

Université de Montréal

Développement de modèles *C. elegans* de Sclérose Latérale Amyotrophique

par
Alexandra Vaccaro

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de Maître en
Pathologie et Biologie Cellulaire

Décembre, 2011

© Alexandra Vaccaro, 2011
Université de Montréal

Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :
Développement de modèles *C.elegans* de Sclérose Latérale Amyotrophique

présenté par :
Alexandra Vaccaro

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Christine Vande Velde
président-rapporteur

Dr. J. Alex Parker
directeur de recherche

Dr. Jean-Claude Labbé
membre du jury

Résumé

Les gènes TDP-43 (TAR DNA Binding Protein 43) et FUS/TLS (Fused in Sarcoma/Translocated in Liposarcoma) sont actuellement à l'étude quant à leurs rôles biologiques dans le développement de diverses neuropathies telles que la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Étant donné que TDP-43 et FUS sont conservés au cours de l'évolution, nous avons utilisé l'organisme modèle *C. elegans* afin d'étudier leurs fonctions biologiques. Dans ce mémoire, nous démontrons que TDP-1 fonctionne dans la voie de signalisation Insuline/IGF pour réguler la longévité et la réponse au stress oxydatif. Nous avons développé des lignées *C. elegans* transgéniques mutantes TDP-43 et FUS qui présentent certains aspects de la SLA tels que la dégénérescence des motoneurons et la paralysie adulte. La protéotoxicité causée par ces mutations de TDP-43 et FUS associées à la SLA, induit l'expression de TDP-1. À l'inverse, la délétion de *tdp-1* endogène protège contre la protéotoxicité des mutants TDP-43 et FUS chez *C. elegans*. Ces résultats suggèrent qu'une induction chronique de TDP-1/TDP-43 sauvage propagerait la protéotoxicité liée à la protéine mutante. Nous avons aussi entrepris un criblage moléculaire pilote afin d'isoler des suppresseurs de toxicité neuronale des modèles transgéniques mutants TDP-43 et FUS. Nous avons ainsi identifié le bleu de méthylène et le salubrinal comme suppresseurs potentiels de toxicité liée à TDP-43 et FUS via réduction de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE). Nos résultats indiquent que l'homéostasie de repliement des protéines dans le RE représente une cible pour le développement de thérapies pour les maladies neurodégénératives.

Mots Clés

C. elegans, TDP-43, TDP-1, FUS/TLS, neuropathologies, SLA, motoneurones, vieillissement, stress oxydatif, stress du réticulum endoplasmique, neurodégénérescence.

Abstract

Two recently discovered causative genes for ALS, TDP-43 (TAR DNA Binding Protein 43) and FUS/TLS (Fused in Sarcoma/Translocated in Liposarcoma) are under further investigation regarding their biological roles in neuropathies such as Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Since TDP-43 and FUS are evolutionarily conserved we turned to the model organism *C. elegans* to learn more about their biological functions. Here we report that TDP-1 functions in the Insulin/IGF pathway to regulate longevity and the oxidative stress response. We have generated mutant TDP-43 and FUS transgenic lines in *C. elegans* that recapitulate certain aspects of ALS including motor neuron degeneration and adult-onset paralysis. Proteotoxicity caused by ALS-associated mutations in TDP-43 or FUS also induce TDP-1 expression and consistently, deletion of endogenous *tdp-1* rescues mutant TDP-43 and FUS proteotoxicity in *C. elegans*. These results suggest that chronic induction of wild type TDP-1/TDP-43 by proteotoxicity may actively promote neurodegeneration. We also screened for small-molecule suppressors of mutant TDP-43 and FUS neuronal toxicity in transgenic *C. elegans* and identified methylene blue and salubrinal as potent suppressors of TDP-43 and FUS toxicity in our models through induction of the endoplasmic reticulum (ER) stress response. Our results indicate that protein folding homeostasis in the ER may be an important target for therapeutic development in neurodegenerative diseases.

Key words

C. elegans, TDP-43, TDP-1, FUS/TLS, neuropathologies, ALS, motor neurons, aging, oxidative stress, ER stress, neurodegeneration.

Table des matières

RESUME.....	I
MOTS CLES	II
ABSTRACT.....	III
KEY WORDS.....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	X
REMERCIEMENTS	XII
A. INTRODUCTION.....	1
I. LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE	1
<i>I.1. Origines et caractéristiques.....</i>	<i>1</i>
<i>I.2. Stratégies thérapeutiques.....</i>	<i>2</i>
<i>I.3. Gènes impliqués dans la SLA</i>	<i>3</i>
II. TDP-43 ET FUS/TLS : ROLES EMERGEANTS DANS LES NEUROPATHOLOGIES	6
<i>II.1. La protéine TDP-43.....</i>	<i>7</i>
<i>II.2. FUS/TLS, une autre protéine de liaison à ARN/ADN.....</i>	<i>17</i>
<i>II.3. Les protéinopathies associées à TDP-43 et FUS/TLS : vers un mécanisme commun ?</i>	<i>24</i>
III. LE MODELE <i>C. ELEGANS</i>	31
<i>III.1 C. elegans : modèle in vivo de maladies neurodégénératives</i>	<i>31</i>

<i>III.2 Autres organismes modèles de maladies liées à TDP-43 et FUS/TLS</i>	35
IV. BUT DE CETTE ETUDE	38
B. MATERIELS ET METHODES	40
C. MANUSCRIT	47
D. MODULATION PHARMACOLOGIQUE DE LA TOXICITE	
NEURONALE ASSOCIEE A TDP-43 ET FUS <i>IN VIVO</i>	95
I. LE BLEU DE METHYLENE REDUIT LA TOXICITE NEURONALE CAUSEE PAR TDP- 43 ET FUS	95
II. LE BLEU DE METHYLENE REDUIT LA PROTEOTOXICITE VIA LE RE	96
III. LE SALUBRINAL PERMET AUSSI DE DIMINUER LA TOXICITE NEURONALE LIEE A TDP-43 ET FUS	98
E. DISCUSSION	109
F. CONCLUSION	117
BIBLIOGRAPHIE	120
ANNEXES	132

Liste des tableaux

A. Introduction

Tableau I : Gènes et loci qui prédisposent à la SLA.

Tableau II : Gènes et loci putatifs de la SLA.

Liste des figures

A. Introduction

Figure 2.1 : Schéma structural de TDP-43.

Figure 2.2 : Physiologie et Pathophysiologie de TDP-43.

Figure 2.3 : Implications pathologiques possibles de voies aberrantes d'autorégulation de TDP-43.

Figure 2.4 : Schéma structural de FUS/TLS.

Figure 2.5 : Fonctions biologiques de FUS/TLS.

Figure 2.6 : Modèle de pathologie associé à FUS.

Figure 2.7 : Rôles pathophysiologiques de TDP-43 et FUS/TLS proposés.

Figure 2.8 : Distribution des neurones exprimant *unc-47*.

C. Manuscrit

Figure 1 : *tdp-1* regulates lifespan.

Figure 2 : *tdp-1* specifies stress response signalling.

Figure 3 : Insulin/IGF signalling and cellular stress regulate TDP-1 expression.

Figure 4 : Mutant TDP-43 induces HSP-4/BiP expression.

Figure 5 : TDP-1 Expression is Induced by Proteotoxicity.

Figure 6 : Mutant TDP-43 and FUS increase oxidative stress.

Figure 7 : Proteotoxic Induction of TDP-1 enhances neuronal dysfunction and decreases lifespan.

Figure 8 : Deletion of wild type TDP-1 reduces mutant TDP-43 and FUS proteotoxicity in *C. elegans*.

Figure 9 : Integrated Model for Stress Induced TDP-1 Expression.

Figure S1 : Comparison of human TDP-43 and *C. elegans* TDP-1 proteins.

Figure S2 : *tdp-1* is not required for dauer formation or resistance to heat, hypoxia or radiation.

Figure S3 : TDP-1 is widely expressed in *C. elegans*.

Figure S4 : Cytoplasmic expression of TDP-1 in *daf-2* mutants.

Figure S5 : *tdp-1* does not affect DAF-16::GFP nuclear localization.

Figure S6 : Mutant TDP-43 does not activate the mitochondrial Hsp70 chaperones.

D. Modulation pharmacologique de la toxicité neuronale associée à TDP-43 et FUS *in vivo*

Figure 1.1 : Le Bleu de Méthylène réduit la paralysie et la neurodégénérescence chez les vers transgéniques *mutTDP-43* et *mutFUS*.

Figure 2.1 : Le Bleu de Méthylène réduit la protéotoxicité via le RE.

Figure 3.1 : Le salubrinal permet aussi de diminuer la toxicité neuronale liée à TDP-43 et FUS.

Figure supplémentaire 1.1 : Le traitement au Bleu de Méthylène n'affecte pas l'expression de *mutTDP-43* ou *mutFUS* chez le ver.

Figure supplémentaire 2.1 : Le Bleu de Méthylène n'a aucun effet sur le stress osmotique, le stress thermique et la longévité.

Figure supplémentaire 2.2 : Le Bleu de Méthylène ne permet pas d'induire une réponse au stress globale.

Figure supplémentaire 3.1 : L'expression de TDP-43 est inchangée après traitement au Salubrinal.

Figure supplémentaire 3.2 : Le Salubrinal réduit la toxicité associée à FUS mutante chez le ver.

F. Conclusion

Figure 1.1 : Modèle de l'implication de TDP-1/TDP-43 dans la réponse au stress et le vieillissement.

G. Annexes

Figure 1 : TDP-43 and FUS transgene constructs.

Figure 2 : Expression of human TDP-43 and FUS proteins in *C. elegans* transgenics.

Figure 3 : Mutant TDP-43 and FUS cause adult-onset, age-dependent paralysis in *C. elegans*.

Figure 4 : TDP-43 and FUS transgenes do not affect lifespan.

Figure 5 : Mutant TDP-43 and FUS impair synaptic transmission.

Figure 6 : Mutant TDP-43 causes motor neuron degeneration.

Figure 7 : Mutant TDP-43 and FUS are highly insoluble.

Figure 8 : Mutant TDP-43 and FUS aggregate in vivo.

Figure 9 : Decreased GABA staining in mutant TDP-43 and FUS worms.

Figure 10 : Accelerated paralysis phenotypes for TDP-43 and FUS transgenics in liquid culture.

