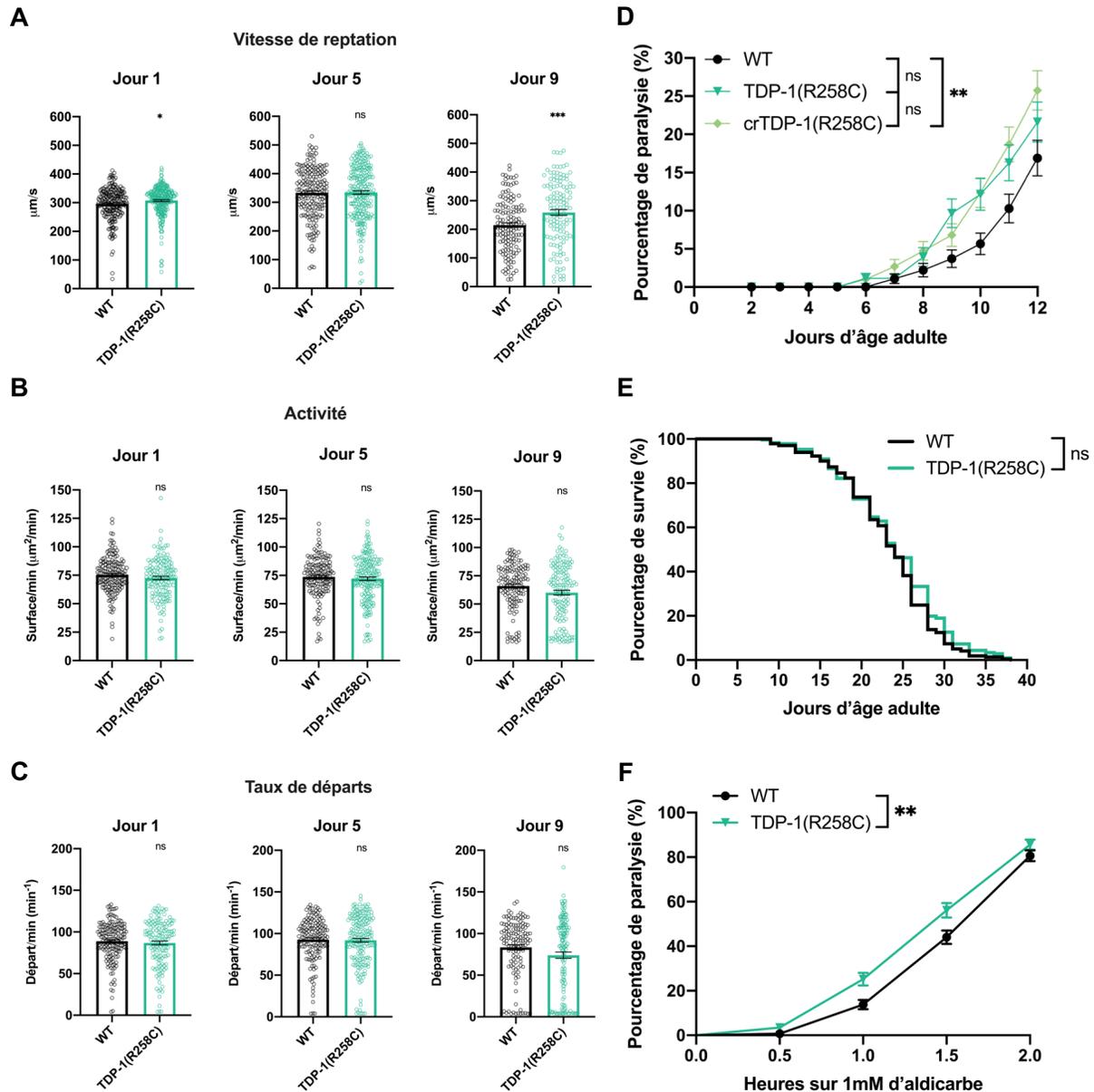


Figure 21. – Pas toutes les mutations endogènes dans *tdp-1* ont un effet sur la motilité et la durée de vie des nématodes.

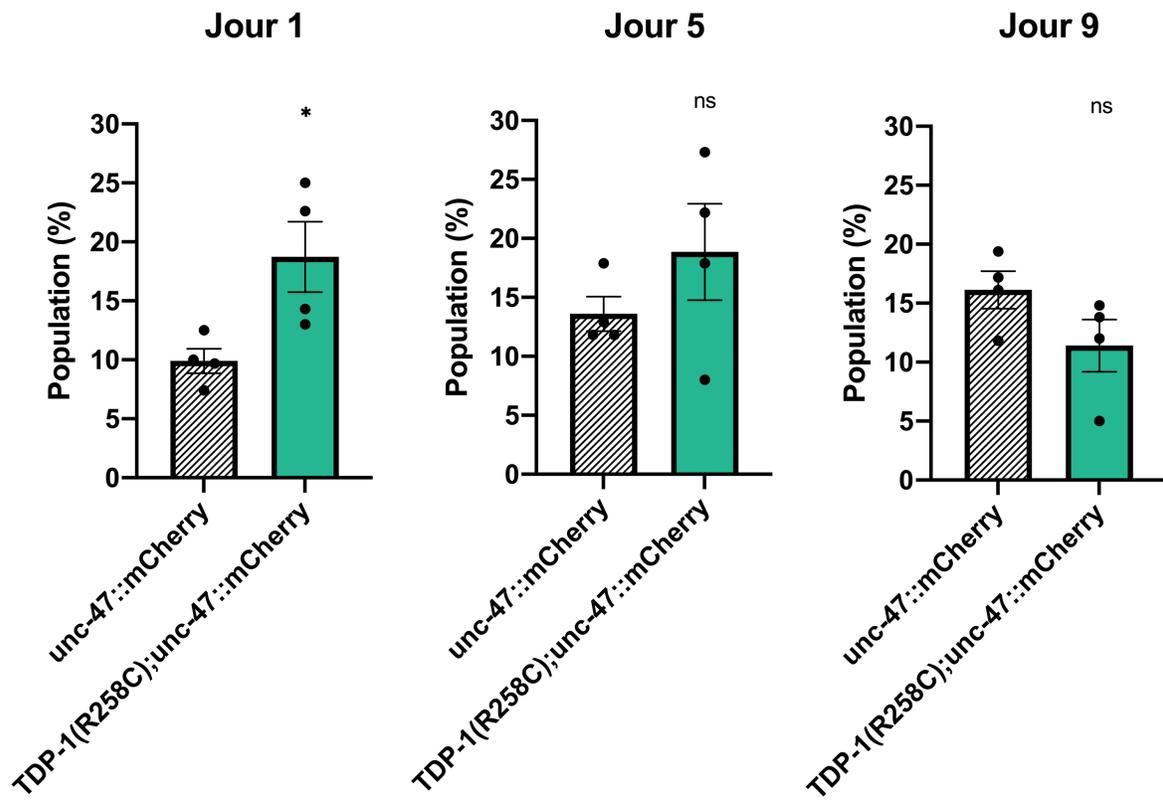
(A) La vitesse de reptation (µm/s) des nématodes à jour 1, 5 et 9 adulte. Le mutant TDP-1(R258C) possède une vitesse de reptation légèrement supérieure au contrôle wild-type N2 à jour 1 et 9 adulte. La vitesse de reptation du mutant TDP-1(R258C) n'est pas significativement différente de celle du contrôle WT à jour 5 adulte [$*P < 0.05$, $***P < 0.0005$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni; $n = 131-264$]. (B) L'activité (µm²/min) des nématodes à jour 1, 5 et 9 adulte. L'activité correspond à la surface (µm²) couverte par les vers durant une minute de nage. L'activité du mutant TDP-1(R258C) n'est significativement pas différente du contrôle WT à jour 1, 5 et 9 adulte [ns : non significatif $P > 0.05$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni; $n = 129-188$]. (C) Le taux de départs (min⁻¹) des

nématodes à jour 1,5 et 9 adulte. Le taux de départs correspond au nombre d'ondes corporelles initiées par la tête ou la queue par minute de nage. Le taux de départs du mutant TDP-1(R258C) n'est significativement pas différent de celui du contrôle WT [ns : non significatif $P>0.1$, par le test Ordinary one-way ANOVA à comparaisons multiples de Bonferroni; $n=129-188$]. (D) Pourcentage de nématodes paralysés en fonction du nombre de jours d'âge adulte. Le mutant TDP-1(R258C) ne possède pas un taux de paralysie significativement différent du contrôle WT ni du contrôle positif crTDP-1(R258C). Le taux de paralysie de crTDP-1(R258C) est légèrement supérieur au contrôle WT [ns : non significatif $P>0.1$, $**P<0.01$, par le test de log-rank (Mantel-Cox); $n=295-314$]. (E) Pourcentage de survie (%) des nématodes en fonction du nombre de jours d'âge adulte. La mutation dans TDP-1(R258C) n'a pas d'effet sur la durée de vie des nématodes [ns: non significatif, par le test de log-rank (Mantel-Cox); $n=280-293$]. (F) Pourcentage de nématodes paralysés en fonction du nombre d'heures passées en présence de 1mM d'aldicarbe. La transmission neuronale cholinergique a été mesurée en déterminant le début de la paralysie induite par l'inhibiteur de l'acétylcholinestérase, aldicarbe, à jour 1 d'âge adulte. Le mutant TDP-1(R258C) possède une sensibilité légèrement supérieure à l'aldicarbe comparativement au contrôle WT [$**P<0.01$, par le test de log-rank (Mantel-Cox); $n=237-268$]. Toutes les expériences ont été répétées en triplicata.

L'intégrité des neurones moteurs GABAergiques du mutant endogène TDP-1(R258C) a également été testée pour voir s'il y a présence d'une neurodégénérescence liée à l'âge qui n'aurait pas été traduit par un phénotype de motilité. Ce modèle a également été croisé avec une souche de *C. elegans* où les neurones moteurs GABAergiques (*unc-47*) sont couplés à une protéine fluorescente mCherry (rouge). Les neurones moteurs GABAergiques ont été observés à jour 1, 5 et 9 de vie adulte à l'aide de la microscopie à fluorescence (voir section 2.11). La neurodégénérescence est caractérisée par des ruptures de fluorescence sur les projections axonales des neurones moteurs GABAergiques.

Selon la Figure 22A, le mutant endogène TDP-1(R258C) n'a pas un pourcentage de neurodégénérescence significativement différent du contrôle *unc-47::mCherry* (WT), excepté à jour 1 de vie adulte. Le taux de neurodégénérescence du mutant semble même diminuer de jour 1 à jour 9. La Figure 22B illustre des images de microscopie à fluorescence à jour 1 et 9 du mutant endogène TDP-1(R258C) ainsi que du contrôle *unc-47::mCherry*. La majorité des nématodes mutants TDP-1(R258C) ne possèdent pas de rupture de fluorescence le long de leurs projections axonales. Ainsi, ces résultats suggèrent que le mutant TDP-1(R258C) ne semble pas présenter une neurodégénérescence liée à l'âge autre que le vieillissement normale.

A



B

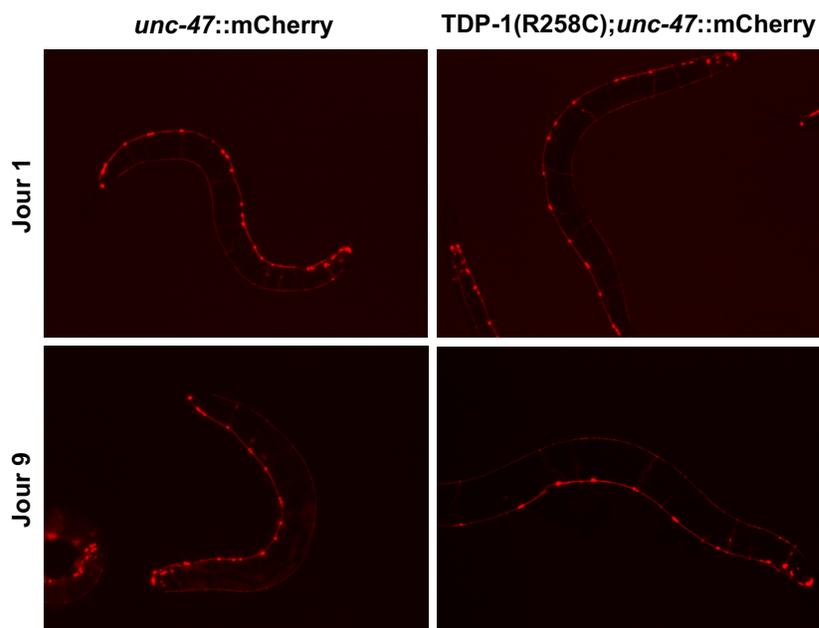


Figure 22. – Le mutant endogène TDP-1(R258C) ne semble pas présenter une neurodégénérescence dépendante de l'âge.

Les souches ont été croisées avec le marqueur fluorescent mCherry dans les neurones moteurs GABAergiques. Un nématode possède de la neurodégénérescence lorsque minimum une rupture de fluorescence est observée dans les projections axonales peu importe la longueur de celle-ci. (A) Pourcentage de la population de nématodes présentant une neurodégénérescence à jour 1, 5 et 9 d'âge adulte. Chaque point (n) correspond au ratio (en %) du nombre de nématodes possédant de la neurodégénérescence sur le nombre total de nématodes évalués, par n. Le mutant TDP-1(R258C) ne possède pas un pourcentage de neurodégénérescence significativement différent du contrôle *unc-47::mCherry* à jour 5 et 9 d'âge adulte [ns : non significatif $P > 0.1$, $*P < 0.05$, par le test t de Student non-apparié; $n = 101-138$]. (B) Mosaïque d'images de microscopie à fluorescence à jour 1 et 9 d'âge adulte selon le rapporteur *unc-47::mCherry* dans les neurones moteurs GABAergiques le long de la corde ventrale et dorsale des nématodes. L'expérience a été répétée en quadruplicata.

La caractérisation de la neurodégénérescence du modèle endogène TDP-1(R258C) a également été élaborée selon si les ruptures de fluorescence dans les projections axonales se trouvaient sur la corde ventrale, dorsale ou les deux des neurones GABAergiques du nématode. Selon la Figure 23, la neurodégénérescence semble également apparaître davantage sur la corde dorsale des nématodes du jour 1 à jour 9 de vie adulte, et ce, pour le mutant endogène et le contrôle. Peu de nématodes ont des ruptures de fluorescence qui se trouvent à la fois sur la corde ventrale et dorsale des neurones GABAergiques. Ces résultats suggèrent que ce deuxième modèle endogène TDP-1(R258C) possède également une spécificité quant à la localisation de la neurodégénérescence sur les axones des neurones GABAergiques; elle est davantage dorsale.

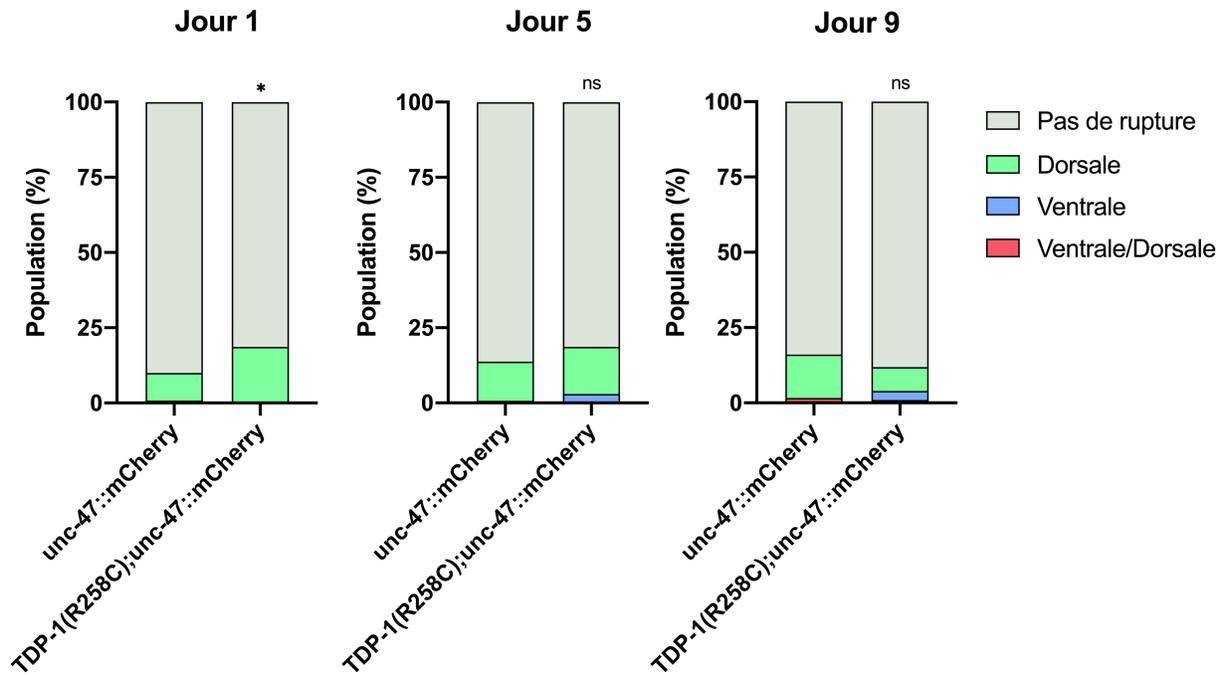


Figure 23. – Le mutant endogène TDP-1(R258C) présente une neurodégénérescence davantage dorsale.

Comptabilisation de la neurodégénérescence à jour 1,5 et 9 d'âge adulte selon si les ruptures de fluorescence se retrouvent sur la corde ventrale ou dorsale des nématodes. Le mutant endogène TDP-1(R258C) possède des ruptures de fluorescence davantage sur la corde dorsale [ns : non significatif $P > 0.1$, $*P < 0.05$, par le test t de Student non-apparié; $n = 101-138$]. Les tests statistiques concernent le pourcentage de neurodégénérescence total. L'expérience a été répétée en quadruplicata.

Chapitre 4 – Discussion

La SLA est une maladie neurodégénérative fatale caractérisée par la perte progressive et sélective des neurones moteurs supérieurs et inférieurs. Ce manque de stimulation neuronale fait en sorte que les muscles du corps s'atrophient (4). La paralysie s'installe progressivement jusqu'à ce que celle-ci provoque une insuffisance respiratoire. Cette maladie apparaît de façon tardive et les patients atteints décèdent généralement 2 à 5 ans à la suite de l'apparition des premiers symptômes (5-8). La SLA est incurable et il n'existe aucun traitement efficace pour les personnes atteintes de cette maladie. Environ 90% des cas sont sporadiques (multifactoriels et aléatoires) et 10% sont familiaux, c'est-à-dire transmis de façon héréditaire (11). Plusieurs anomalies génétiques ont été associées à la SLA, dont des mutations dans les protéines FUS, C9orf72, SOD-1 et TDP-43 causant la forme familiale, mais qui peuvent aussi contribuer au développement de la forme sporadique.

Les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation impliqués dans la SLA sont peu connus. Ainsi, l'étude de ces derniers est primordiale pour le développement de stratégies thérapeutiques qui pourront ralentir de façon significative la progression de la maladie et dans le meilleur des cas, traiter efficacement les patients atteints. Par conséquent, l'élaboration de modèles de recherche est essentielle pour pouvoir étudier les mécanismes intrinsèques de la SLA avant de poursuivre à la recherche clinique. Le modèle de recherche *C. elegans* a été priorisé parce qu'il comporte de nombreux avantages comme un cycle de développement et de vie court, une simple manipulation génétique, un système nerveux bien défini, une conservation des interactions génétiques et moléculaires, et la présence d'un gène orthologue de celui d'intérêt chez l'humain.

Le laboratoire a développé séparément des modèles transgéniques de *C. elegans* surexprimant (copies multiples) la protéine humaine TDP-43 de type sauvage (WT) et mutante (Q331K) sous le promoteur spécifique des neurones moteurs GABAergiques, *unc-47* (80, 81). Certains patients atteints de la SLA possèdent cette mutation génétique (Q331K) dans leur gène *TARDBP*. La protéine humaine a été exprimée uniquement dans les neurones GABAergiques et non dans tout le système nerveux (promoteur pan-neuronal *snb-1*) pour tenter de limiter l'effet de

surexpression (82). En effet, une surexpression, même d'une protéine de type sauvage, peut engendrer des phénotypes de type mutant (83). D'autre part, une intégration à copies multiples augmente la probabilité d'observer un phénotype dans les modèles comparativement à une intégration à copie unique dont les chances sont moindres (81). Le gène endogène *tdp-1* n'a pas été supprimé de ces modèles transgéniques puisque cette délétion entraîne un phénotype. En effet, des études ont démontré que la délétion de *tdp-1* provoque préférentiellement l'accumulation de l'ARN double brin ce qui peut résulter en des problèmes d'épissage (84). De plus, les mutants *tdp-1(ok781)* ont une durée de vie légèrement prolongée (85). Ainsi, pour s'assurer que les phénotypes observés lors de la caractérisation sont dus uniquement à la mutation d'intérêt, la protéine TDP-1 est également exprimée.

Une mise en garde des modèles transgéniques est que les phénotypes peuvent en partie être des artefacts de surexpression (86). L'expression spécifique à un seul type de cellule à l'aide de promoteurs neuronaux ne reflète pas l'expression ubiquitaire de TDP-43. Par contre, un modèle transgénique avec un fort phénotype pourrait être un outil pertinent pour effectuer le criblage de médicaments. Cependant, une seule mutation faux-sens dans *tdp-1* peut ne pas aboutir à un phénotype robuste. Ainsi, le laboratoire a également obtenu par mutagenèse un modèle physiologiquement représentatif du nématode basé sur une mutation endogène dans *tdp-1*, l'orthologue de *TARDBP* (75, 87). Ce mutant TDP-1(R393C) exprime la protéine de façon ubiquitaire. La mutagenèse implique que des mutations ont été incorporées dans tout le génome du nématode. La mutation d'intérêt (R393C) a été isolée en croisant le mutant avec la souche de type sauvage N2 (WT) au moins 6 fois. Pour s'assurer que les phénotypes observables sont dus à la mutation d'intérêt et non à des mutations encore présentes en arrière-plan, un contrôle positif obtenu par CRISPR-Cas9 a été ajouté, crTDP-1(R393C). La mutation est introduite avec la technologie CRISPR-Cas9 directement à l'endroit désiré dans la souche de type sauvage N2. Ainsi, aucune mutation non désirable ne devrait être présente en arrière-plan.

Le but du projet est de caractériser les modèles transgéniques TDP-43 et endogènes TDP-1 de *C. elegans* pour déterminer si ceux-ci peuvent récapituler certains aspects phénotypiques clés de la maladie SLA tels que des déficits moteurs et une neurodégénérescence liée à l'âge générant une paralysie.

L'hypothèse de recherche est que le modèle TDP-1 reflétera plus précisément l'expression physiologique du gène dans la maladie humaine grâce à la mutation dans un gène endogène, l'absence de surexpression et l'expression ubiquitaire de la protéine TDP-1.

Pour ce faire, deux objectifs ont été établis, soit d'explorer l'impact des mutations TDP-43/TDP-1 sur l'aspect physiologique des modèles et d'évaluer les répercussions de ces défauts génétiques sur l'intégrité du système nerveux moteur.