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
BM	Bleu de Méthylène
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DLFT	Démence Lobaire Fronto-Temporale
DLFT-U	Démence Lobaire Fronto-Temporale-Ubiquitinylée
DFT	Démences Fronto-Temporales
ER	Endoplasmic Reticulum
ERAD	ER-Associated protein Degradation
FDA	Food and Drugs Approved
FUS/TLS	Fused in Sarcoma/Translocated in LipoSarcoma
GS	Granules de Stress
GFP	Green Fluorescent GFP
HSP	Heat Shock Proteins
hnRNP	heterogenous nuclear Ribonucleoprotein
IIS	Insulin/IGF Singalling
kDa	kilo Dalton
mutFUS	mutant FUS
mutTDP-43	mutant TDP-43
NGM	Nematode Growth Media
GTPase	Ran Guanosine Triphosphatase
RE	Réticulum Endoplasmique
RRM	RNA Recognition Motif
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
NLS	Signal de Localisation Nucléaire
SOD1	Superoxide Dismutase 1
SNC	Système Nerveux Central
TARDBP	TAR DNA-binding Protein
TDP-43	TAR DNA-binding Protein 43
ts	temperature sensitive
TAR	Transactive Response
UPR	Unfolded Protein Response

UTR Untranslated Region
VIH Virus de l'Immunodéficience Humaine

Remerciements

À mon arrivée à Montréal en été 2009, je n'avais aucune idée de la vitesse à laquelle mes deux ans de maîtrise s'écouleraient. Nous voici déjà en Décembre 2011, et j'ai parfois l'impression que mon premier jour au sein du laboratoire Parker était hier. On dit souvent que le temps passe plus vite lorsque l'on ne s'ennuie pas, que l'on aime ce que l'on fait et surtout lorsque l'on est bien entouré. Je crois pouvoir dire que dans mon cas ces trois conditions ont été remplies, et je sais que cela n'aurait pas été possible sans l'aide et la présence de certaines personnes.

C'est pourquoi, je voudrais tout d'abord remercier mon superviseur, le Dr. Alex Parker, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et m'avoir offert de travailler sur ce projet passionnant ; merci aussi pour toutes les conférences auxquelles j'ai eu la chance d'assister et où j'ai pu présenter mon travail. Je sais que de ce point de vue là j'ai été incroyablement chanceuse, et j'en garde de merveilleux souvenirs et beaucoup de motivation pour la suite. Un grand merci aux membres du laboratoire Parker, étudiants et stagiaires, et plus particulièrement merci à mon collègue de labo Arnaud Tauffenberger pour son aide dès mon arrivée et pour avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions depuis plus de deux ans ; merci aussi à nos stagiaires Inès Rahal et Esther Bourgeois, dont l'aide et l'investissement ont été précieux pour l'avancement de mon projet ; Merci à notre technicienne de laboratoire Sarah Peyrard, pour sa bonne humeur et son dévouement, ainsi que pour toutes ces PCRs et ces westerns qui m'ont fait gagner énormément de temps.

Je tiens aussi à remercier le Dre Christine Vande Velde pour ses nombreux conseils ainsi que son équipe, et plus particulièrement Anaïs Aulas pour toute son aide et ses « cours » de biochimie qui m'ont été très précieux. Cette collaboration entre les deux laboratoires nous a permis de former une belle équipe de travail et de nous entraider, avec en prime de beaux moments de complicité. Merci à vous tous pour cette belle expérience !

Mes remerciements aux membres du laboratoire du Dr. Guy Rouleau, et tout particulièrement à Hélène Catoire pour ses nombreuses relectures de manuscrits ; ainsi qu'à Janet Laganière pour sa gentillesse et sa patience lorsque j'ai eu à utiliser le microscope à fluorescence.

Merci aussi à mes deux membres de comité de parrainage, Dre Amy Maddox et Dr. Pierre Drapeau, pour tous leurs bons conseils et leurs encouragements.

Enfin, je souhaiterais terminer en remerciant les membres de ma famille pour leur soutien et leurs encouragements. Merci aussi à toi Jonathan pour ta présence, ton optimisme et ton soutien inconditionnels. Vous m'avez tous énormément manqué, mais je crois que cela m'a appris à savourer chaque moment passé en votre présence à mes retours en France ou lors de vos visites.

Encore une fois MERCI à toutes et à tous !

A. Introduction

La population étant vieillissante, le nombre de personnes affectées par des troubles neurodégénératifs au moment d'entrer dans leur 5^{ème} ou 6^{ème} décennie ne fait qu'augmenter. Parmi ces maladies du vieillissement se trouvent les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, mais aussi la Sclérose Latérale Amyotrophique.

I. La Sclérose Latérale Amyotrophique

I.1. Origines et caractéristiques

La sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) fut décrite pour la première fois en 1869 par le neurobiologiste et physicien français Jean-Martin Charcot. Cette maladie neurodégénérative dont les caractéristiques primaires sont le dysfonctionnement et la mort sélective des motoneurones, provoque de la spasticité, une hyperréflexie (motoneurones supérieurs), une faiblesse généralisée, une atrophie musculaire et une paralysie (motoneurones inférieurs) [1]. La SLA se développe généralement chez des patients âgés entre 50 et 60 ans. La perte des neurones chargés d'innover les muscles respiratoires constitue dans la plupart des cas un événement fatal survenant entre un et cinq ans après le début de la maladie [2].

Par ailleurs, les motoneurones qui contrôlent les mouvements oculaires et sphinctériens semblent épargnés et ne dégèrent pas précocement [1]. Bien que toute l'attention soit portée vers les motoneurones dans le cas de SLA, d'autres régions ne faisant pas partie du Système Nerveux Central (SNC) (la peau, le foie et la moelle épinière) sont affectées [3].

Enfin, l'incidence et la prévalence de la SLA ne font qu'augmenter, avec à ce jour 1 à 3 personne(s) affectées sur 100 000 [4].

À ce jour le mécanisme de la SLA reste très peu élucidé. Des hypothèses impliquent : le stress oxydatif, l'agrégation protéique, le dysfonctionnement mitochondrial, le transport axonal, de l'excitotoxicité par le glutamate, la production insuffisante de facteurs neurotrophiques, le stress du réticulum endoplasmique, et des déficiences dans la maturation des ARNs [5, 6]. L'ensemble de ces mécanismes toxiques conduisant à la mort des neurones est à l'origine des symptômes de plusieurs désordres neurologiques tels que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, la chorée de Huntington, les attaques cérébrales, ou encore la SLA.

De manière générale, il existe trois mécanismes de mort cellulaire : la mort par apoptose, nécrose ou autophagie. Les détails de chacun de ces mécanismes ne seront pas abordés mais dans le cas de la SLA, des analyses de tissus post-mortem de patients ainsi que l'étude de modèles expérimentaux animaux et cellulaires mettent en cause l'apoptose dans la dégénérescence neuronale [7]. Néanmoins il est encore difficile de montrer de manière convaincante que l'apoptose est seule responsable de la neurodégénérescence observée chez les patients atteints de SLA.

I.2. Stratégies thérapeutiques

La SLA étant une maladie complexe et multifactorielle, les stratégies de découverte de thérapies efficaces représentent un réel défi [1]. À ce jour, il n'existe aucun traitement permettant de ralentir ou arrêter la progression de la maladie de

manière efficace. Malgré les nombreuses tentatives, le Riluzole est actuellement le seul composé approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) américaine capable de ralentir la progression de la SLA et d'augmenter la durée de vie des patients. Cependant ses effets sur ces deux paramètres demeurent très modestes et peu convaincants [1, 4]. Plusieurs essais cliniques sur d'autres composés sont en cours, et en attendant que leur efficacité et leur sécurité puissent être prouvés, quatre grands axes de recherche de thérapies se sont développés : des criblages de molécules ; des approches en immunothérapie ; des thérapies par libération de protéines (ADN ou ARN) tels que des facteurs de croissance ; ou encore une approche par thérapie génique incluant l'utilisation de vecteurs viraux et de cellules souches [1]. Malheureusement, malgré le développement de ces différentes approches thérapeutiques et de grands investissements financiers pour les mettre en œuvre, l'élaboration de nouvelles thérapies efficaces reste à ce jour un réel défi. La principale raison étant probablement la trop grande hétérogénéité entre les patients.

I.3. Gènes impliqués dans la SLA

L'étiologie de la SLA est complexe et se composerait à la fois de facteurs environnementaux et génétiques [2]. Les causes de cette maladie sont encore très peu connues pour la majeure partie des cas, et le développement clinique très variable [1]. Environ 5 à 10% des cas de SLA sont dits familiaux (hérités), la majorité des cas étant donc sporadiques (sans composante génétique). En 1993, le gène SOD1 (Superoxide Dismutase 1) fut le premier gène découvert en tant que cause d'environ 20% des cas familiaux, et reste aujourd'hui le mieux caractérisé. Depuis, plusieurs gènes ont été

identifiés comme facteur de risque ou cause de SLA (**Tableaux I et II**) parmi lesquels on trouve TDP-43, FUS/TLS, Ubiquilin-2 et C9ORF72 [2, 8-12]. Parmi ces gènes impliqués dans la SLA certains ont pour point commun de jouer un rôle dans le métabolisme des ARNs, constituant une famille de protéines appelées hnRNPs (heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins). Ces processus incluent la transcription de l'ARN, l'épissage des introns non-codants de pré-ARNms, puis l'édition, la maturation, le transport, la traduction, la stabilité et la dégradation des ARNs [2]. De plus certains de ces gènes, tels que TDP-43 ou FUS, ne sont pas seulement importants pour la compréhension du mécanisme de toxicité responsable de la SLA mais aussi pour l'étude d'autres maladies neurodégénératives telles que les Démences Fronto-Temporales (DFT), les maladies à expansion de polyglutamines, ou encore la maladie d'Alzheimer [8, 13].

Plus particulièrement, la découverte de mutations chez deux protéines de liaison à ADN/ARN, TDP-43 (Transactive response (TAR) DNA-binding protein/TARDBP 43) [14] et FUS/TLS (Fused in Sarcoma/Translocated in Liposarcoma) [15, 16], comme causes de formes familiales et sporadiques de SLA a permis d'orienter les recherches vers une évaluation des voies de maturation de l'ARN comme voie pathogénique commune de maladies des motoneurones [2, 13].

Table 1 | Established ALS-associated genes as of June 2011

Locus (chromosome)	Gene	Protein length (amino acids)	Number of mutations	Analysis type (Initial)	Modes of Inheritance	Phenotypic MND variants	Other features*
ALS1 (21q22.1)	SOD1	153×2	166	Linkage	Dominant–cp Dominant–lcp Recessive De novo mutation	ALS PMA PBP (rare) BFA (rare)	Cognitive impairment (rare) Cerebellar ataxia Autonomic dysfunction (rare) FTD (rare)
ALS2 (2q33.2)	ALS2	1,657	19	Linkage	Recessive	Juvenile PLS, juvenile ALS or infantile HSP	Unknown
ALS3 (18q21)	Not identified	Unknown	None	Linkage	Dominant	ALS	NA
ALS4 (9q34)	SETX	2,677	9	Linkage	Dominant	ALS	AOA2, cerebellar ataxia, motor neuropathy [†]
ALS5 (15q21.1)	SPG11	2,443	12	Linkage	Recessive	Juvenile ALS	NA
ALS6 (16q11.2)	FUS	526	42	Linkage Candidate	Dominant–cp Dominant–lcp De novo mutations Recessive	ALS ALS–FTD	Parkinsonism FTD
ALS7 (20p13)	Not identified	Unknown	None	Linkage	Dominant	ALS	NA
ALS8 (20q13.3)	VAPB	99	3	Linkage	Dominant	ALS, PBP or PMA	Unknown
ALS9 (14q11.2)	ANG	147	17	Candidate	Dominant–cp Dominant–lcp?	ALS PBP or ALS–FTD	Parkinsonism
ALS10 (1p36.2)	TARDBP	414	44	Candidate Linkage	Dominant–cp Dominant–lcp Recessive (rare)	ALS ALS–FTD	PSP PD FTD Chorea
ALS11 (6q21)	FIG4	907	10	Candidate gene	Dominant	ALS PLS	CMT4J [†] Cognitive impairment
ALS12 (10p15–p14)	OPTN	577	5	Homozygosity mapping	Dominant–cp Recessive	ALS	POAG [†]
ALS13 (12q24)	ATXN2	1,313	6 (intermediate length)	Candidate gene	Dominant	ALS	NA

Tableau I : Gènes et loci impliqués dans la SLA [12].