4.1 Niveaux d'expression quantitative d'ARNm

Pour s'assurer que les transgènes sont exprimés dans le nématode, les niveaux d'expression relative de l'ARNm *TARDBP* ont été mesurés dans les modèles TDP-43(WT) et TDP-43(Q331K) par RT-qPCR (Figure 7A). Étant donné que les transgènes ont été exprimés uniquement dans les neurones moteurs GABAergiques, le gène endogène *unc-47* a été utilisé pour la normalisation. Celui-ci code pour un transporteur transmembranaire de GABA chez le *C. elegans* et est donc spécifique pour les neurones GABAergiques (76). Pour le transgène TDP-43(WT), le niveau d'expression de *TARDBP* normalisé par *unc-47* est environ 24,8 fois plus élevé que celui du contrôle négatif de type sauvage (WT). Le niveau d'expression de *TARDBP* normalisé par *unc-47* du transgène TDP-43(Q331K) est environ 88 fois plus élevé que celui du contrôle WT et environ 3,5 fois plus élevé que TDP-43(WT). Ces résultats confirment que les deux transgènes TDP-43(WT) et TDP-43(Q331K) sont effectivement exprimés dans les modèles respectifs, car leur niveau d'expression est nettement supérieur au contrôle négatif (WT) dans lequel aucun transgène n'est présent. Une limitation de la méthode de transgénèse est la variabilité des niveaux d'expression du transgène entre les modèles. En effet, il est difficile de prédire et de contrôler le nombre de copies qui sera intégré dans le génome des nématodes (88, 89). Idéalement, les niveaux d'expression de *TARDBP* devraient être similaires entre les modèles TDP-43(WT) et TDP-43(Q331K) pour être en mesure de les comparer. Ceci étant dit, le niveau d'expression de *TARDBP* dans le modèle TDP-43(WT) est tout de même environ 25 fois plus élevé que celui du contrôle WT ce qui devrait être assez différent pour observer ou non un phénotype. Le modèle TDP-1(R393C) contient une mutation ponctuelle dans un gène endogène et n'est donc pas transgénique. Le niveau d'expression de *tdp-1* est tout de même mesuré par RT-qPCR pour

vérifier que la mutation présente n'influe pas sur l'expression du transcrit. Les niveaux d'expression de l'ARNm *tdp-1* sont normalisés avec ceux du gène de ménage *ama-1* (Figure 7B). Ce gène code pour une sous-unité de l'ARN polymérase II chez le *C. elegans*, la protéine résultante est donc exprimée de façon ubiquitaire (77). Ce gène a été priorisé pour la normalisation puisqu'il semble davantage stable dans les modèles de neurodégénérescence comparativement à d'autres gènes de ménage (90). Selon la Figure 7B, le niveau d'expression de *tdp-1* normalisé par *ama-1* du mutant TDP-1(R393C) est environ 1,2 fois plus élevé que celui du contrôle négatif de type sauvage (WT). Ainsi, la mutation endogène n'affecte pas le niveau d'expression de l'ARNm *tdp-1* dans le modèle TDP-1(R393C) et celui-ci est sensiblement au même niveau que le contrôle WT.

En plus de mesurer les niveaux d'expression des ARNm d'intérêts pour s'assurer que les gènes sont transcrits, il est aussi important de vérifier que ces derniers sont traduits en protéines à l'aide d'un immunobuvardage de type Western. Ceci a été confirmé par le laboratoire pour les modèles transgéniques à l'aide d'un anticorps (AC) spécifique contre la protéine TDP-43 humaine (résultats non montrés). Idéalement, ceci devrait aussi être fait pour les modèles endogènes. Par contre, la majorité des AC contre des protéines spécifiques de vertébrés ou d'invertébrés ne sont pas spécifiques pour les protéines homologues de *C. elegans*, excepté les AC dirigés contre des protéines hautement conservées comme l'actine ou la tubuline (91). Il aurait fallu générer des AC spécifiques pour TDP-1, mais la conception de ceux-ci est difficile, longue et coûteuse.

4.2 L'aspect physiologique des modèles

Le premier objectif de ce projet pour être en mesure de répondre à l'hypothèse est d'explorer l'impact des mutations TDP-43/TDP-1 sur l'aspect physiologique des modèles.

Étant donné que la SLA est une maladie neurodégénérative liée à l'âge et que l'espérance de vie des patients se voit diminuée, l'essai de durée de vie a été effectué pour voir si les mutations dans TDP-43 et TDP-1 engendrent également une diminution de la durée de vie des nématodes. Selon la Figure 8A, le mutant transgénique TDP-43(Q331K) possède une durée de vie réduite comparativement aux contrôles TDP-43(WT) et WT. Cette diminution se manifeste davantage dans les premiers jours de vie adulte, principalement entre les jours 6 et 22. De plus, la souche transgénique exprimant la protéine humaine de type sauvage (TDP-43(WT)) n'a pas une durée de

vie diminuer comparativement au contrôle WT. Ceci suggère que la mutation Q331K dans TDP-43 spécifiquement a un impact sur la durée de vie des nématodes et potentiellement sur leur santé générale (« healthspan »). En comparaison, le groupe de recherche qui a généré des modèles transgéniques exprimant TDP-43 de type sauvage (WT) et mutant (G290A, A315T et M337V) de façon pan-neuronale (promoteur *snb-1*) a également observé une diminution de l'espérance de vie, mais dans tous leurs modèles (voir section 1.3.4) (67). Ceci peut être expliqué par le fait que leurs transgènes ont été exprimés dans tout le système nerveux des nématodes. En effet, le niveau d'expression de *TARDBP* est plus élevé que si les transgènes étaient exprimés uniquement dans un sous-type de neurones, par exemple GABAergiques, ce qui résulte en un phénotype plus fort. Selon la Figure 8B, la mutation endogène R393C dans TDP-1 ne semble pas avoir un impact sur la durée de vie des nématodes. Parfois, une seule mutation faux-sens peut ne pas engendrer un phénotype robuste. Cette mutation dans *tdp-1* semble toutefois influencer la motilité et l'intégrité du système nerveux des nématodes (voir prochaines sections).

Le logiciel WormLab est un système d'imagerie, de suivi et d'analyse qui s'applique à plusieurs nématodes incluant le *C. elegans*. Ce récent programme permet d'analyser de nombreux paramètres en milieu solide (reptation) ou liquide (nage) comme la vitesse instantanée ou moyenne, la longueur d'ondulation du corps, la longueur du trajet effectué, les angles de flexion du corps ou de la tête, l'amplitude moyenne, le taux d'immobilité et plus encore. Dans ce contexte-ci, des paramètres de locomotion ont été choisis pour déterminer si les mutants TDP-43(Q331K) et TDP-1(R393C) présentent des défauts de motilité. Le premier paramètre est la vitesse de reptation et celui-ci se mesure en milieu solide. Les trois autres paramètres, la vitesse de nage, l'activité et le taux de départs sont détectés en milieu liquide. Les vidéos de 30 secondes des nématodes ont été prises sur des boîtes de Petri NGM sans OP50 *E. coli* (source de nourriture un peu visqueuse). Cette optimisation a été faite pour favoriser la locomotion et pour avoir une meilleure détection des nématodes par le logiciel. En effet, en présence de nourriture, les nématodes n'ont pas tendance à effectuer de grands mouvements volontaires puisqu'ils ont accès à de la nourriture à proximité. Ainsi, sans nourriture, le temps de prendre la vidéo, les nématodes sont alors à la recherche active de bactéries *E. coli* (OP50). L'avantage de ce logiciel est qu'il est possible d'étudier différents paramètres sur chaque nématode individuellement à

travers le temps. Les modèles transgéniques et endogènes ont été étudiés à jour 1, 5 et 9 de vie adulte. Ces jours de vie adulte ont été choisis pour pouvoir visualiser l'effet des mutations sur un large spectre de la durée de vie des nématodes. Au départ, le jour 12 de vie adulte a également été inclus, mais à cet âge tous les nématodes sont sensiblement malades/vieux et les différences phénotypiques étaient non significatives (résultats non montrés). Les résultats sont intéressants lorsqu'il est possible d'observer une grande différence entre les souches mutantes et de type sauvage. C'est pour cette raison que l'intervalle d'analyse a été maintenu de jour 1 à jour 9 de vie adulte. Selon la Figure 9, que ce soit pour la vitesse de reptation, la vitesse de nage, l'activité ou le taux de départ, les taux du mutant transgénique TDP-43(Q331K) sont significativement réduits à jour 1, 5 et 9 de vie adulte comparativement aux contrôles TDP-43(WT) et WT. De plus, pour chaque paramètre, les taux du mutant TDP-43(Q331K) demeurent sensiblement stables et constants de jour 1 à jour 9 de vie adulte. Ceci suggère que le mutant transgénique possède des problèmes de motilité dès le début de l'âge adulte et que ceux-ci persistent jusqu'à jour 9. Pour ce qui est du mutant endogène TDP-1(R393C), les taux des paramètres de la vitesse de reptation, de la vitesse de nage et de l'activité diminuent de façon progressive avec le temps (Figure 10ABC). En effet, les taux de TDP-1(R393C) sont peu ou pas différents du contrôle WT à jour 1 et ceux-ci deviennent significativement plus bas à jour 5 de vie adulte. Pour certains paramètres comme la vitesse de nage, cette différence significative se maintient également à jour 9, mais pour d'autres, comme la vitesse de reptation et l'activité, les taux ont tendance à se stabiliser avec le contrôle WT. Ainsi, ces résultats suggèrent que le mutant endogène TDP-1(R393C) possède des défauts de motilité, mais que ceux-ci se manifestent progressivement avec l'âge des nématodes. Concernant le dernier paramètre soit le taux de départs (Figure 10D), il est difficile d'extrapoler une conclusion pour le mutant TDP-1(R393C). Les différents taux ne sont pas constants ou ne diminuent pas de façon proportionnelle en fonction des jours. Ainsi, pas tous les paramètres du logiciel WormLab sont pertinents pour montrer un phénotype d'un mutant. Chaque paramètre ou groupe de paramètres peut être spécifique pour une souche de *C. elegans*. Il est donc important, lors d'une caractérisation, de tester plusieurs paramètres pour voir lequel montre le meilleur phénotype pour le modèle d'intérêt. Par la suite, ce paramètre peut être utilisé avec le modèle pour effectuer un criblage de médicaments, par exemple. Dans ce cas-ci, le paramètre

WormLab où le phénotype de motilité semble le plus prononcé pour les mutants TDP-43(Q331K) et TDP-1(R393C) est celui de la vitesse de nage. En effet, lors de la nage, les nématodes effectuent des mouvements plus grands et plus amples que lorsqu'ils rampent. Cette différence de mouvement est perceptible par le logiciel et se traduit par un plus grand phénotype comparativement aux contrôles.

4.3 L'intégrité du système nerveux moteur

Pour pouvoir répondre à l'hypothèse du projet, le deuxième objectif est d'évaluer les répercussions des défauts génétiques sur l'intégrité du système nerveux moteur des mutants TDP-43(Q331K) et TDP-1(R393C).