Table 2 | Selected genes and loci putatively associated with ALS

Gene or locus	Nature of variation	Geography	Initial supporting evidence	Evidence against	Discovery method
<i>UNC13A</i>	SNP	Multiple populations	Independent replication in European populations	Not replicated in Japanese or Chinese samples	GWAS
<i>C9ORF72</i>	GGGGCC-repeat expansion	Multiple populations	Independent replication in FALS and FALS-FTD	Not replicated in Japanese or Chinese SALS	GWAS
<i>DCTN1</i>	SNP	Danish, German, Swedish	Replication within study	Not replicated	Candidate gene
<i>DPP6</i>	SNP	Multiple populations	Independent replication	Negative replications*	GWAS
<i>TAF15</i>	SNP	US, Swedish	Functional studies	Cosegregation not shown in FALS	Candidate gene
<i>VEGF</i>	SNP haplotype	Multiple populations	Animal model	Negative replications*	Candidate gene
<i>NEFH</i>	Tail domain indel†	Swedish, UK, US	Independent replications	Negative replications, although SALS and tail domain not tested	Candidate gene
<i>SMN</i>	Copy number variation	French, Dutch	Replication	None	Candidate gene
<i>SIGMAR1</i>	SNP	Australia, Poland	Functional studies	Single study	Candidate gene
<i>VCP</i>	SNP	Italy, US	Independent replications	Single study	Candidate gene
<i>ELP3</i>	Microsatellite	UK, US, Belgium	Animal model and independent linkage in a fly model	None	Microsatellite GWAS
<i>PON1</i>	SNP	Multiple populations	Independent replications	Negative studies	Candidate gene
<i>HFE</i>	SNP	UK, Ireland, Italy, Dutch, US, Chinese	Independent replications	None	Candidate gene
<i>KIFAP3</i> §	SNP	UK, US, Dutch, French, Ireland	Functional studies	One negative replication	GWAS
<i>APOE</i> ‡	Haplotype	US, Swedish, Russian	Independent replication	Negative or contradictory studies (other allele)	Candidate gene

Tableau II : Gènes et loci impliqués dans la SLA (suite tableau I) [12].

II. TDP-43 et FUS/TLS : rôles émergents dans les neuropathologies

TDP-43 et FUS/TLS sont deux protéines de liaison à ARN/ADN impliquées chacune dans plus de 5% des cas de SLA, qui comportent des similarités structurales et fonctionnelles considérables. Leur implication dans ces neuropathologies a dirigé les intérêts de recherche vers une meilleure compréhension des processus de maturation de l'ARN. L'altération de ces protéines est ainsi devenu un élément central dans l'étude du développement de neuropathies comme la SLA [17, 18].

II.1. La protéine TDP-43

II.1.1. Structures et caractéristiques

TDP-43 est une protéine de 43-kDa hautement conservée au cours de l'évolution et composée de 414 acides aminés codant pour le gène TARDBP localisé sur le chromosome 1. Cette protéine est une hnRNP composée de 5 régions : une séquence N-terminale avec un Signal de Localisation Nucléaire (NLS), deux Motifs de Reconnaissance à l'ARN (RRM1 et RRM2), un signal d'export nucléaire, et enfin une région C-terminale riche en glycine qui permettrait les interactions interprotéiques [2, 17] (**Figure 2.1**).

Le terme hnRNP a été inventé pour désigner les protéines associées avec des populations d'ARN hétérogène au sein de cellules à division rapide [19]. Ce sont en réalité des protéines de liaison à l'ARN impliquées dans divers processus cellulaires jouant un rôle dans les étapes d'expression d'un gène telles que la réplication et la réparation de l'ADN, la transcription, l'épissage des pré-ARNms, l'export/import des ARNms, ou encore la stabilité et la traduction des ARNms [19].

La fonction de la région N-terminale de TDP-43 n'a pas encore été complètement caractérisée mais serait requise pour l'exclusion de l'exon 9 de la protéine CFTR (Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator), responsable du transport des ions chlorures à travers la membrane cellulaire [20].

Les motifs RRM1 et RRM2 constituent les régions responsables des interactions directes de TDP-43 et se composent de motifs d'une longueur de 60 résidus conservés au cours de l'évolution [19]. Le motif RRM1 est nécessaire et suffisant pour que TDP-43 puisse exercer son activité de liaison d'acides nucléiques. En revanche, la fonction du domaine RRM2 est encore peu élucidée et il ne semble pas jouer un rôle significatif dans

l'interaction de TDP-43 avec des ARNs [21]. Par ailleurs, certaines observations suggèrent que la mobilité cellulaire de TDP-43 dépend en grande partie de sa capacité d'association avec des acides nucléiques ou de ses interactions protéiques, toutes deux contrôlées par le domaine RRM1 de TDP-43 [22].

La portion C-terminale de TDP-43 jouerait un rôle dans l'agrégation protéique retrouvée dans les cas pathologiques. En effet, une surexpression de plusieurs portions de la région C-terminale de TDP-43 et la présence de mutations associées à la SLA dans cette même région induisent l'agrégation de ses différents isoformes [23]. Par ailleurs, l'intégrité du domaine riche en glycine de la région C-terminale est cruciale pour le bon déroulement de l'activité d'épissage de TDP-43 [21]. De plus, la perte de l'activité de liaison aux acides nucléiques de TDP-43, ou encore l'altération de son extrémité C-terminale peuvent interférer avec la répartition cellulaire de la protéine [22]. Ce domaine C-terminal contient aussi plusieurs sites consensus de phosphorylation. L'hyperphosphorylation de la protéine TDP-43 constitue d'ailleurs une des empreintes de la maladie [24].

Enfin, la détermination de la fonction de chacun des domaines de TDP-43 est importante pour la définition du rôle de TDP-43 et de ses propriétés fonctionnelles.

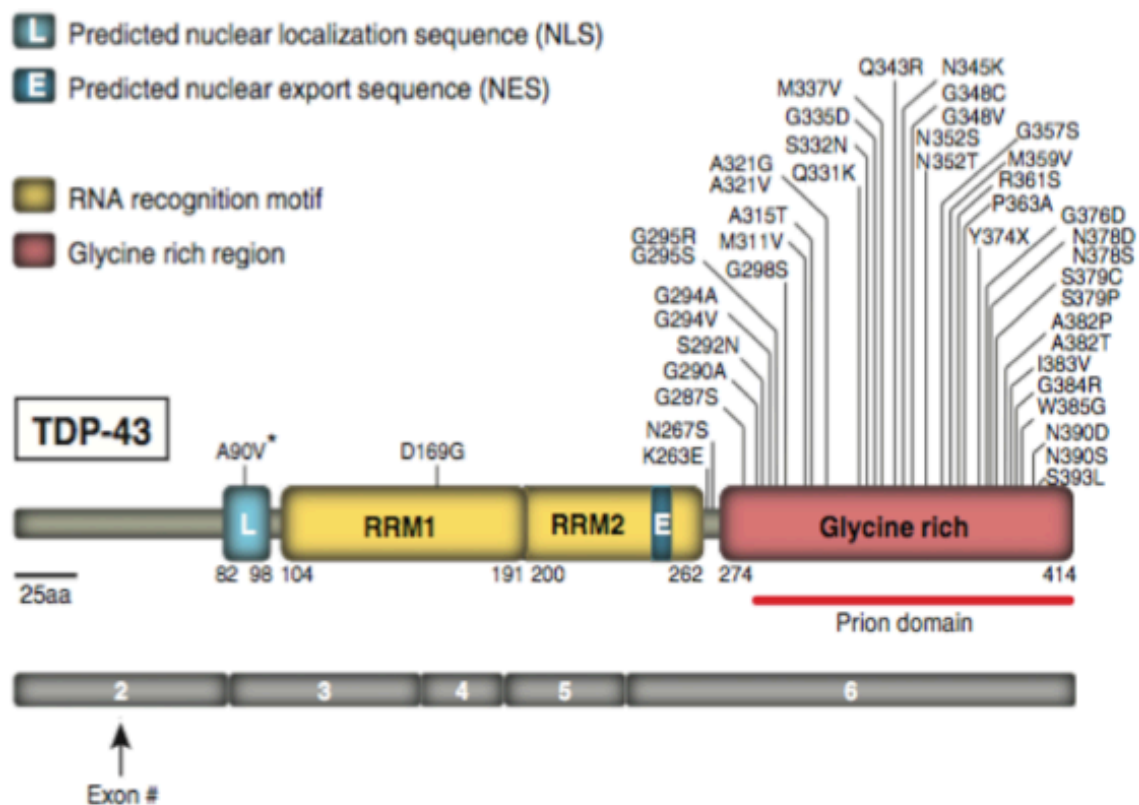


Figure 2.1 : Schéma structural de TDP-43 adapté de [18].

44 mutations de TDP-43 ont été reliées à la pathologie de la SLA (cas sporadiques et familiaux), ainsi que de rares cas de patients atteints de Démence Lobaire Fronto-Temporale (DLFT). La majorité des mutations sont localisées dans la région riche en Glycine en C-terminal. Le domaine prion putatif comprend les acides aminés 277 à 414.

Le variant A90V de TDP-43 a été observé chez un patient SLA/DLFT.

Abréviations : NLS, Nuclear Localization Signal ; NES, Nuclear Export Sequence ; RRM, RNA Recognition Motif.

II.1.2. Rôles et fonctions de TDP-43

TDP-43 fut décrite pour la première fois en tant que protéine de liaison à la séquence TAR (Transactive Response) du virus du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) avec un rôle présumé dans la transcription de celui-ci [19]. Cette protéine est aussi capable de lier des motifs de répétition d'ADN et ARN pour jouer un rôle de répresseur de transcription. De plus, TDP-43 est dotée d'une activité d'inhibition de l'épissage pouvant provoquer le saut d'exon via des interactions inter-protéines [25]. À ce jour, le rôle fonctionnel de TDP-43 le mieux caractérisé met en jeu la régulation de l'épissage des pré-ARNms [19]. Cette protéine est aussi dotée de la capacité de lier et/ou réguler l'expression et les configurations d'épissage d'autres pré-ARNms impliqués dans d'autres maladies dont ceux de FUS/TLS, progranuline et tau (mutations responsables de SLA et/ou DFT), parkin et MEF2D (impliqués dans la maladie de Parkinson), ou encore huntingtine et les ataxines [18].