La SLA est une maladie neurodégénérative qui résulte en la perte progressive et sélective des neurones moteurs supérieurs et inférieurs chez l'humain. Ainsi, l'essai de paralysie a été effectué pour voir si les mutations dans TDP-43 et TDP-1 engendrent une paralysie dépendante de l'âge. La Figure 11 décrit le pourcentage de paralysie des nématodes (%) en fonction du nombre de jours de vie adulte. Seuls les 12 premiers jours de vie adulte ont été analysés pour être en mesure de distinguer la paralysie précoce du vieillissement normal des nématodes. Selon la Figure 11A, le taux de paralysie du mutant TDP-43(Q331K) est significativement plus élevé que celui des contrôles TDP-43(WT) et WT. La paralysie commence à se manifester chez le mutant transgénique vers les jours 5-6 de vie adulte. Ces résultats sont similaires avec un autre mutant transgénique qui exprime la protéine mutante TDP-43(A315T) également dans les neurones moteurs GABAergiques (68). Selon la Figure 11B, le mutant TDP-1(R393C) présente également un pourcentage de paralysie qui est significativement supérieur au contrôle WT. Cette paralysie du mutant endogène se distingue du contrôle de type sauvage vers le jour 6-7 de vie adulte. Ces résultats suggèrent que les mutants TDP-43(Q331K) et TDP-1(R393C) ont des déficits moteurs résultant en un phénotype de paralysie dépendant de l'âge. Il est possible de constater que la paralysie du mutant endogène commence plus tard que celui du mutant transgénique. Ces résultats concordent avec les défauts de motilité que l'on observe à l'aide des différents paramètres du logiciel WormLab. De plus, les déficits moteurs sont détectés plus tard pour les deux modèles avec l'essai de paralysie comparativement aux paramètres WormLab dont certains

phénotypes sont visibles dès jour 1 de vie adulte. Ainsi, ce récent logiciel semble plus précis pour la détection de phénotypes et celui-ci pourrait être utilisé pour déceler de faibles différences phénotypiques.

Une façon d'évaluer l'intégrité du système nerveux des mutants transgéniques et endogènes est d'estimer la sensibilité de la transmission synaptique au pesticide aldicarbe. Les neurones moteurs excitateurs libérant l'acétylcholine et les neurones inhibiteurs libérant le GABA (acide γ -aminobutyrique) sont responsable du mouvement des nématodes. Les récepteurs au niveau post-synaptique des jonctions neuromusculaires (JNM) sont activés par l'acétylcholine libérée dans la fente synaptique entraînant une contraction des muscles. L'enzyme acétylcholinestérase est responsable de la dégradation de l'acétylcholine dans la fente synaptique ce qui arrête la neurotransmission. L'aldicarbe est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase. Ainsi, en présence d'aldicarbe, l'acétylcholine s'accumule dans la fente synaptique provoquant une hypercontraction musculaire et générant une paralysie chez le *C. elegans* (Figure 24) (78).

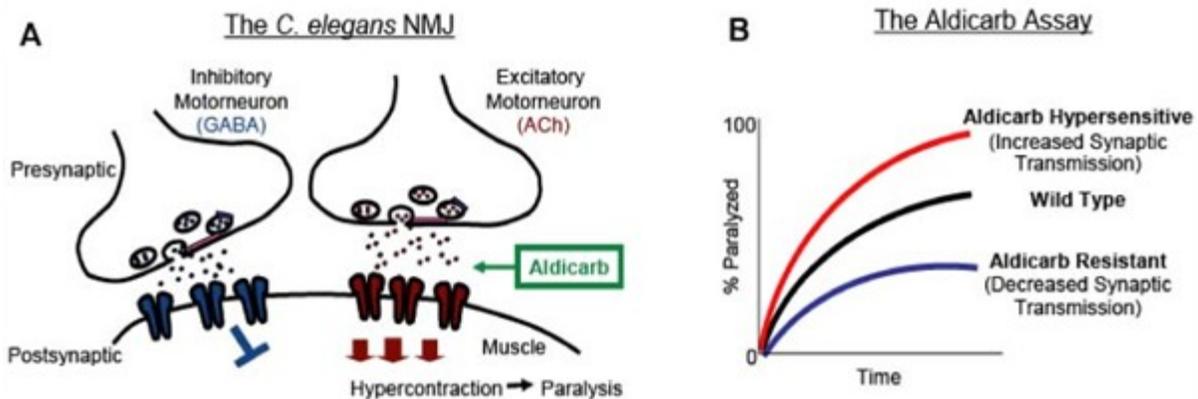


Figure 24. – L'effet du pesticide aldicarbe sur les jonctions neuromusculaires (JNM).

(A) Schéma d'une JNM avec les neurones moteurs présynaptiques GABAergiques (inhibiteurs) et cholinergiques (excitateurs), leurs neurotransmetteurs respectifs GABA et acétylcholine ainsi que les récepteurs correspondants postsynaptiques au niveau du muscle. L'aldicarbe provoque l'accumulation de l'acétylcholine dans la fente synaptique qui continue à se lier aux récepteurs postsynaptiques provoquant ainsi une contraction musculaire constante. (B) Les différentes possibilités de résultats à la suite d'un essai de paralysie en présence d'aldicarbe. Les mutants ayant une hypersensibilité à l'aldicarbe ont une transmission synaptique accrue et paralysent plus vite que les nématodes de type sauvage. Inversement, ceux ayant une résistance au pesticide ont une transmission synaptique réduite et paralysent moins vite que les nématodes WT (92).

Selon la Figure 12A, le taux de paralysie en présence de 1mM d'aldicarbe des deux souches transgéniques TDP-43(Q331K) et TDP-43(WT) est significativement supérieur au contrôle WT. Le pourcentage de paralysie du mutant endogène TDP-1(R393C) est également supérieur au contrôle WT (Figure 12B). Ces résultats montrent que les modèles TDP-43(WT), TDP-43(Q331K) et TDP-1(R393C) sont hypersensibles à l'inhibiteur de l'acétylcholinestérase et présentent des défauts de transmissions synaptiques. Le mutant TDP-43(A315T) dont le transgène est également exprimé dans les neurones moteurs GABAergiques possède également une hypersensibilité à l'aldicarbe (68). Une hypersensibilité à l'aldicarbe chez des nématodes mutants peut être engendrée soit par une signalisation cholinergique trop élevée ou soit par une signalisation GABAergiques trop faible (92). Dans toutes les souches, même WT, la signalisation cholinergique est très élevée en présence d'aldicarbe. Ainsi, ceci suggère que les défauts de transmissions synaptiques passeraient par les neurones moteurs GABAergiques. Il est difficile d'expliquer pourquoi la souche transgénique TDP-43(WT) est également sensible à l'aldicarbe. Ceci pourrait être expliqué par le fait que même s'il s'agit de la protéine de type sauvage, celle-ci est surexprimée dans une sous-population neuronale. Par contre, dans les autres essais visant à caractériser l'intégrité du système nerveux moteur, la souche TDP-43(WT) a tendance à agir de la même façon que le contrôle WT.

Pour concrètement évaluer l'intégrité des neurones moteurs GABAergiques, les modèles TDP-43 et TDP-1 ont été croisés avec un marqueur fluorescent spécifique (*unc-47*) et ceux-ci ont été observés à l'aide de la microscopie à fluorescence à jour 1, 5 et 9 de vie adulte. La neurodégénérescence est caractérisée par des ruptures de fluorescence sur les projections axonales des neurones moteurs GABAergiques. Selon la Figure 13A, le pourcentage de neurodégénérescence du mutant TDP-43(Q331K) est significativement plus élevé que les contrôles TDP-43(WT) à jour 1 et 9 de vie adulte. Par contre, ce n'est pas le cas à jour 5. Ceci peut être expliqué par le fait que beaucoup de nématodes TDP-43(Q331K) sont perdus durant les premiers jours de vie adulte. En effet, certains meurent de façon prématurée tandis que d'autres ont le phénotype de « worm bagging » et sont donc exclus de l'expérience. Il s'agit de l'éclosion des œufs à l'intérieur des nématodes et ceci est généralement provoqué par les bactéries desquelles ils se nourrissent (93). Ce phénotype peut être plus récurrent pour une souche en

particulier, mais la raison reste inconnue. Ainsi, pour contrer cette perte de nématodes et avoir un portrait plus précis de la neurodégénérescence de ce mutant, il serait possible de débiter l'expérience avec plus de nématodes ou de la répéter plus que trois fois. Selon la Figure 13B, il est possible de visualiser que le mutant TDP-43(Q331K) possède davantage de ruptures de fluorescence dans ses projections axonales que les contrôles TDP-43(WT) et WT à jour 1 et 9 de vie adulte. La neurodégénérescence du mutant transgénique a été caractérisée davantage pour investiguer si les ruptures de fluorescence se retrouvaient plus sur la corde ventrale ou dorsale des neurones GABAergiques des nématodes. Selon la Figure 14, les ruptures de fluorescence semblent se retrouver davantage sur la corde ventrale des souches transgéniques TDP-43(WT) et TDP-43(Q331K). Ce résultat ne correspond pas aux évidences cliniques. En effet, la SLA est considérée comme une axonopathie distale voulant dire que la neurodégénérescence débiterait aux extrémités des axones des neurones moteurs, voir même aux JNM (94). Comme mentionné précédemment, les corps cellulaires des neurones moteurs GABAergiques se retrouvent sur la corde ventrale du nématode. Ainsi, pour le modèle transgénique TDP-43(Q331K), la neurodégénérescence débiterait davantage au niveau proximal, proche des corps cellulaires des neurones moteurs GABAergiques. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le transgène est surexprimé spécifiquement dans ce sous-type de neurone engendrant ainsi un phénotype neurodégénératif plus agressif. L'évaluation de l'intégrité des neurones moteurs GABAergiques a également été effectuée pour le modèle endogène TDP-1(R393C). Selon la Figure 15A, le pourcentage de neurodégénérescence de ce dernier augmente de jour 1 à jour 9 de vie adulte, mais est seulement significativement différent du contrôle WT à jour 9. Ceci suggère que la neurodégénérescence apparaît de façon plus tardive dans ce modèle endogène comparativement au modèle transgénique. Selon la Figure 15B, il est possible de visualiser que le mutant TDP-1(R393C) possède davantage de ruptures de fluorescence dans ses projections axonales que le contrôle WT à jour 9 de vie adulte. Selon la Figure 16, la neurodégénérescence du mutant endogène TDP-1(R393C) semble apparaître davantage sur la corde dorsale des nématodes du jour 1 à jour 9 de vie adulte. La corde dorsale correspond aux prolongations des axones partant des corps cellulaires localisés sur la corde ventrale. Cette spécificité dorsale chez

le mutant endogène coïncide avec ce que l'on observe chez les patients; à savoir que la neurodégénérescence de la SLA débute au niveau distal des axones (94).

4.4 L'effet de médicaments pour la SLA sur les modèles mutants TDP-43 et TDP-1

La SLA étant une maladie complexe et multifactorielle, le développement de thérapies efficaces est un défi pour la communauté scientifique. Les seuls médicaments approuvés par la FDA américaine sont le riluzole et l'edaravone (31). Ces deux médicaments semblent être en mesure de ralentir la progression de la maladie et prolonger l'espérance de vie des patients, mais de façon modeste (32). Des essais de paralysie ont été effectués sur le mutant transgénique TDP-43(Q331K) et endogène TDP-1(R393C) pour vérifier si ces modèles répondent efficacement en présence de ces deux médicaments pour la SLA.