Il semble exister un mécanisme d'autorégulation du niveau de synthèse de TDP-43. En effet, TDP-43 contrôle en partie sa propre expression par liaison directe avec la région non traduite 3'UTR (Untranslated Region) de son propre ARN [18]. Toutefois, ce mécanisme d'autorégulation n'est pas totalement élucidé et des théories différentes s'opposent [21, 26]. Malgré cela, l'autorégulation de l'expression de TDP-43 semble représenter un élément important de la pathogenèse de la SLA [19] : un événement initiateur qui provoquerait une réduction des niveaux de TDP-43 dans le noyau (mutation et/ou agrégats cytoplasmiques), mènerait à une augmentation de la synthèse de TDP-43 [18].

Une autre implication de TDP-43 réside dans la formation des granules de stress (GS). La formation des GS constitue un événement temporaire enclenché en réponse à des changements environnementaux (tels que le stress), et menant à la répression de la machinerie traductionnelle afin de maintenir une viabilité cellulaire [27]. Au cours des deux dernières années, plusieurs études ont démontré qu'en condition de stress (oxydatif, osmotique, ou choc thermique), TDP-43 est présente dans les GS [28, 29]. L'absence de TDP-43 semble affecter significativement la taille et la dynamique des GS [30]. De plus, la localisation de TDP-43 dans les GS est dépendante du stress, alors que les fragments de produit de dégradation de TDP-43 respectivement de 25- et 35-kDa observés chez les patients SLA/DFT, eux possèdent une localisation importante dans les GS, et ce même en condition non stressée [23]. D'autre part, une dérégulation des niveaux de TDP-43 menant à une surexpression (par perte d'autorégulation par exemple) pourrait causer une croissance anormale de la taille des GS provoquant une instabilité cellulaire [31]. Dans ce contexte, TDP-43 jouerait alors un rôle protecteur face à différentes conditions de stress cellulaires.

Enfin, bien que le rôle de TDP-43 dans le développement des pathologies qui lui sont associées reste encore peu élucidé, les phénotypes létaux et paralytiques associés aux modèles transgéniques de souris ou de mouches pour lesquels le gène TDP-43 est invalidé, soulignent l'importance de la fonction de cette protéine [21].

II.1.3. Pathologies liées à TDP-43

En 2006, TDP-43 fut identifiée comme composant protéique majeur d'inclusions intracellulaires se formant dans les tissus neuronaux de patients affectés par diverses maladies neurodégénératives, incluant la SLA, la DFT [14] et même certains cas de

maladie d'Alzheimer [32, 33]. TDP-43 est une protéine ubiquitaire, majoritairement localisée dans le noyau en conditions basales mais en continuel mouvement entre celui-ci et le cytoplasme [22]. En revanche, en conditions pathologiques de SLA ou DFT, une relocalisation de la protéine est observée en plus d'inclusions dans le cytoplasme et le noyau des neurones et des cellules gliales [2, 13, 17]. Dans le cas de patients malades, une hyperphosphorylation et une ubiquitinylation anormale de TDP-43 sont observées [13, 14], ainsi que la formation de plusieurs fragments d'environ 25- et 35-kDa, l'ensemble représentant la signature biochimique de pathologies liées à TDP-43 [17]. Les fragments de TDP-43 de 25- et 35-kDa sont générés lors de l'apoptose et leur formation est dépendante de l'activité de la caspase-3. Des études sur le processus de dégradation de TDP-43 ont prouvé que celle-ci s'effectue via le protéasome [34]. En effet, l'inhibition de fonction du protéasome semblerait entraîner d'autres clivages du fragment de 35kDa qui irait ensuite s'agréger dans le cytoplasme [24]. Le fragment 35kDa de TDP-43 peut aussi être généré via l'expression d'un variant de TDP-43 alternativement épissé dans le lequel existerait une délétion de 91pb dans l'exon 2 causant un décalage du cadre de lecture et une initiation de traduction alternative [35].

Un des aspects encore inexplicés lors de la redistribution de TDP-43 en cas pathologique est la clairance nucléaire. Ceci suggère que la pathogenèse est peut-être en partie due à la perte d'une ou plusieurs fonctions nucléaires de TDP-43 [17]. Encore aujourd'hui, le rôle de l'agrégation en tant que tel dans la neurodégénérescence reste très controversé. D'autant plus que de récents résultats obtenus chez des modèles de rongeurs montrent que la neurodégénérescence ne corrèle pas nécessairement avec la formation d'inclusions insolubles de TDP-43 (**Figure 2.2**) [23].

Le terme « protéostasie », inventé récemment par la communauté scientifique, fait référence à la capacité d'une cellule à maintenir des niveaux de concentration, de repliement, d'interactions secondaires, et de localisation cellulaire protéiques corrects, et ce à travers plusieurs compartiments [36]. TDP-43 étant capable d'autorégulation de son expression, certaines études se penchent actuellement sur un éventuel dérèglement de son expression. Ces recherches ont permis de montrer qu'en cas de mauvais contrôle de l'expression de TDP-43, une augmentation de sa production est observée, pouvant corrélérer avec l'activation de l'agrégation et résultant en davantage d'effets nocifs sur le métabolisme cellulaire [23]. De plus, l'incapacité de la cellule à maintenir une protéostasie correcte due au vieillissement commence à être reconnue comme composante fondamentale de diverses maladies, et plus particulièrement au niveau neuronal [36]. C'est pourquoi il demeure important de déterminer les mécanismes exacts qui entrent en jeu dans la régulation des niveaux de TDP-43, mais aussi son bon repliement, sa localisation et le maintien des interactions avec ses partenaires (**Figure 2.3**).

En 2008, l'identification de mutations dominantes sur le gène TARDBP a permis de fournir l'évidence qu'une forme aberrante de TDP-43 peut mener à de la neurodégénérescence [25, 37]. Toutes les mutations relatives à la SLA identifiées sont situées dans la région C-terminale à l'exception d'une mutation localisée dans le RRM1. Il s'agit de mutations dominantes faux-sens exceptée pour l'une d'entre elles, Y374X, une troncation à l'extrême région C-terminale (**Figure 2.1**) [13, 17]. Certaines de ces mutations résultent en la substitution d'acides aminés par des résidus thréonine ou sérine permettant de prédire une augmentation de phosphorylation de TDP-43. Ceci pourrait

modifier certaines interactions de TDP-43 ou encore son transport, et ainsi mener à une accumulation progressive des agrégats retrouvés chez les patients atteints de SLA [25]. Des mutations de TDP-43 associées à la SLA seraient responsables de la formation en plus grande quantité d'inclusions qui présentent des propriétés très semblables aux GS [29]. Par ailleurs, une étude utilisant des lignées cellulaires isogéniques et des cellules de fibroblastes de patients humains a démontré que la protéine TDP-43 mutante est plus stable que celle de type sauvage et présente aussi une plus longue demi-vie. Cette observation suggère que l'augmentation de demi-vie de la forme mutante de TDP-43 en soi puisse être à l'origine, ou tout du moins contribuer, à la formation des agrégats de TDP-43 retrouvés chez les patients atteints de SLA [38].

Enfin, il est aussi intéressant de remarquer que plusieurs variations localisées dans les régions non codantes du gène TARDBP ont été identifiées chez des patients. Cependant des études approfondies seront nécessaires afin de prouver leur effet pathogénique [17].

Un total de 44 mutations de TDP-43 ont été décrites à ce jour chez des patients atteints de SLA [19]. Cependant, il est encore difficile de déterminer si ces mutations provoquent une perte neuronale via un gain de une ou plusieurs propriété(s) toxique(s) [39].

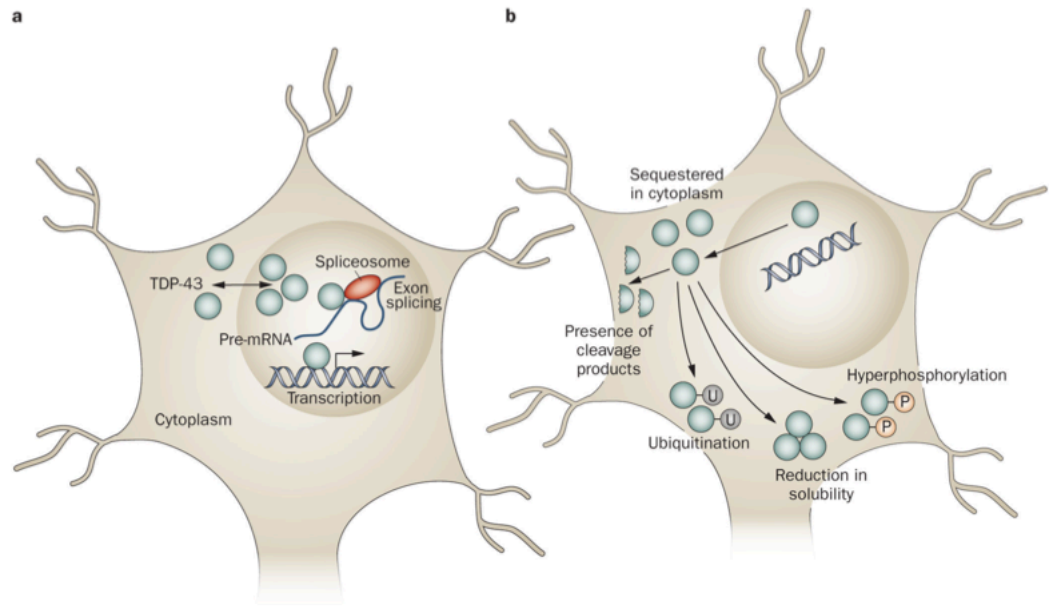


Figure 2.2 : Physiologie et Pathophysiologie de TDP-43 [40].

- a. En conditions physiologiques, TDP-43 est principalement localisée dans le noyau, bien que la protéine possède la capacité de circuler entre le noyau et le cytoplasme. De plus, TDP-43 joue un rôle dans la régulation de l'expression de certains gènes, la régulation de l'épissage, et la stabilité des ARNms.
- b. En conditions pathophysiologiques, TDP-43 quitte le noyau pour aller s'accumuler dans le cytoplasme. La forme pathologique de TDP-43 est souvent hyperphosphorylée et/ou ubiquitinylée, et cette forme est aussi moins soluble qu'en conditions physiologiques, la rendant plus susceptible à s'agréger.

Abréviations : mRNA, ARN messager ; P, groupement phosphate ; U, groupement Ubiquitine.

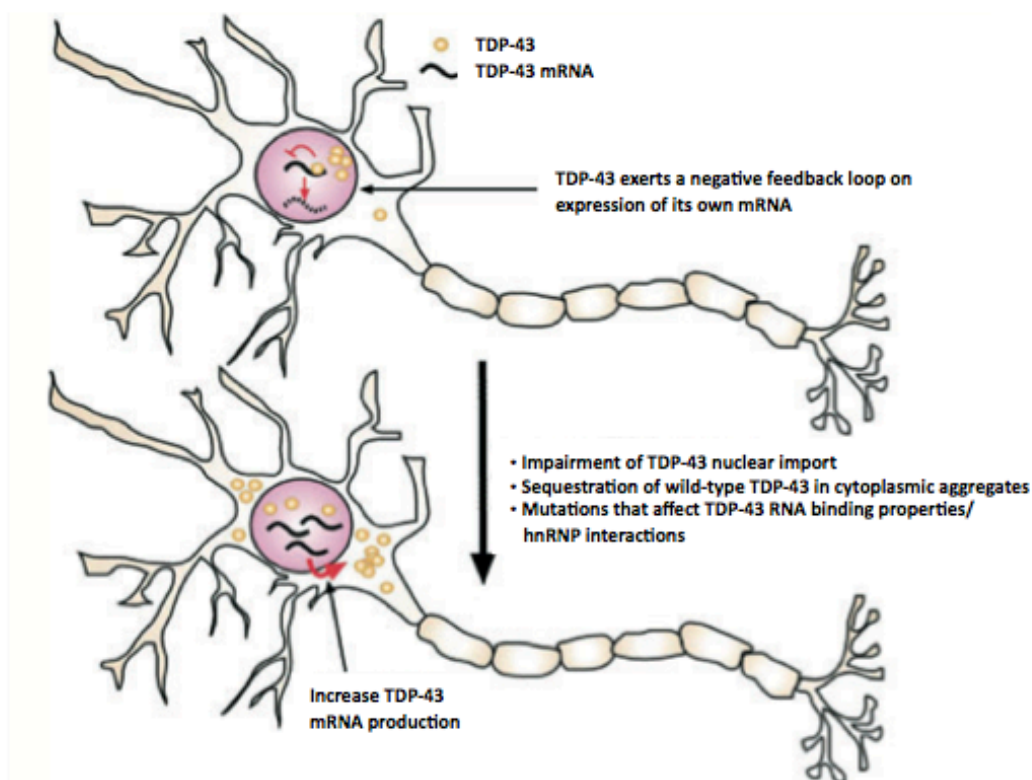


Figure 2.3 : Implications pathologiques possibles de voies aberrantes d'autorégulation de TDP-43 [36].

Le Schéma montre comment un déficit du processus d'autorégulation de TDP-43 par une variété d'altérations de distribution de cette protéine dans le noyau/cytoplasme, peut contribuer à la progression de la maladie.

Enfin, malgré les nombreuses avancées dans la compréhension des fonctions et des implications de TDP-43 dans les maladies neurodégénératives, il reste encore à déterminer si la formation d'inclusions est toxique en elle-même pour la cellule ; ou si les agrégats insolubles de TDP-43 observés chez les cas pathologiques séquestrent eux-mêmes la protéine, provoquant une perte de fonction cellulaire de TDP-43 ; ou encore s'il s'agit d'une contribution de ces deux phénomènes. Les interrogations quant à sa contribution à la prédisposition, le début et la progression de la maladie, persistent et nécessitent sans doute une étude élargie aux autres protéines de liaison à ARN/ADN telles que FUS/TLS.

II.2. FUS/TLS, une autre protéine de liaison à ARN/ADN

II.2.1. Structure et caractéristiques

Le gène FUS/TLS, d'environ 12kb, se compose de 15 exons et 14 introns, et code une protéine de 526 acides aminés d'environ 53kDa [41, 42]. Son promoteur présumé comporte les caractéristiques de celui d'un gène de ménage, avec notamment l'absence de boîtes TATA [43]. La protéine FUS/TLS se compose d'un domaine N-terminal riche en sérine-tyrosine-glutamine-glycine (SYGQ), d'une région riche en glycine (G), d'un RRM, d'un motif en doigt de zinc, ainsi que d'une région C-terminale riche en arginine-glycine-glycine (RGG) [13, 41] (**Figure 2.4**).

La région N-terminale de FUS est constituée d'un domaine d'activation transcriptionnelle qui à la suite d'une translocation chromosomale provoque la fusion de protéine pouvant causer un sarcome d'Ewing ou une leucémie aigue myéloïde [16]. Le RRM en C-terminal ainsi que les régions riches en glycine qui l'encadrent seraient

cruciaux pour l'activité de liaison à l'ARN de la protéine [44]. Toutefois, de plus récentes études ont permis de démontrer que des formes de FUS tronquées au niveau du RRM sont encore capables de reconnaître leurs ARNs cibles. Cette même étude a aussi établi que la structure en doigt de zinc de FUS surpasserait l'aptitude du RRM en matière d'interaction avec de l'ARN [45].

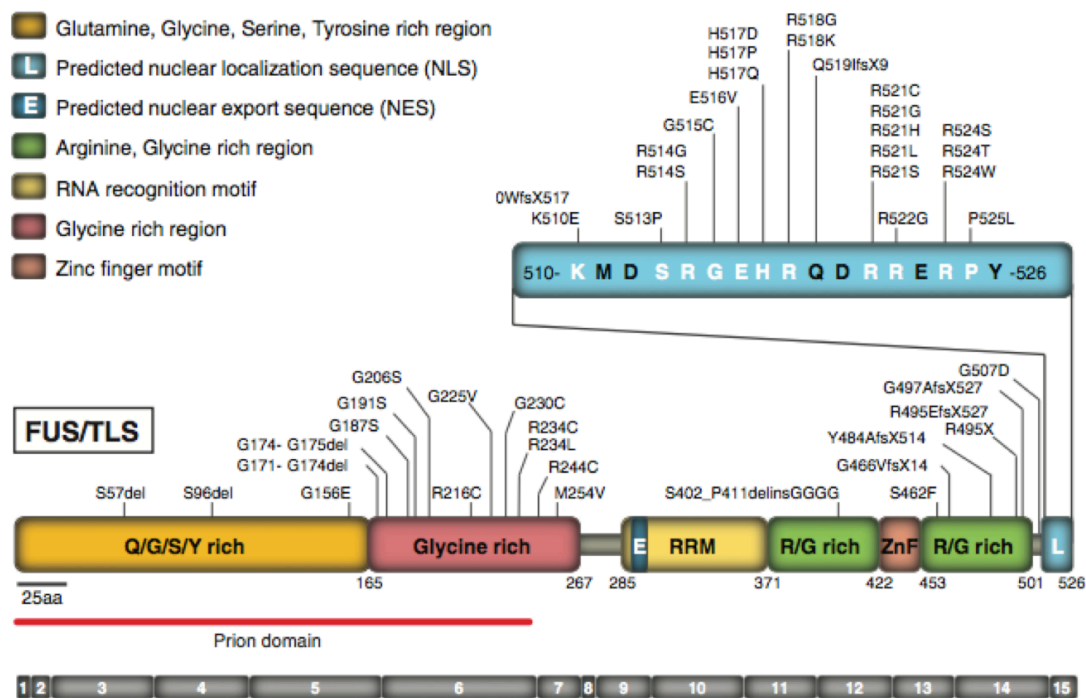


Figure 2.4 : Schéma structural de FUS/TLS [18] et/ou par une perte de fonction(s) survenant après séquestration de la protéine dans des inclusions nucléaires ou cytoplasmiques [13].

46 mutations ont été identifiées pour FUS/TLS dans des cas de SLA familiales et sporadiques, ainsi que de rares cas de patients DLFT. La majorité des mutations sont regroupées dans les 17 derniers acides aminés, au sein de la région riche en glycine, et dans le domaine prion putatif comprenant les acides aminés 1 à 239.

La circulation de FUS entre les compartiments nucléaire et cytoplasmique est dépendante de la région C-terminale [45, 46]. En effet, des mutations dans ce domaine peuvent perturber l'import nucléaire de FUS [47]. De même, la délétion de 17 résidus en C-terminal cause une délocalisation de FUS dans le cytoplasme et la formation d'inclusions cytoplasmiques suggérant que ces 17 résidus sont essentiels à la localisation de FUS dans le noyau [46].

Enfin, tout comme TDP-43, la protéine FUS est dégradée via le protéasome et des mutations sur le site de phosphorylation de FUS (serine 256) ont pour conséquence d'altérer sa protéolyse [48]. Il est donc possible que des altérations d'un ou plusieurs domaines puissent avoir un impact sur le bon fonctionnement de FUS.

II.2.2. Fonctions biologiques de FUS/TLS

Mise en évidence pour la première fois en 1993 dans des liposarcomes myxoïdes humains, le gène FUS/TLS jouerait un rôle critique dans la formation de protéines de fusion liées à une variété de cancers, incluant la leucémie aigue myéloïde et le sarcome d'Ewing [49]. FUS/TLS remplit de multiples fonctions dans l'épissage et le transport d'ARN, ainsi que la formation d'oncoprotéines de fusion [41]. De plus, FUS/TLS interviendrait dans la promotion et le maintien de la prolifération cellulaire [41]. FUS appartient à la famille FET (FUS/TLS, EWS, TAF15) qui sert à contrôler l'expression génique par intégration des processus de transcription, d'épissage et de métabolisme de l'ARN [46, 47]. Au sein de cette famille FUS serait aussi impliqué dans la réparation de l'ADN et l'appariement des régions d'ADN homologues [46] (**Figure 2.5**).

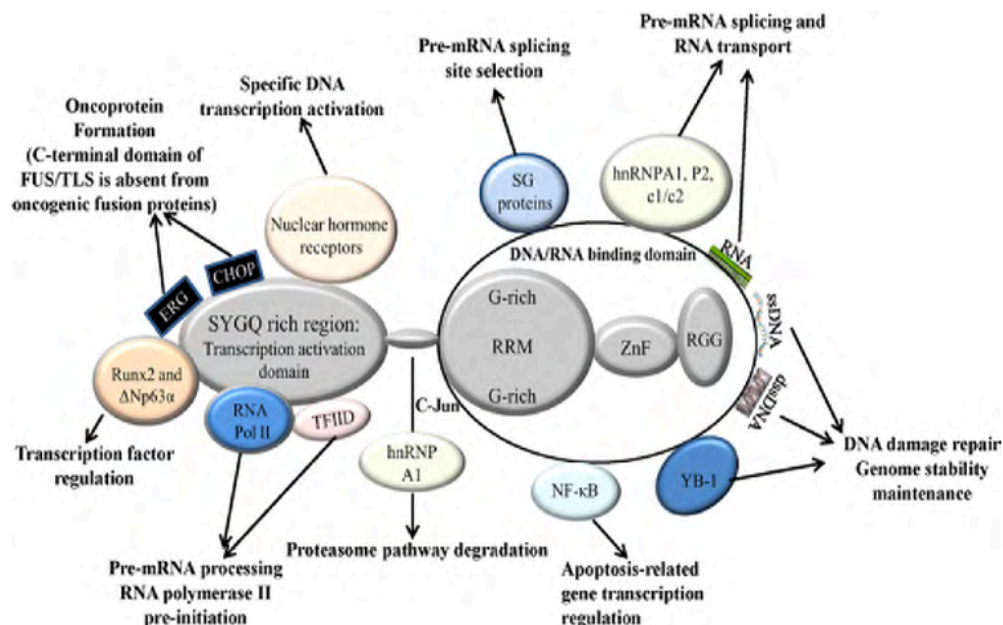


Figure 2.5 : Fonctions biologiques de FUS/TLS [41].