Selon la Figure 17, le composé riluzole n'a pas d'effet neuroprotecteur sur les modèles mutants, même que dans certains cas, celui-ci accentue la paralysie des nématodes. Ces résultats sont similaires avec une autre étude dont le riluzole (10 μ M) n'a pas amélioré le taux de paralysie de leur mutant TDP-43(A315T) en milieu liquide (95). D'autres études ont noté un léger effet neuroprotecteur sur leurs modèles de *C. elegans*, mais à une concentration supérieure de riluzole. En effet, à une concentration de 33 μ M, le riluzole a légèrement amélioré des défauts neuromusculaires dans un modèle *C. elegans* d'amyotrophie spinale (nombre de courbure du corps par minute) (96). La vitesse moyenne (mm/sec) d'un modèle de surexpression de TDP-43 pan-neuronal est un peu augmentée lorsque traité avec 100 μ M de riluzole (97). Ainsi, il serait intéressant de refaire des essais de paralysie pour voir si une concentration supérieure de riluzole est requise pour observer un effet neuroprotecteur dans les modèles TDP-43(Q331K) et TDP-1(R393C). Sinon, une autre explication est que l'effet neuroprotecteur du riluzole agit par un autre mécanisme que celui engendré par les protéines TDP-43 et TDP-1 mutantes. En effet, la cible biochimique du riluzole dans les maladies des neurones moteurs est encore inconnue (96). Dans un contexte plus large de modèles de la SLA, une étude a évalué l'effet thérapeutique du riluzole sur un modèle transgénique de rat exprimant la protéine humaine mutante TDP-43(M337V). Par rapport au contrôle, l'administration du riluzole (30 mg/kg/jour) n'a pas modifié les différentes

neuropathologies observées dans ce mutant (98). De plus, une autre étude a évalué l'effet du riluzole (22 mg/kg) sur trois différents modèles de souris SLA : SOD1(G93A), TDP-43(A315T) et FUS(1-359). Le traitement au riluzole n'a pas eu d'effet sur la durée de vie des trois modèles et n'a eu aucun impact significatif sur le déclin des performances motrices des modèles transgéniques FUS(1-359) et SOD1(G93A) (99). Ainsi, la faible efficacité du riluzole sur les modèles TDP-43/TDP-1 de *C. elegans* concorde avec les effets modestes observés dans ces autres modèles de SLA. Étant donné que le riluzole a été approuvé par la FDA en 1995 et que la majorité des modèles de SLA n'étaient pas encore développés, une question se pose quant aux standards utilisés dans les études pré-cliniques qui ont mené à l'approbation de ce médicament pour la SLA. Selon la Figure 18, le composé edaravone possède un effet neuroprotecteur sur les modèles TDP-43(Q331K) et TDP-1(R393C). En effet, le pourcentage de paralysie de ces mutants est significativement réduit lorsqu'ils sont traités avec le composé. Le pourcentage de paralysie des contrôles TDP-43(WT) et WT reste inchangé. Très peu d'articles ont évalué l'effet de l'edaravone sur des modèles de SLA de *C. elegans*. Par contre, ce composé est régulièrement utilisé comme contrôle positif dans le laboratoire. L'exact mécanisme d'action de l'edaravone dans le traitement de la SLA est encore inconnu, mais son effet thérapeutique semble passer par ses propriétés antioxydantes (31). Étant donné que l'edaravone semble efficace uniquement pour les modèles mutants, ceci suggère que la toxicité des protéines mutantes TDP-43/TDP-1 engendre un stress du réticulum endoplasmique (« ER stress ») et que celles-ci auraient possiblement de la difficulté à se replier dans le RE (100, 101). Dans un contexte plus large de modèles de la SLA, une étude a testé l'effet de l'edaravone sur un modèle transgénique de souris SLA exprimant la protéine SOD1(G93A). Les résultats ont montré que l'edaravone réduit les déficits moteurs des souris et préserve les neurones moteurs de la moelle épinière (102). Un autre groupe a testé l'efficacité de l'edaravone avant son approbation par la FDA sur les mêmes modèles mutants de souris SOD1 que précédemment. Les résultats montrent que l'edaravone est efficace pour ralentir le déclin moteur et la dégénérescence des neurones moteurs de ces souris transgéniques (103). Une autre étude a observé l'effet de l'edaravone dans un modèle transgénique de rat SOD1(H46R). Les résultats ont montré que l'edaravone a amélioré significativement les performances des fonctions motrices de ces rats transgéniques (104). Ainsi, l'edaravone possède davantage d'effet

neuroprotecteur sur les modèles de souris et de rats de la SLA comparativement au riluzole. Les résultats obtenus avec les modèles TDP-43/TDP-1 de *C. elegans* concordent avec ces résultats.

4.5 Autre mutation endogène dans *tdp-1*

Un autre modèle TDP-1 a été obtenu par le laboratoire pour s'assurer que pas toutes les mutations dans le gène *tdp-1* résultent en des défauts de motilité et/ou une neurodégénérescence liée à l'âge. La mutation R258C se situe dans le premier domaine de motif de reconnaissance de l'ARN (RRM1) chez le *C. elegans* (Figure 19). Selon la Figure 20, le niveau d'expression de l'ARNm *tdp-1* normalisé par *ama-1* dans ce mutant est sensiblement au même niveau endogène que le contrôle de type sauvage WT. De plus, le niveau d'expression de *tdp-1* de TDP-1(R258C) est presque identique à celui du mutant endogène TDP-1(R393C). Ceci confirme que l'expression du gène en question est au niveau endogène. Que ce soit par les différents paramètres du logiciel WormLab (Figure 21ABC) ou l'essai de paralysie (Figure 21D), la mutation R258C dans TDP-1 n'engendre pas de phénotype moteur. Tout comme le mutant TDP-1(R393C), la mutation R258C n'a pas d'impact sur la durée de vie des nématodes (Figure 21E). Ceci suggère, encore une fois, qu'une seule mutation faux-sens peut ne pas influencer la durée de vie de façon significative. Par contre, selon la Figure 21F, le mutant semble faiblement sensible à l'aldicarbe suggérant de légers défauts de transmission synaptique. Le mutant TDP-1(R258C) ne semble pas présenter une neurodégénérescence liée à l'âge qui n'est pas dû au vieillissement normal des nématodes (Figure 22). De plus, la neurodégénérescence liée au vieillissement normal de TDP-1(R258C) est majoritairement dorsale au niveau des projections axonales tout comme le mutant endogène TDP-1(R393C) (Figure 23). Ceci confirme que l'apparence de la neurodégénérescence prématurée liée à l'âge de TDP-1(R393C) se présente de façon endogène/basale.

Comme mentionné précédemment, TDP-43 contient deux domaines de motif de reconnaissance d'ARN (RRM1 et RRM2) qui sont hautement conservés. Ces domaines possèdent des fonctions distinctes. En effet, RRM1 possède une haute affinité pour l'ARN tandis que RRM2 augmente la spécificité de reconnaissance de l'ARN par RRM1. Une récente étude propose la présence d'un pont salin entre 2 résidus de chaque domaine (Arg151 - Asp247) et ce pont dicterait l'affinité et la spécificité de liaison à l'ARN de TDP-43 (105). Ce groupe a généré par CRISPR-Cas9 un modèle

de *C. elegans* dont la mutation R219A dans le RRM1 de TDP-1 est homologue à celle dans TDP-43 (R151A). Différents paramètres de locomotion du logiciel WormLab (longueur du trajet, longueur d'ondulation et amplitude), ont été significativement réduits chez le mutant TDP-1(R219A) au même niveau qu'un modèle « knockout » *tdp-1(ok803)* (85). Une légère, mais significative, augmentation de la durée de vie des nématodes a également été notée pour TDP-1(R219A) et *tdp-1(ok803)*. Ainsi, leurs données suggèrent que le résidu R219A est nécessaire pour les fonctions de TDP-1 (105). Ces résultats laissent supposer que le résidu R258C, qui est également dans le domaine RRM1, n'est pas nécessaire à l'intégrité du pont salin entre les deux RRM. De plus, il se peut que la mutation R258C dans le domaine RRM1 engendre des problèmes d'affinité, de spécificité et de régulation d'ARN, mais que ceux-ci ne résultent pas en une perte neuronale ou des défauts de motilité dans le modèle TDP-1(R258C).

4.6 Perspectives futures

4.6.1 Transfert de la pathologie de TDP-43

De récentes études suggèrent qu'une protéinopathie pourrait être transférée d'un type cellulaire à un autre et que ceci pourrait être un mécanisme commun pour l'apparition et la progression de plusieurs troubles neurodégénératifs (106-108). Ainsi, étant donné que le modèle transgénique exprime la protéine mutante TDP-43 dans les neurones moteurs GABAergiques uniquement, il serait intéressant d'évaluer si la pathologie de TDP-43 est transférée aux neurones cholinergiques en évaluant la neurodégénérescence de ce dernier type neuronal. Pour le modèle endogène exprimant de façon ubiquitaire la protéine mutante TDP-1, il serait intéressant d'observer par microscopie à fluorescence si les niveaux de neurodégénérescence sont similaires dans les neurones moteurs cholinergiques et GABAergiques. Les modèles ont déjà été croisés avec une souche exprimant une protéine fluorescente dans les neurones cholinergiques (d'une couleur différente que celle exprimée dans les neurones GABAergiques).

4.6.2 Agrégation de TDP-43/TDP-1

Comme mentionné précédemment, l'agrégation cytoplasmique de TDP-43 est une des causes de la neurodégénérescence observée dans les neurones moteurs des patients SLA (38). Des modèles *in vitro* exprimant la protéine TDP-43 recombinante arborant des mutations liées à l'ALS, dont Q331K, ont montré avoir une agrégation accrue favorisant ainsi la cytotoxicité dans les cellules (26, 109). Un futur objectif du projet pourrait être d'analyser les conséquences de l'expression des protéines mutantes TDP-43/TDP-1 sur l'agrégation dans les modèles *in vivo*. Pour ce faire, un «Filter Retardation Assay » pourrait être envisagé. Cette méthode est similaire à l'immunobuvardage de type Western excepté que les agrégats protéiques résistants au SDS (dodécyl sulfate de sodium) sont filtrés et retenus par une membrane de cellulose. Là où les protéines d'intérêts sont ensuite détectées à l'aide d'AC spécifiques (110). Cette technique ne devrait pas causer de problèmes pour le modèle transgénique puisque des AC spécifiques contre la protéine humaine TDP-43 sont accessibles. Par contre, très peu d'AC contre les protéines de *C. elegans* TDP-1 sont disponibles. Ainsi, une autre perspective serait de générer des AC pour des fragments spécifiques de TDP-1. Il serait également possible de traiter les modèles TDP-43 et TDP-

1 avec des inhibiteurs d'agrégation, comme le bleu de méthylène, pour observer leurs impacts sur les phénotypes des modèles (111). En effet, le bleu de méthylène, faisant partie de la famille des phénothiazines, a restauré des phénotypes toxiques comme un dysfonctionnement neuronal dans un mutant TDP-43 (95). Si le traitement à ce composé améliore l'intégrité du système nerveux des mutants TDP-43(Q331K) et TDP-1(R393C), ceci suggérerait que la toxicité proviendrait, du moins en partie, de l'agrégation protéique.

4.6.3 Interactions génétiques

Comme mentionné précédemment, plusieurs gènes ont été associés avec le spectre des troubles SLA-DFT (*FUS*, *SOD-1*, *C9orf72*, *TARDBP*, *MAPT*, etc). Une perspective intéressante serait de tester comment tous ces gènes SLA-DFT se modifient entre eux (112). Pour ce faire, étant donné que le mutant endogène TDP-1 semble être un modèle physiologiquement représentatif de la maladie, il serait possible de le croiser avec d'autres souches CRISPR-Cas9 ayant des mutations dans des gènes endogènes de *C. elegans* (*fust-1*, *sod-1*, *alfa-1*, *ptl-1*, etc). Ainsi, ces croisements permettront de vérifier s'il y a des interactions génétiques entre ces gènes et d'évaluer leurs effets sur les phénotypes observables (113).

4.6.4 Étude des dérégulations de TDP-43/TDP-1

Les modèles mutants TDP-43 et TDP-1 permettront d'étudier les différentes dérégulations causées par ces protéines dans la SLA (Figure 25). Étant donné que les fonctions de TDP-43 et TDP-1 sont similaires, ceci peut s'appliquer pour la protéine orthologue du *C. elegans* également. Ces mutants peuvent servir à examiner l'assemblage anormal de granules de stress, la mauvaise régulation de l'autophagie, la formation et l'agrégation toxiques de fragments C-terminal, l'altération du processus d'endocytose, l'inhibition de la voie endolysosomale ou encore la perturbation de la dynamique de la chromatine empêchant l'expression des protéines de choc thermique (26).