FUS/TLS contient deux domaines fonctionnels : le domaine N-terminal d'activation de la transcription (région SYGQ) et le domaine C-terminal de liaison à l'ADN/ARN. Le domaine N-terminal est impliqué dans la régulation de la transcription et la maturation des pré-ARNs ; le domaine C-terminal interagit directement avec de l'ARN ou de l'ADN, jouant un rôle dans la maturation des pré-ARNs, l'épissage d'ARNs et le maintien de la stabilité génomique. Plusieurs partenaires d'interaction de FUS/TLS et leurs fonctions sont représentés.

Abréviations : RNA pol II, ARN polymérase II.

Comme TDP-43, FUS est une hnRNP capable de lier de l'ARN. FUS a été caractérisée comme une hnRNP P2 capable de lier l'ARN pré-messager [50], et il a été proposé qu'elle agirait comme chaperone d'ARNms qui circulent entre le noyau et le cytoplasme [45, 51]. FUS possède aussi un rôle dans le maintien de la morphologie des nerfs en permettant de stabiliser les structures synaptiques par tri des ARNms [52]. D'autre part, FUS est un composant majeur d'inclusions ubiquitinylées d'une forme particulière de DLFT, la DLFT-U (Ubiquitinylée) [46].

Une meilleure définition et compréhension du rôle biologique de FUS permettra d'élucider le(s) mécanisme(s) menant aux maladies neurodégénératives pour lesquelles elle est impliquée. Tout comme TDP-43, il est fort probable que des mutations de gain et/ou perte de fonction(s) de FUS soient impliquées dans la pathogenèse de maladies neurodégénératives telles que la SLA [41].

II.2.3. FUS/TLS et son implication dans les neuropathologies

FUS est exprimée dans tous les tissus humains, et son niveau d'expression est hétérogène au sein de ces divers tissus [43]. Cette protéine est majoritairement nucléaire, mais elle est aussi présente dans le cytoplasme de plusieurs cellules, exceptées les hépatocytes pour lesquelles FUS est uniquement cytoplasmique [53]. Comme TDP-43, FUS se déplace continuellement entre le noyau et le cytoplasme. Toutefois, en conditions de stress cellulaire FUS s'accumule dans le cytoplasme formant ainsi des agrégats cytoplasmiques. Ces agrégats co-localisent avec les marqueurs des GS [46, 53], indiquant que cette protéine pourrait avoir des fonctions de régulation de la transcription, de la stabilité des ARNms et la disponibilité des microARNs [53] (**Figure 2.6**). Par ailleurs, une inhibition de l'ARN polymérase II provoque aussi une accumulation

cytoplasmique de FUS suggérant que le produit de l'ARN polymérase II fait partie du complexe que FUS forme avec des ARNs [49, 51].

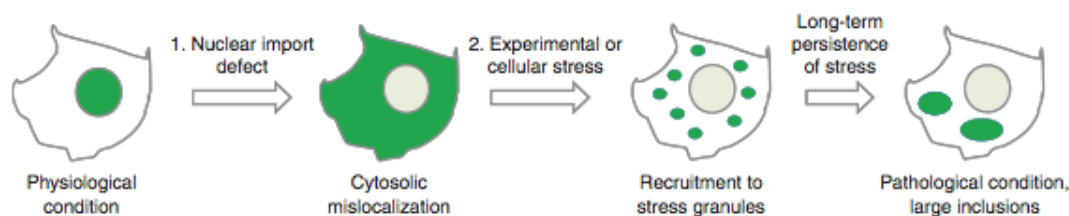


Figure 2.6 : Modèle de pathologie associé à FUS. [54]

La couleur verte représente la distribution de FUS.

Plus de 40 mutations de FUS ont été décrites à ce jour sur environ 5% des cas familiaux et un faible nombre de cas sporadiques de SLA [17]. Plus récemment des mutations rares chez des patients atteints de DLFT ont été identifiées [55]. Des mutations dans la région C-terminale de FUS de patients SLA sont en cause dans l'altération de son interaction avec les transportines (récepteurs d'import nucléaire), et interfèrent avec le trafic nucléaire de la protéine [47].

Les mutations les plus récurrentes de FUS dans les cas de SLA sont la R521C et la R521G, présentes sur 3 des 17 familles initialement analysées lors de la mise en évidence de l'implication de FUS dans la SLA. La mutation faux-sens R521G provoque une circulation aberrante de FUS provoquant sa rétention cytoplasmique, ainsi qu'une augmentation de son insolubilité accompagnée d'une diminution de sa solubilité dans le noyau [15]. Cette mutation pourrait ainsi potentiellement altérer les processus essentiels pour lesquels FUS est impliquée, établissant un mécanisme de « perte de fonction » [39]. Il semblerait que la mutation R521C augmente la probabilité de développer la SLA à un plus jeune âge comparé à d'autres mutations ou d'autres cas de SLA sporadiques [55].

L'étude *in vitro* d'une forme mutante de FUS dont l'activité du NLS est manquante montre que FUS se trouve relocalisée vers le cytoplasme et se lie aux GS pour aller s'assembler avec ceux-ci [46, 47]. Ainsi, des perturbations au niveau de la régulation transcriptionnelle et du métabolisme des ARNms via la formation inappropriée/excessive des GS seraient cruciales dans les pathologies associées à FUS [47]. Les altérations au niveau des GS observées dans ce cas pourraient mener à une maturation aberrante des ARNs, et ainsi perturber ou inhiber la traduction des ARNs en établissant un mécanisme de « gain de fonction » [39].

Malgré la quantité grandissante d'informations rapportées au cours des dernières années, le mécanisme de pathogenèse lié à FUS est encore peu défini. FUS présente des similarités structurales (RRM et la région riche en glycine) avec TDP-43 dont les caractéristiques et fonctions ont été décrites précédemment, cependant, le mécanisme de développement de maladies liées à la toxicité de FUS reste encore assez mystérieux.

II.3. Les protéinopathies associées à TDP-43 et FUS/TLS : vers un mécanisme commun ?

L'expression génique fut longtemps considérée comme consistant en l'enchaînement de plusieurs événements débutant par la synthèse d'ARN suivie par son épissage, et s'achevant avec la production d'ARNms matures traduits dans le cytoplasme. La découverte de protéines multifonctionnelles liant l'ARN a depuis permis de relier la transcription, la maturation, le transport et la traduction des ARNs, en un mécanisme cellulaire finement régulé. Des dysfonctionnements affectant les systèmes de contrôle de la qualité des ARNs dans les cas de mutants TDP-43 et FUS seraient une

caractéristique commune des processus pathologiques impliqués dans le développement de maladies du motoneurone [46, 47].

L'ensemble des informations recueillies à ce jour à propos de la SLA laisse à penser que cette maladie n'affecte pas seulement le système moteur mais plutôt qu'il s'agit d'une protéinopathie neurodégénérative multisystème associée à TDP-43 ou à FUS. Cette protéinopathie affecterait à la fois les neurones et les cellules gliales [56, 57]. En ce qui concerne TDP-43, les protéinopathies qui lui sont associées peuvent être divisées en deux groupes : les protéinopathies associées à TDP-43 dites « pures » où seulement TDP-43 s'accumule dans le cerveau en tant que protéine pathologique ; et les protéinopathies dites « combinées », pour lesquelles on observe des agrégats composés de diverses protéines [58]. La SLA et la DFLT sont aussi des protéinopathies associées à FUS [47]. Il existe encore peu d'évidences en faveur d'un mécanisme moléculaire précis des protéinopathies associées à ces protéines de liaison à ARN, mais ce terme en lui-même permet d'élargir l'impact de l'étude de TDP-43 et FUS dans le cadre de maladies autres que la SLA.

Malgré les similarités de structure et de fonction existantes entre TDP-43 et FUS, les inclusions de TDP-43 sont absentes dans les cas de SLA avec mutations de FUS [55]. De plus, il est peu probable que la protéine FUS mutante interagisse directement avec la protéine TDP-43 dans la formation des GS. Cependant, il n'est pas exclu qu'une accumulation anormale de TDP-43 puisse affecter la distribution cellulaire de FUS [47]. Il semblerait qu'une fraction de TDP-43, et plus particulièrement sa forme mutante, interagisse avec FUS même en l'absence d'agrégats nucléaires de cette dernière. De ce fait il semble que des mutations de TDP-43 peuvent perturber la fonction « normale » de FUS, et représenter ainsi un événement précoce. Ceci permettrait encore une fois de

penser à une convergence des voies pathogéniques de TDP-43 et FUS dans le développement de la SLA [38]. En lien avec cette observation, la question qui persiste est de savoir si l'association entre TDP-43 mutante et FUS pourrait affecter les cibles ARNs de TDP-43, de FUS, ou des deux à la fois. Enfin, TDP-43 semble crucial dans le maintien du niveau basal de 239 ARNs parmi lesquels on retrouve ceux de FUS. Cette observation a ainsi identifié un nouveau composant de vulnérabilité neuronale dérivée de la déplétion de TDP-43, et démontre que FUS est une cible directe de TDP-43 [26].

A ce jour, l'étiologie de la SLA est encore assez peu comprise dans certains cas bien qu'elle tende à être multifactorielle. Le fait que TDP-43 et FUS soient capables de s'associer aux GS augmente les possibilités que la vulnérabilité des motoneurones dans la SLA puisse être en partie liée à une altération dans la réponse à certains stress cellulaires [59]. En effet, la localisation de FUS et TDP-43 au sein des GS résulterait d'une exposition aigue au stress oxydatif, au stress du RE et à des chocs thermiques [59].

La capacité de réponse au stress d'une cellule est un paramètre déterminant dans la viabilité cellulaire. En effet, en état d'homéostasie l'ensemble des processus cellulaires est en équilibre dynamique. La perturbation de cette homéostasie est à l'origine du stress [60]. La cellule a la capacité de répondre au stress de plusieurs façons allant de l'activation de voies de signalisations en faveur de la survie, à celle de voies de mort cellulaire programmée qui permettent l'élimination des cellules endommagées [61]. Actuellement, l'exposition au stress oxydatif est mise en avant comme voie de signalisation jouant un rôle important dans la mort sélective des motoneurones et la dégénérescence des régions cortico-spinales qui en résultent [62]. Celui-ci survient lors

d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives à l'oxygène et la capacité du système à se défaire ou réparer les dommages causés. La production d'espèces réactives à l'oxygène est connue pour augmenter avec l'âge, principalement due à une hausse des « fuites » de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce phénomène est d'ailleurs reconnu comme étant une cause majeure du vieillissement [6]. L'évidence de l'implication du stress oxydatif comme mécanisme central par lequel la mort des motoneurones surviendrait fut renforcée par l'observation de marqueurs de dommages du stress oxydatif dans la moelle épinière et le liquide cébrospinal de patients atteints de SLA [6]. Dans cette optique, la mort des motoneurones a été principalement attribuée à un dysfonctionnement mitochondrial [4, 62]. En accord avec cette hypothèse, des expériences réalisées avec la forme mutante de TDP-43 sur des lignées cellulaires de motoneurones présentent une toxicité cellulaire accrue aboutissant à un dysfonctionnement mitochondrial et une lésion oxydative [62]. Toutefois, un débat persiste quant à savoir si le stress oxydatif constitue effectivement une cause primaire de neurodégénérescence, ou s'il s'agit seulement d'une conséquence d'autres lésions toxiques préexistantes [6].