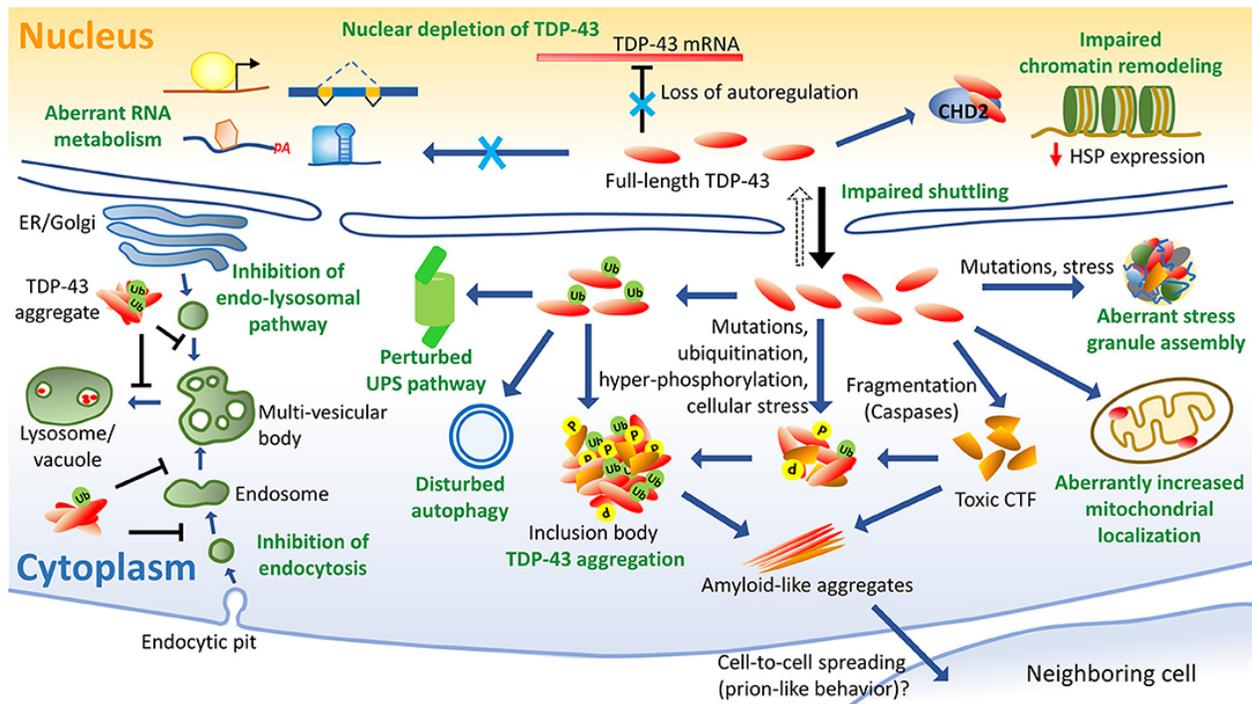


Figure 25. – Schématisation des différentes pathologies induites par TDP-43.

Plusieurs dérégulations cellulaires de TDP-43 ont été associées à la SLA, comme la perte de localisation nucléaire qui déstabilise le métabolisme normal de l'ARN et mène à une baisse de l'autorégulation des niveaux de TDP-43 (26).

4.6.5 La voie de signalisation de l'insuline

Plusieurs études ont établi un lien entre TDP-43/TDP-1 et la voie de signalisation de l'insuline/IGF-1 qui est hautement conservée à travers les espèces (66, 85). Chez le *C. elegans*, cette voie est impliquée dans le métabolisme, le développement, la résistance, la fécondité, la résistance au stress cellulaire et la longévité des nématodes (85). La longévité des nématodes est partiellement médiée par le facteur de transcription en aval de la voie de signalisation, DAF-16, qui lui est régulé négativement par le récepteur insuline-IGF-1, DAF-2 (Figure 26) (66). Lorsque *daf-2* est muté, DAF-16 est constitutivement activé et la vie moyenne de ces nématodes est doublée (114). Étant donné que le mutant TDP-43(Q331K) possède une durée de vie diminuée, il est possible que la protéine mutante ait un impact sur la voie de signalisation de l'insuline. Il serait possible de croiser ce modèle avec le mutant *daf-2* qui augmente la durée de vie. Suite au croisement, si l'espérance de vie des nématodes augmente, ceci suggère que la voie de signalisation de l'insuline est

impliquée dans la toxicité de TDP-43. De plus, une étude propose que des perturbations de la voie de signalisation de l'insuline affectent la fertilité et le développement embryonnaire des *C. elegans* (115). Le possible lien entre cette voie de signalisation et la toxicité de TDP-43 est d'autant plus intéressant puisque le nombre de progénitures est considérablement diminué chez le mutant TDP-43(Q331K) (résultats non montrés).

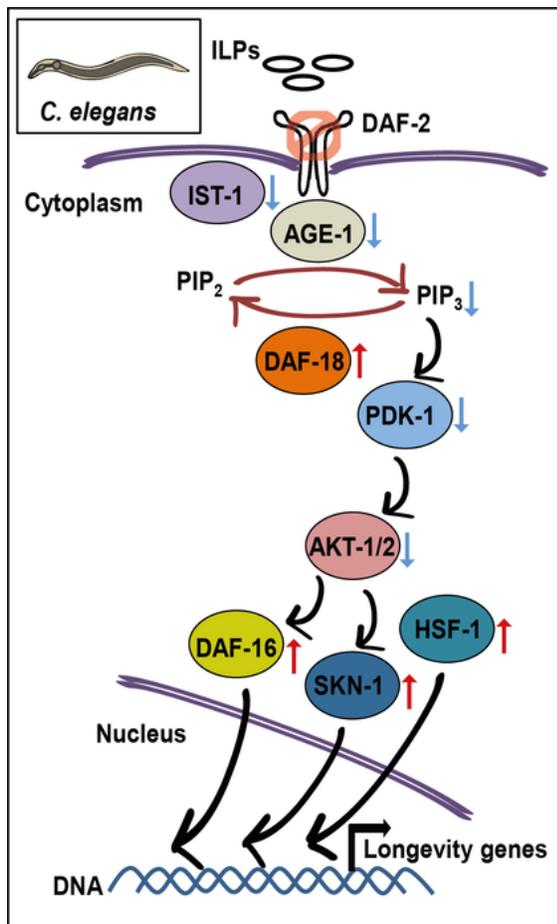


Figure 26. – Composantes régulatrices conservées de la longévité de la voie de signalisation de l'insuline/IGF-1 chez *C. elegans*.

Les peptides de type insuline se lient au récepteur insuline/IGF-1 DAF-2 ce qui mène à sa phosphorylation. L'inhibition du récepteur DAF-2 diminue la liaison au substrat du récepteur insuline IST-1 ce qui diminue l'activité de la kinase AGE-1 qui convertit le PIP₂ en PIP₃. La phosphatase DAF-18 possède l'activité inverse, soit de convertir le PIP₃ en PIP₂. Des niveaux bas de PIP₃ entraînent une diminution de l'activité des kinases PDK-1 et AKT-1/2 ce qui active le facteur de transcription DAF-16. La réduction de la signalisation de cette voie augmente aussi l'activité des facteurs de transcription de choc thermique HSF-1 et SKN-1 qui eux, régulent l'expression des gènes cibles responsables de la longévité. Figure adaptée de (116).

4.6.6 Criblage de molécules thérapeutiques

Il serait intéressant d'effectuer un criblage de molécules sur les mutants TDP-43 et TDP-1 pour être en mesure d'identifier des modificateurs positifs et négatifs de ces modèles. Ceux ayant un effet thérapeutique sur les mutants pourront servir de guide pour identifier des mécanismes ou voies de signalisation qui sont impliqués dans la toxicité de ces protéines. Les meilleures cibles pourront ensuite être validées dans d'autres organismes modèles de la SLA comme le poisson-zèbre, la souris, le rat, etc (37). Ceci dans le but de développer des stratégies thérapeutiques pour les patients atteints de la SLA.

Chapitre 5 – Conclusion

En conclusion, selon les deux objectifs proposés, ces nouveaux modèles de *C. elegans* transgéniques TDP-43(Q331K) et endogènes TDP-1(R393C) peuvent récapituler plusieurs aspects phénotypiques clés de la SLA tels que des déficits moteurs, une transmission synaptique altérée, une neurodégénérescence liée à l'âge générant une paralysie et une durée de vie diminuée (uniquement pour le modèle transgénique).

La souche transgénique est le premier modèle *C. elegans* de la SLA qui exprime la protéine humaine mutante TDP-43(Q331K) dans les neurones moteurs GABAergiques. Ce modèle semble arborer un phénotype de motilité plus fort, et ce, même au début de l'âge adulte. Ceci suggère que TDP-43(Q331K) serait un bon modèle pour le dépistage génétique de médicaments pour la SLA. Le modèle endogène de *C. elegans* exprimant de manière ubiquitaire la protéine mutante TDP-1(R393C) semble posséder un phénotype moteur plus subtil qui tend à augmenter en intensité avec le temps. Ce mutant reflète davantage les phénotypes pathologiques observés chez les patients atteints de la SLA.

Ces modèles TDP-43/TDP-1 procurent une expression physiologique différente des protéines mutantes et donc, des phénotypes de niveaux d'intensités variables.

Ainsi, l'hypothèse de recherche stipulant que par sa mutation dans un gène endogène, l'absence de surexpression et l'expression ubiquitaire de la protéine TDP-1, le mutant endogène reflétera plus précisément l'expression physiologique du gène dans la maladie humaine est confirmée.

Ces nouveaux modèles transgéniques et endogènes seront disponibles pour la communauté de recherche. Ils constitueront des outils utiles pour élucider de nouveaux mécanismes pathogéniques de la SLA ainsi que de bons candidats pour le criblage génétique et le développement de stratégies thérapeutiques.

Références bibliographiques

1. Gitler AD, Dhillon P, Shorter J. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Disease models & mechanisms*. 2017;10(5):499-502. Epub 2017/05/05.
2. Goetz CG. Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle & nerve*. 2000;23(3):336-43. Epub 2000/02/19.
3. Pochet R. Genetics and ALS: Cause for Optimism. *Cerebrum : the Dana forum on brain science*. 2017;2017. Epub 2017/07/13.
4. Jensen L, Jørgensen LH, Bech RD, Frandsen U, Schrøder HD. Skeletal Muscle Remodelling as a Function of Disease Progression in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5930621. Epub 2016/05/20.
5. Oskarsson B, Gendron TF, Staff NP. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. *Mayo Clin Proc*. 2018;93(11):1617-28. Epub 2018/11/08.
6. Tao QQ, Wu ZY. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Precise Diagnosis and Individualized Treatment. *Chin Med J (Engl)*. 2017;130(19):2269-72. Epub 2017/09/25.
7. Bali T, Miller TM. Management of amyotrophic lateral sclerosis. *Mo Med*. 2013;110(5):417-21. Epub 2013/11/28.
8. Taylor JP, Brown RH, Jr., Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*. 2016;539(7628):197-206. Epub 2016/11/11.
9. Arthur KC, Calvo A, Price TR, Geiger JT, Chiò A, Traynor BJ. Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nat Commun*. 2016;7:12408. Epub 2016/08/12.
10. Hodgkinson VL, Lounsberry J, Mirian A, Genge A, Benstead T, Briemberg H, et al. Provincial Differences in the Diagnosis and Care of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Can J Neurol Sci*. 2018;45(6):652-9. Epub 2018/11/16.

11. Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamirano PF, et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg Neurol Int.* 2015;6:171-.
12. Ingre C, Roos PM, Piehl F, Kamel F, Fang F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Epidemiol.* 2015;7:181-93.
13. Martin S, Al Khleifat A, Al-Chalabi A. What causes amyotrophic lateral sclerosis? *F1000Res.* 2017;6:371. Epub 2017/04/15.
14. Shellikeri S, Karthikeyan V, Martino R, Black SE, Zinman L, Keith J, et al. The neuropathological signature of bulbar-onset ALS: A systematic review. *Neuroscience and biobehavioral reviews.* 2017;75:378-92. Epub 2017/02/07.
15. Galvin M, Gaffney R, Corr B, Mays I, Hardiman O. From first symptoms to diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: perspectives of an Irish informal caregiver cohort-a thematic analysis. *BMJ open.* 2017;7(3):e014985. Epub 2017/03/23.
16. Ferrari R, Kapogiannis D, Huey ED, Momeni P. FTD and ALS: a tale of two diseases. *Current Alzheimer research.* 2011;8(3):273-94. Epub 2011/01/13.
17. Ji AL, Zhang X, Chen WW, Huang WJ. Genetics insight into the amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia spectrum. *Journal of medical genetics.* 2017;54(3):145-54. Epub 2017/01/15.
18. Shi Y, Lin S, Staats KA, Li Y, Chang WH, Hung ST, et al. Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. *Nature medicine.* 2018;24(3):313-25. Epub 2018/02/06.
19. Balendra R, Isaacs AM. C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nat Rev Neurol.* 2018;14(9):544-58. Epub 2018/08/19.
20. Banci L, Bertini I, Boca M, Girotto S, Martinelli M, Valentine JS, et al. SOD1 and amyotrophic lateral sclerosis: mutations and oligomerization. *PLoS One.* 2008;3(2):e1677. Epub 2008/02/28.

21. Pansarasa O, Bordoni M, Diamanti L, Sproviero D, Gagliardi S, Cereda C. SOD1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis: "Ambivalent" Behavior Connected to the Disease. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(5). Epub 2018/05/13.
22. Moller A, Bauer CS, Cohen RN, Webster CP, De Vos KJ. Amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant SOD1 inhibits anterograde axonal transport of mitochondria by reducing Miro1 levels. *Human molecular genetics*. 2017;26(23):4668-79. Epub 2017/10/04.
23. Valdmanis PN, Daoud H, Dion PA, Rouleau GA. Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2009;9(3):198-205.
24. Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, Bird TD, Yuan W, Elman LB, et al. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *The Lancet Neurology*. 2008;7(5):409-16. Epub 2008/04/09.
25. Scotter EL, Chen HJ, Shaw CE. TDP-43 Proteinopathy and ALS: Insights into Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics*. 2015;12(2):352-63. Epub 2015/02/06.
26. Prasad A, Bharathi V, Sivalingam V, Girdhar A, Patel BK. Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:25. Epub 2019/03/07.
27. Blair IP, Williams KL, Warraich ST, Durnall JC, Thoeng AD, Manavis J, et al. FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81(6):639-45. Epub 2009/12/08.
28. Efimova AD, Ovchinnikov RK, Roman AY, Maltsev AV, Grigoriev VV, Kovrazhkina EA, et al. [The FUS protein: Physiological functions and a role in amyotrophic lateral sclerosis]. *Mol Biol (Mosk)*. 2017;51(3):387-99. Epub 2017/07/15.
29. Ishigaki S, Sobue G. Importance of Functional Loss of FUS in FTL/ALS. *Frontiers in molecular biosciences*. 2018;5:44. Epub 2018/05/19.

30. Shang Y, Huang EJ. Mechanisms of FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research*. 2016;1647:65-78. Epub 2016/04/02.
31. Cruz MP. Edaravone (Radicava): A Novel Neuroprotective Agent for the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*. 2018;43(1):25-8. Epub 2018/01/02.
32. Abe K, Itoyama Y, Sobue G, Tsuji S, Aoki M, Doyu M, et al. Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*. 2014;15(7-8):610-7. Epub 2014/10/07.
33. Hinchcliffe M, Smith A. Riluzole: real-world evidence supports significant extension of median survival times in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Degener Neurol Neuromuscul Dis*. 2017;7:61-70. Epub 2017/05/29.
34. Lu H, Le WD, Xie YY, Wang XP. Current Therapy of Drugs in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current neuropharmacology*. 2016;14(4):314-21. Epub 2016/01/21.
35. Bissaro M, Moro S. Rethinking to riluzole mechanism of action: the molecular link among protein kinase CK1 δ activity, TDP-43 phosphorylation, and amyotrophic lateral sclerosis pharmacological treatment. *Neural Regen Res*. 2019;14(12):2083-5. Epub 2019/08/10.
36. Breiner A, Zinman L, Bourque PR. Edaravone for amyotrophic lateral sclerosis: barriers to access and lifeboat ethics. *Cmaj*. 2020;192(12):E319-e20. Epub 2020/05/12.
37. Patten SA, Aggad D, Martinez J, Tremblay E, Petrillo J, Armstrong GA, et al. Neuroleptics as therapeutic compounds stabilizing neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *JCI Insight*. 2017;2(22). Epub 2017/12/05.
38. Hergesheimer RC, Chami AA, de Assis DR, Vourc'h P, Andres CR, Corcia P, et al. The debated toxic role of aggregated TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis: a resolution in sight? *Brain : a journal of neurology*. 2019;142(5):1176-94. Epub 2019/04/03.

39. Gendron TF, Rademakers R, Petrucelli L. TARDBP mutation analysis in TDP-43 proteinopathies and deciphering the toxicity of mutant TDP-43. *J Alzheimers Dis.* 2013;33 Suppl 1(Suppl 1):S35-45. Epub 2012/07/04.
40. Kwong LK, Uryu K, Trojanowski JQ, Lee VM. TDP-43 proteinopathies: neurodegenerative protein misfolding diseases without amyloidosis. *Neurosignals.* 2008;16(1):41-51. Epub 2007/12/22.
41. Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Bennett CF, Cleveland DW, Yeo GW. Misregulated RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* 2012;1462:3-15. Epub 2012/03/27.
42. François-Moutal L, Perez-Miller S, Scott DD, Miranda VG, Mollasalehi N, Khanna M. Structural Insights Into TDP-43 and Effects of Post-translational Modifications. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:301. Epub 2020/01/11.
43. Neumann M, Kwong LK, Lee EB, Kremmer E, Flatley A, Xu Y, et al. Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. *Acta Neuropathologica.* 2009;117(2):137-49.
44. Dammer EB, Fallini C, Gozal YM, Duong DM, Rossoll W, Xu P, et al. Coaggregation of RNA-binding proteins in a model of TDP-43 proteinopathy with selective RGG motif methylation and a role for RRM1 ubiquitination. *PLoS One.* 2012;7(6):e38658. Epub 2012/07/05.
45. Nigon VM, Felix MA. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook : the online review of C elegans biology.* 2017;2017:1-84. Epub 2017/03/23.
46. Goldstein B. Sydney Brenner on the Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 2016;204(1):1-2. Epub 2016/09/08.
47. Altun ZF, Hall DH. Introduction To *C. elegans* Anatomy. *WormAtlas.* 2009.

48. Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. 1977;56(1):110-56. Epub 1977/03/01.
49. Johnson TE, Wood WB. Genetic analysis of life-span in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(21):6603-7. Epub 1982/11/01.
50. Shaye DD, Greenwald I. OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS one*. 2011;6(5):e20085. Epub 2011/06/08.
51. Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006;5(5):387-99.
52. Markaki M, Tavernarakis N. Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Biotechnol J*. 2010;5(12):1261-76. Epub 2010/12/15.
53. White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1986;314(1165):1-340. Epub 1986/11/12.
54. Altun ZF, Hall DH. Nervous system, general description. *WormAtlas*. 2011.
55. Hall DH, Lints R, Altun Z. Nematode neurons: anatomy and anatomical methods in *Caenorhabditis elegans*. *Int Rev Neurobiol*. 2006;69:1-35. Epub 2006/02/24.
56. Gendrel M, Atlas EG, Hobert O. A cellular and regulatory map of the GABAergic nervous system of *C. elegans*. *eLife*. 2016;5. Epub 2016/10/16.
57. Schuske K, Beg AA, Jorgensen EM. The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends Neurosci*. 2004;27(7):407-14. Epub 2004/06/29.
58. Align Sequence Protein BLAST: NCBI. Disponible: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq

59. Zhang T, Hwang HY, Hao H, Talbot C, Jr., Wang J. Caenorhabditis elegans RNA-processing protein TDP-1 regulates protein homeostasis and life span. *J Biol Chem*. 2012;287(11):8371-82. Epub 2012/01/11.
60. Gene tdp-1: WormBase. Disponible: https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00006514#0d-j1634e7-10
61. Multiple Sequence Alignment: Clustal Omega. Disponible: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=clustalo-l20201120-223720-0452-11490405-p2m&showColors=true&tool=clustalo>
62. Mitra J, Guerrero EN, Hegde PM, Liachko NF, Wang H, Vasquez V, et al. Motor neuron disease-associated loss of nuclear TDP-43 is linked to DNA double-strand break repair defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(10):4696-705. Epub 2019/02/17.
63. Gidalevitz T, Krupinski T, Garcia S, Morimoto RI. Destabilizing Protein Polymorphisms in the Genetic Background Direct Phenotypic Expression of Mutant SOD1 Toxicity. *PLOS Genetics*. 2009;5(3):e1000399.
64. Wang J, Farr GW, Hall DH, Li F, Furtak K, Dreier L, et al. An ALS-linked mutant SOD1 produces a locomotor defect associated with aggregation and synaptic dysfunction when expressed in neurons of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*. 2009;5(1):e1000350. Epub 2009/01/24.
65. Baskoylu SN, Yersak J, O'Hern P, Grosser S, Simon J, Kim S, et al. Single copy/knock-in models of ALS SOD1 in *C. elegans* suggest loss and gain of function have different contributions to cholinergic and glutamatergic neurodegeneration. *PLoS Genet*. 2018;14(10):e1007682. Epub 2018/10/09.
66. Zhang T, Mullane PC, Periz G, Wang J. TDP-43 neurotoxicity and protein aggregation modulated by heat shock factor and insulin/IGF-1 signaling. *Hum Mol Genet*. 2011;20(10):1952-65. Epub 2011/03/01.

67. Liachko NF, Guthrie CR, Kraemer BC. Phosphorylation promotes neurotoxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of TDP-43 proteinopathy. *J Neurosci*. 2010;30(48):16208-19. Epub 2010/12/03.
68. Vaccaro A, Tauffenberger A, Aggad D, Rouleau G, Drapeau P, Parker JA. Mutant TDP-43 and FUS Cause Age-Dependent Paralysis and Neurodegeneration in *C. elegans*. *PloS one*. 2012;7(2):e31321.
69. Murakami T, Yang SP, Xie L, Kawano T, Fu D, Mukai A, et al. ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in *Caenorhabditis elegans* by a dominant gain-of-function mechanism. *Human molecular genetics*. 2012;21(1):1-9. Epub 2011/09/29.
70. Rudich P, Snoznik C, Watkins SC, Monaghan J, Pandey UB, Lamitina ST. Nuclear localized C9orf72-associated arginine-containing dipeptides exhibit age-dependent toxicity in *C. elegans*. *Human molecular genetics*. 2017;26(24):4916-28. Epub 2017/10/17.
71. Monahan ZT, Rhoads SN, Yee DS, Shewmaker FP. Yeast Models of Prion-Like Proteins That Cause Amyotrophic Lateral Sclerosis Reveal Pathogenic Mechanisms. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2018;11:453. Epub 2019/01/09.
72. Zhang K, Coyne AN, Lloyd TE. *Drosophila* models of amyotrophic lateral sclerosis with defects in RNA metabolism. *Brain research*. 2018;1693(Pt A):109-20. Epub 2018/05/13.
73. Morrice JR, Gregory-Evans CY, Shaw CA. Animal models of amyotrophic lateral sclerosis: A comparison of model validity. *Neural regeneration research*. 2018;13(12):2050-4. Epub 2018/10/17.
74. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*. 2006:1-11. Epub 2007/12/01.
75. Thompson O, Edgley M, Strasbourger P, Flibotte S, Ewing B, Adair R, et al. The million mutation project: a new approach to genetics in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res*. 2013;23(10):1749-62. Epub 2013/06/27.

76. McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*. 1997;389(6653):870-6. Epub 1997/12/31 23:16.
77. Rogalski TM, Riddle DL. A *Caenorhabditis elegans* RNA polymerase II gene, *ama-1 IV*, and nearby essential genes. *Genetics*. 1988;118(1):61-74. Epub 1988/01/01.
78. Oh KH, Kim H. Aldicarb-induced Paralysis Assay to Determine Defects in Synaptic Transmission in *Caenorhabditis elegans*. *Bio Protoc*. 2017;7(14). Epub 2017/09/05.
79. Qian H, Robertson AP, Powell-Coffman JA, Martin RJ. Levamisole resistance resolved at the single-channel level in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb j*. 2008;22(9):3247-54. Epub 2008/06/04.
80. Mariol MC, Walter L, Bellemin S, Gieseler K. A rapid protocol for integrating extrachromosomal arrays with high transmission rate into the *C. elegans* genome. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013(82):e50773. Epub 2014/01/01.
81. Noma K, Jin Y. Rapid Integration of Multi-copy Transgenes Using Optogenetic Mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda, Md)*. 2018;8(6):2091-7. Epub 2018/04/25.
82. Gene `snb-1`: WormBase. Disponible: https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00004897#0d-j1634e7-10
83. Prelich G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*. 2012;190(3):841-54. Epub 2012/03/16.
84. Saldi TK, Ash PE, Wilson G, Gonzales P, Garrido-Lecca A, Roberts CM, et al. TDP-1, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of TDP-43, limits the accumulation of double-stranded RNA. *Embo j*. 2014;33(24):2947-66. Epub 2014/11/14.
85. Vaccaro A, Tauffenberger A, Ash PEA, Carlomagno Y, Petrucelli L, Parker JA. TDP-1/TDP-43 Regulates Stress Signaling and Age-Dependent Proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genetics*. 2012;8(7):e1002806.

86. Philip NS, Escobedo F, Bahr LL, Berry BJ, Wojtovich AP. Mos1 Element-Mediated CRISPR Integration of Transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)*. 2019;9(8):2629-35. Epub 2019/06/13.
87. Moerman DG, Waterston, R. H. The Million Mutation Project. Disponible: <http://genome.sfu.ca/mmp/>
88. Silva-García CG, Lanjuin A, Heintz C, Dutta S, Clark NM, Mair WB. Single-Copy Knock-In Loci for Defined Gene Expression in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)*. 2019;9(7):2195-8. Epub 2019/05/09.
89. Transformation and microinjection. The *C. elegans* Research Community [modifié le April 6, 2006]. Disponible: <http://www.wormbook.org>
90. Li J, Huang K-x, Le W-d. Establishing a novel *C. elegans* model to investigate the role of autophagy in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013;34(5):644-50.
91. Duerr J. Immunohistochemistry. *WormBook*; 19 juin 2006. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19743/>
92. Kowalski J. Synaptic Transmission at the *C. elegans* Neuromuscular Junction: 2019. Disponible: <https://research.butler.edu/jennifer-kowalski-lab/research/>
93. Mosser T, Matic I, Leroy M. Bacterium-induced internal egg hatching frequency is predictive of life span in *Caenorhabditis elegans* populations. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(22):8189-92. Epub 2011/09/20.
94. Moloney EB, de Winter F, Verhaagen J. ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. *Front Neurosci*. 2014;8:252. Epub 2014/09/02.
95. Vaccaro A, Patten SA, Ciura S, Maios C, Therrien M, Drapeau P, et al. Methylene blue protects against TDP-43 and FUS neuronal toxicity in *C. elegans* and *D. rerio*. *PLoS One*. 2012;7(7):e42117. Epub 2012/08/01.

96. Dimitriadi M, Kye MJ, Kalloo G, Yersak JM, Sahin M, Hart AC. The neuroprotective drug riluzole acts via small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels to ameliorate defects in spinal muscular atrophy models. *J Neurosci*. 2013;33(15):6557-62. Epub 2013/04/12.
97. Ikenaka K, Tsukada Y, Giles AC, Arai T, Nakadera Y, Nakano S, et al. A behavior-based drug screening system using a *Caenorhabditis elegans* model of motor neuron disease. *Sci Rep*. 2019;9(1):10104. Epub 2019/07/14.
98. Chen S, Liao Q, Lu K, Zhou J, Huang C, Bi F. Riluzole Exhibits No Therapeutic Efficacy on a Transgenic Rat model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Neurovasc Res*. 2020;17(3):275-85. Epub 2020/04/10.
99. Hogg MC, Halang L, Woods I, Coughlan KS, Prehn JHM. Riluzole does not improve lifespan or motor function in three ALS mouse models. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2018;19(5-6):438-45. Epub 2017/12/10.
100. Vaccaro A, Patten SA, Aggad D, Julien C, Maios C, Kabashi E, et al. Pharmacological reduction of ER stress protects against TDP-43 neuronal toxicity in vivo. *Neurobiol Dis*. 2013;55:64-75. Epub 2013/04/10.
101. Lin JH, Walter P, Yen TS. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:399-425. Epub 2007/11/28.
102. Sawada H. Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Pharmacother*. 2017;18(7):735-8. Epub 2017/04/14.
103. Ito H, Wate R, Zhang J, Ohnishi S, Kaneko S, Ito H, et al. Treatment with edaravone, initiated at symptom onset, slows motor decline and decreases SOD1 deposition in ALS mice. *Exp Neurol*. 2008;213(2):448-55. Epub 2008/08/23.
104. Aoki M, Warita H, Mizuno H, Suzuki N, Yuki S, Itoyama Y. Feasibility study for functional test battery of SOD transgenic rat (H46R) and evaluation of edaravone, a free radical scavenger. *Brain Res*. 2011;1382:321-5. Epub 2011/02/01.

105. Flores BN, Li X, Malik AM, Martinez J, Beg AA, Barmada SJ. An Intramolecular Salt Bridge Linking TDP43 RNA Binding, Protein Stability, and TDP43-Dependent Neurodegeneration. *Cell Rep.* 2019;27(4):1133-50.e8. Epub 2019/04/25.
106. Guo JL, Lee VM. Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat Med.* 2014;20(2):130-8. Epub 2014/02/08.
107. Porta S, Xu Y, Restrepo CR, Kwong LK, Zhang B, Brown HJ, et al. Patient-derived frontotemporal lobar degeneration brain extracts induce formation and spreading of TDP-43 pathology in vivo. *Nat Commun.* 2018;9(1):4220. Epub 2018/10/13.
108. Hanspal MA, Dobson CM, Yerbury JJ, Kumita JR. The relevance of contact-independent cell-to-cell transfer of TDP-43 and SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(11):2762-71. Epub 2017/07/18.
109. Johnson BS, Snead D, Lee JJ, McCaffery JM, Shorter J, Gitler AD. TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity. *J Biol Chem.* 2009;284(30):20329-39. Epub 2009/05/26.
110. Sin O, Mata-Cabana A, Seinstra RI, Nollen EAA. Filter Retardation Assay for Detecting and Quantifying Polyglutamine Aggregates Using *Caenorhabditis elegans* Lysates. *Bio-protocol.* 2018;8(19):e3042.
111. Chen X, Barclay JW, Burgoyne RD, Morgan A. Using *C. elegans* to discover therapeutic compounds for ageing-associated neurodegenerative diseases. *Chemistry Central Journal.* 2015;9(1):65.
112. Abramzon YA, Fratta P, Traynor BJ, Chia R. The Overlapping Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Front Neurosci.* 2020;14:42. Epub 2020/03/03.
113. Therrien M, Parker JA. Deciphering genetic interactions between ALS genes using *C. elegans*. *Worm.* 2014;3:e29047. Epub 2014/09/26.

114. Halaschek-Wiener J, Khattra JS, McKay S, Pouzyrev A, Stott JM, Yang GS, et al. Analysis of long-lived *C. elegans* *daf-2* mutants using serial analysis of gene expression. *Genome Res.* 2005;15(5):603-15. Epub 2005/04/20.
115. Tissenbaum HA, Ruvkun G. An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1998;148(2):703-17. Epub 1998/03/20.
116. Altıntaş Ö, Park S, Lee S-J. The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB reports.* 2015;49.

Annexes

1. Souches de *C. elegans* utilisées

Tableau 3. – Liste des noms et génotypes des différentes souches.

Nom de la souche	Souche initiale/ croisement	Nom utilisé dans le mémoire	Génotype
PD1074	N2	WT	<i>Wild-type</i>
XQ106		unc-47 ::GFP	<i>unc-47p::GFP</i>
XQ820	XQ360	unc-47::mCherry	<i>unc-17p::GFP; unc-47p::mCherry</i>
XQ771		TDP-43(Q331K)	<i>unc-119(ed3); xqls771(myo-2::mCherry; unc-47p::TDP-43(Q331K);unc-119(+))</i>
XQ774		TDP-43(WT)	<i>unc-119(ed3); xqls774(myo-2::mCherry; unc-47p::TDP-43(WT);unc-119(+));unc-47p::GFP</i>
XQ777	XQ781;XQ360	TDP-1(R393C);unc-47::mCherry	<i>tdp-1(gk736460);unc-47p::mCherry</i>
XQ778		TDP-1(R258C)	<i>tdp-1(gk149996)</i>
XQ781		TDP-1(R393C)	<i>tdp-1(gk736460)</i>
XQ795	XQ771;XQ106	TDP-43(Q331K);unc-47::GFP	<i>unc-119(ed3); xqls771(myo-2::mCherry; unc-47p::TDP-43(Q331K);unc-119(+));unc-47p::GFP</i>
XQ797	XQ778;XQ360	TDP-1(R258C);unc-47::mCherry	<i>tdp-1(gk149996);unc-47p::mCherry</i>
XQ841	PHX1905	crTDP-1(R258C)	<i>tdp-1(syb1905)</i>
XQ835	PHX1989	crTDP-1(R393C)	<i>tdp-1(syb1989)</i>

2. Amorces

Tableau 4. – Amorces utilisées pour le séquençage.

TDP-43(WT) &	Sens	5'- GTC TCT TTG TGG AGA GGA CTT GAT C -3'
TDP-43(Q331K)	Anti-sens	5'- GGT TTG GCT CCC TCT GCA TG -3'
TDP-1(R393C) &	Sens	5'- TGC TAC TGG TTT GAA GTA C -3'
TDP-1(R258C)	Anti-sens	5'- CCT CTT GTC TTA CCA ATT CT -3'
crTDP-1(R393C)	Sens	5'- AGG CTT TGC ATT CGT TAC GC -3'
	Anti-sens	5'- ACA CGA GTT CCG AGG TTG CC -3'
crTDP-1(R258C)	Sens	5'- CCA GTT GAC CTC ATC GTG CT -3'
	Anti-sens	5'- GTA ATC TTG TGG TGG GCG GA -3'

Tableau 5. – Amorces utilisées pour le génotypage (PCR ou HRM).

TDP-43(WT) &	Sens	5'- GTC TCT TTG TGG AGA GGA CTT GAT C -3'
TDP-43(Q331K)	Anti-sens	5'- GGT TTG GCT CCC TCT GCA TG -3'
TDP-1(R393C) &	Sens	5'- AAA TGA AGC ACC TCT GCC CAT G -3'
crTDP-1(R393C)	Anti-sens	5'- GAG AGA ATC ACC ATC CTG GT -3'
TDP-1(R258C) &	Sens	5'- TTG AGC AGA CTT TGC AGG -3'
crTDP-1(R258C)	Anti-sens	5'- CTA CTT TGT CTG TGA GCC TTC C -3'