L'activation de la réponse au stress a pour conséquences l'activation et la synthèse de chaperonnes moléculaires dont la plupart sont aussi appelées protéines de choc thermique ou « Heat Shock Proteins » (HSP). Celles-ci fournissent une réponse au stress généralisée permettant de « réparer » les protéines endommagées [63]. Des expositions répétées au stress induisent l'accumulation de dommages cellulaires et affectent la capacité d'adaptation de la cellule [64]. Au cours des dernières années, l'implication de la réponse UPR (Unfolded Protein Response) dans le développement de la SLA a été largement mise en évidence [65]. En effet, la réponse UPR est un

mécanisme d'auto-défense mis en place afin de réduire la quantité de protéines qui présentent un repliement anormal. Ce phénomène a également lieu au sein de cellules saines pour lesquelles environ 30% des protéines nouvellement synthétisées adoptent une mauvaise conformation [65]. Cette réponse implique l'induction des chaperonnes du RE dans le but d'augmenter la capacité de repliement correct des protéines, ainsi que l'induction de gènes impliqués dans la voie de dégradation des protéines associée au RE (voie ERAD). En effet, le RE représente un site de traduction, repliement et transport des protéines membranaires et sécrétées. Malgré la présence de chaperonnes du RE telles que HSP70/BiP qui aident au bon repliement des protéines, une quantité importante de protéines nouvellement synthétisées adopte une mauvaise conformation tridimensionnelle. Ces chaperonnes peuvent aussi diriger ces protéines qui présentent un repliement anormal vers la voie de dégradation ERAD afin de les éliminer [60]. Dans les cas sporadiques de patients SLA, des marqueurs du stress du RE et une réponse UPR particulièrement élevés sont retrouvés au niveau de la moelle épinière [66, 67]. Des mutations faux sens peuvent d'ailleurs provoquer une augmentation du mauvais repliement protéique, générant un stress du RE sévère et une accumulation de protéines non/mal repliées causant à leur tour un stress du RE fatal [65].

Finalement, un des défis à venir sera certainement l'identification de voies de signalisation moléculaires communes à TDP-43 et FUS (**Figure 2.7**), ainsi que celles en relation avec les autres gènes impliqués dans la SLA, et qui mènent à cette maladie dévastatrice. L'ensemble des données génétiques et post-mortem suggère l'existence d'un mécanisme pathophysiologique ubiquitaire dans le développement de la SLA et soutient encore un peu plus l'hypothèse d'un mécanisme commun à la base de la

dégénérescence des motoneurones associée à des formes mutantes de FUS et de TDP-43 [55].

Parmi les hypothèses avancées, l'une d'elles se base sur le mauvais repliement et l'agrégation de TDP-43 ou FUS, comme cause de l'altération des fonctions cellulaires normales menant à une prédisposition des autres protéines à s'agréger [58]. Afin de tester l'ensemble des hypothèses, la communauté scientifique a développé une grande variété d'organismes modèles allant de la levure aux rongeurs, en passant par le nématode. En effet, l'utilisation de ces modèles aux cours des dernières années a déjà permis une meilleure évaluation du potentiel pathogénique de TDP-43 et FUS.

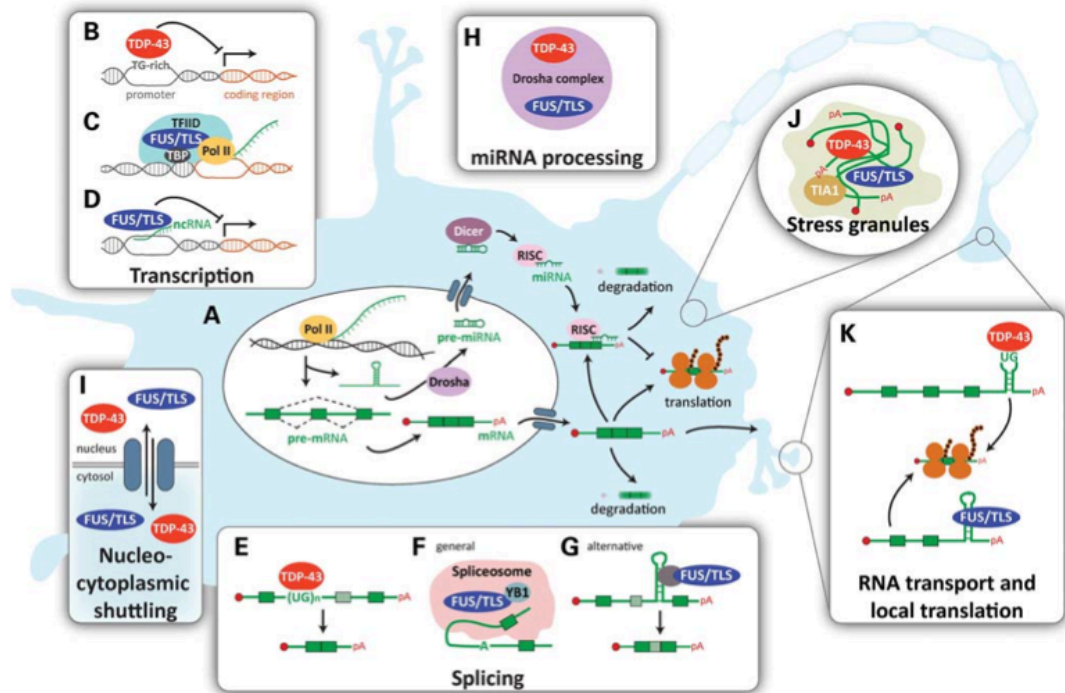


Figure 2.7 : Rôles pathophysiologiques de TDP-43 et FUS/TLS proposés. [17]

(A) Résumé des étapes principales de la maturation de l'ARN depuis la transcription jusqu'à la traduction ou la dégradation. (B), (C) et (D) Implications de TDP-43 et FUS/TLS dans la transcription. (E), (F) et (G) Rôles de TDP-43 et FUS/TLS dans l'épissage de pré-ARNms. (H) TDP-43 et FUS/TLS dans la maturation des miARNs. (I) Circulation nucléo-cytoplasmique de TDP-43 et FUS. (J) Recrutement de TDP-43 et FUS/TLS dans les GS. (K) TDP-43 et FUS sont impliquées dans le transport d'ARNms.

Abréviations : miARNs, micro-ARN

III. Le Modèle *C. elegans*

TDP-43 et FUS/TLS ont été hautement conservés au cours de l'évolution et la comparaison de leurs séquences protéiques en acides aminés montre un degré de similarité frappant, allant de l'humain au ver *C. elegans*, en passant par la souris et la *Drosophila* [18, 68]. De ce fait, de nombreuses tentatives visant à développer des modèles de protéinopathies associées à TDP-43 ou à FUS ont été réalisées.

III.1 *C. elegans* : modèle *in vivo* de maladies neurodégénératives

L'espèce *Caenorhabditis elegans* fut décrite pour la première fois en 1900 à Alger par Émile Maupas qui s'intéressait à son mode de reproduction hermaphrodite. Puis, un tournant décisif eut lieu au début des années 1960 avec Sydney Brenner, généticien ayant travaillé sur les phages et les bactéries. Il cherchait un organisme multicellulaire qui permettrait une approche génétique du développement et du système nerveux. Grâce à son temps de génération court (3,5 jours), son mode de reproduction hermaphrodite, sa capacité de congélation, mais aussi sa transparence et l'invariance de son lignage, *C. elegans* constitue un animal multicellulaire facile d'emploi pour la génétique. Son utilisation comme système modèle se justifie par la conservation des molécules et des interactions moléculaires au sein du règne animal. Dans l'optique de la compréhension des maladies humaines *C. elegans* représente un modèle excellent lorsqu'un gène homologue existe, à la fois pour trouver par génétique classique ou tester par génétique inverse des partenaires moléculaires d'interactions fonctionnelles. Les rôles et fonctions de TDP-43 et FUS étant encore mal compris à ce jour, nous avons décidé de nous tourner vers ce modèle simple pour mener notre étude.

D'autre part, le système nerveux du ver *C. elegans* est très développé et constitué de 302 neurones chez l'adulte, dont 26 motoneurones GABAergiques où s'exprime spécifiquement le gène *unc-47* (**Figure 2.8**). Le GABA (acide gamma-aminobutyrique) est le principal inhibiteur neuronal de *C. elegans*, et l'ablation des neurones GABAergiques aboutit au développement de vers dont la locomotion est altérée [69]. La SLA étant une maladie du motoneurone ces informations nous mènent à penser que ce modèle serait cohérent pour l'étude du développement de cette maladie.

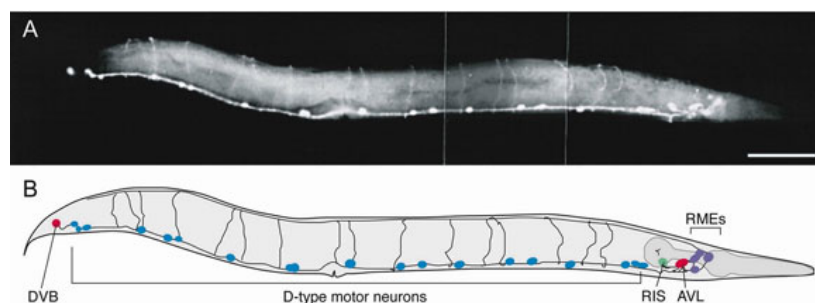


Figure 2.8 : Distribution des neurones exprimant *unc-47* [70].

GFP (Green Fluorescent Protein) est exprimée dans les corps cellulaires et les axones des 26 neurones GABAergiques.

tdp-1, l'homologue *C. elegans* de TDP-43 présente 38% d'identité et 57% de similarité avec TDP-43 [71]. Le poids moléculaire prédit pour TDP-1 est de 45.5 kDa [72], assez proche des 43 kDa de la protéine humaine. En revanche TDP-1 ne possède pas de domaine riche en glycines dans la région C-terminal [72]. Le plus haut degré de similarité entre TDP-43 et TDP-1 semble être localisé dans la région correspondant aux motifs supposés RRM1 et RRM2 dont nous avons déjà décrit les caractéristiques dans la partie II.1.1. [72]. Par ailleurs, la surexpression neuronale de TDP-1 génère des

mouvements désunis chez le ver, tandis que la délétion du gène *tdp-1* n'a d'impact ni sur le mouvement ni même sur les synapses des motoneurones [73]. Il existe deux mutations du gène *tdp-1*, les délétions *ok803* et *ok781* [71]. Toutefois, nous ne connaissons pas encore concrètement sa fonction au sein de *C. elegans*. C'est pourquoi au cours de notre étude nous tenterons différentes approches afin de mieux définir et comprendre le rôle de *TDP-1* dans la longévité et la réponse au stress, notamment via l'utilisation du mutant *ok803*.

fust-1, homologue de FUS chez *C. elegans* reste encore très peu étudié. Nous savons que ce gène possède 38% d'identité et 56% de similarité avec son homologue humain FUS, mais de nombreuses questions persistent quant à sa fonction. Tout comme FUS, FUST-1 présente un domaine RRM et une structure en doigt de zinc conservée, suggérant une possible conservation de ses fonctions à travers l'évolution. De plus, il existe une mutation de ce gène chez le ver, la délétion *tm4439*, dont les conséquences n'ont pas encore été décrites sur la réponse au stress et la longévité.

Des modèles transgéniques *C. elegans* exprimant TDP-43 ont déjà été développés au cours des dernières années. Ceux-ci se basent sur l'expression du gène TDP-43 fusionné à la protéine GFP dans l'intégralité du système nerveux du ver. L'expression de TDP-43 humaine sauvage dans tous les neurones du ver provoque des déficits moteurs [73-75]. Ces modèles évoquent certaines caractéristiques de la SLA et de la DLFT-U : un déclin de la fonction motrice avec l'âge, une longévité diminuée, ainsi que la dégénérescence des motoneurones. La protéine TDP-43 y est retrouvée au sein de dépôts protéiques insolubles, hyperphosphorylée, tronquée et ubiquitinylée [74]. Les résultats obtenus avec certaines de ces souches démontrent que la neurotoxicité de

TDP-43 *in vivo* peut résulter d'une activité nucléaire, conséquence directe de la surexpression de cette protéine [73].

On compte un seul modèle *C. elegans* transgénique FUS/TLS publié exprimant FUS sauvage ou mutante (mutations reliées à des patients atteints de SLA) fusionnée à GFP et sous le contrôle d'un promoteur pan neuronal. Au sein de ce modèle, seule l'expression des formes mutantes de FUS ont pour conséquence une localisation cytoplasmique associée à un dysfonctionnement moteur progressif et une diminution de la longévité. Les données collectées suggèrent que les mutations de FUS causent un dysfonctionnement neuronal via un gain de fonction dominant généré soit par les agrégats neurotoxiques de FUS mutant dans le cytoplasme, soit par un dysfonctionnement de son activité de liaison à l'ARN [76].

D'autres organismes modèles ont aussi été utilisés et étudiés dans le but d'élucider les mécanismes de développement de la SLA et des autres protéinopathies liées à TDP-43 ou FUS.

III.2 Autres organismes modèles de maladies liées à TDP-43 ou FUS/TLS

En dehors des modèles *C. elegans*, nous pouvons remarquer une multiplicité de tentatives de modélisation de la SLA et autres protéinopathies dans la littérature via l'utilisation d'organismes modèles allant de la levure aux rongeurs.

Parmi ces nombreux organismes modèles, certains ont été établis via l'utilisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les modèles de levure développés présentent plusieurs caractéristiques des protéinopathies humaines liées à TDP-43, incluant le

changement de localisation de la protéine [77, 78]. Certains ont été utilisés afin de réaliser un criblage de modificateurs de toxicité de TDP-43 [79]. L'utilisation de *S. cerevisiae* pour évaluer la toxicité liée à FUS montre que FUS est associée à un niveau d'expression plus élevé et l'accumulation de FUS au sein d'agrégats cytoplasmiques [80]. Les résultats observés avec ces souches de levure indiquent que FUS et TDP-43 présentent une forte propension à co-agréger [80, 81].

Le développement d'un modèle de poisson zébré exprimant des formes mutantes de TDP-43 humaine a confirmé que ces mutations confèrent des propriétés toxiques à la protéine TDP-43. En effet, l'expression de formes mutantes de TDP-43 cause un phénotype moteur dans les embryons de poissons zébrés via des mécanismes moléculaires impliquant à la fois un gain et une perte de fonctions toxiques [82]. Ce même groupe a examiné les conséquences de l'expression de FUS sauvage et mutante ainsi que leur interaction avec les gènes TARDBP et SOD1. Les lignées transgéniques mutantes ainsi créées présentent un phénotype moteur semblable, révélant une voie génétique commune pour FUS et TARDBP *in vivo* (avec FUS agissant potentiellement en aval de TARDBP) mais indépendante de SOD1 [83].

Plusieurs modèles TDP-43 de *Drosophila* présents dans la littérature exprimant TDP-43 humaine montrent l'importance du contrôle des niveaux relatifs de cette protéine [84], la surexpression de TDP-43 étant suffisante en elle-même pour causer la formation des agrégats protéiques et la perte neuronale [85]. À l'inverse, des mouches qui ne possèdent pas leur homologue TDP-43 présentent des déficiences dans leur capacité de déplacement, une longévité réduite, ainsi que des défauts anatomiques au niveau des jonctions neuromusculaires [86]. Ces résultats indiquent que les troubles neurologiques observés chez les patients atteints de SLA ne seraient pas seulement dus à

la formation de fragments protéiques insolubles de TDP-43, mais seraient aussi le résultat d'une perte de fonction dans le noyau.

Des modèles transgéniques TDP-43 de souris de SLA ou DLFT-U présentent un apprentissage/mémoire affaiblis, un dysfonctionnement moteur progressif, une atrophie de l'hippocampe [87, 88], une accumulation de TDP-43 dans le noyau et des agrégats cytoplasmiques ubiquitinylés et phosphorylés [88, 89]. L'étude de ces modèles montre qu'une augmentation de TDP-43 dans la partie antérieure du cerveau est suffisante pour provoquer la neurodégénérescence via un mécanisme de gain de fonction [87, 89].

L'expression de TDP-43 chez le rat provoque rapidement des symptômes très proches de ceux observés dans la SLA : une paralysie au niveau des pattes arrières et un affaiblissement des muscles, ainsi qu'une mortalité au bout de quatre semaines. Les protéines des tissus de ces rats ne sont pas ubiquitinyllées et ont permis de suggérer que le simple fait d'altérer la fonction nucléaire de TDP-43 peut causer la maladie [90]. La surexpression de FUS mutante chez le rat induit une paralysie progressive comparable aux cas de SLA [91]. Ces rats transgéniques développent une paralysie secondaire à la dégénérescence des axones moteurs suggérant que la forme mutante de FUS est plus toxique pour les neurones que la sauvage, et que l'augmentation de l'expression de FUS sauvage est suffisante pour induire la mort des neurones [91].

Finalement, la principale leçon à tirer de plusieurs de ces modèles concerne la régulation des niveaux d'expression de TDP-43 et FUS, sauvages ou mutantes. Leur expression doit être finement régulée car une surexpression ou une sous-expression peuvent avoir de lourdes conséquences sur la longévité et la capacité de déplacement [23]. Enfin, la construction de ces modèles est basée sur la perspective de les utiliser

comme outils aidant à la compréhension des mécanismes de toxicité mettant en jeu TDP-43 et/ou FUS.

IV. But de cette étude

À ce jour, les implications de TDP-43 et FUS dans la SLA et d'autres neuropathologies restent encore très peu définies et les mécanismes de protéotoxicité leur étant associés mystérieux.

Hypothèse : Notre travail repose sur l'hypothèse que TDP-43/TDP-1 régule la longévité, la réponse au stress, et la protéotoxicité liée au vieillissement.

Nous sommes donc amenés à nous demander quel est le rôle de TDP-43 et FUS dans le vieillissement, la réponse au stress et la neurodégénérescence ? Afin de répondre à cette question et dans le but d'explorer le rôle biologique de TDP-43/TDP-1 nous nous sommes tournés vers le système modèle *C. elegans*. Il s'agira donc d'étudier :

1. La fonction biologique « normale » de TDP-43/TDP-1 dans le vieillissement et la réponse au stress, via l'utilisation de vers mutants.
2. Le rôle pathobiologique de TDP-43 en évaluant la toxicité associée à l'expression de mutations dominantes des protéines TDP-43 et FUS/TLS humaines dans les motoneurones du ver.

Malgré les modèles *C. elegans* de SLA déjà disponibles à ce jour, très peu de renseignements sur la fonction du gène *tdp-1* endogène liée au vieillissement (longévité et réponse au stress) y sont rapportés. À travers cette étude nous nous pencherons sur ces aspects et détaillerons l'importance de *tdp-1* comme élément de la réponse au stress. Nous avons aussi entrepris le développement de nouveaux modèles transgéniques TDP-43 et FUS dont les caractéristiques seront énoncées au cours de cette étude. En effet, nous désirions avoir en notre possession des modèles *C. elegans* non étiquetés présentant

un phénotype à l'âge adulte seulement, moins précoce et moins généralisé que ceux observés dans les autres modèles de ver existants. Nous évaluerons ainsi la toxicité liée à l'expression de TDP-43 et FUS humaines dans les motoneurons du ver, et utiliserons ces souches lors de criblages génétique et pharmacologique.

Finalement, le principal objectif de ce projet réside dans le développement de souches modèles *C. elegans* de SLA capables de réunir plusieurs caractéristiques semblables à celles présentes chez les patients atteints de cette maladie. Nous souhaiterions ainsi comprendre les mécanismes de toxicité liée au phénotype moteur ou aux empreintes biologiques de la SLA.

B. Matériels et Méthodes

Souches *C. elegans*

Les souches de Nématodes ont été reçues du Centre de Génétique *Caenorhabditis elegans* CGC (St Paul, MN), excepté lorsqu'indiqué autrement. Toutes les souches ont été maintenues selon les méthodes habituelles sur boîtes de pétriensemencées avec la bactérie *E. coli* OP50. Les mutants utilisés dans cette étude sont les suivants : *tdp-1(ok803)* croisé cinq fois avec N2 avant usage, *daf-2(e1370)*, *daf-16(mu86)*, *xqls93Ptdp-1::TDP-1::GFP*, *gas-1(fc21)*, *gpls1[hsp-16-2::GFP]*, *let-60(ga89)*, *ire-1(zc14) II*; *zcls4*, *xbp-1(zc12)*; *zcls4*, *xqls98[unc-47::FUS[S57Δ];unc-119(+)]*, *xqls133[unc-47::TDP-43[A315T];unc-119(+)]*, *zcls4[hsp-4::GFP]*, *zcls9[hsp-60::GFP]*, *zcls13[hsp-6::GFP]*, *unc-47::GFP*, *unc-47(e307)* et *unc-47(gk192)*.

Test de progéniture

Dix vers synchronisés au stade larvaire L4 ont été cultivés sur un milieu de culture agar NGM (Nematode Growth Media). (Un animal/boîte de pétri) Les vers sont placés une nuit à 20°C pour pondre leurs œufs. Les deux jours suivants les vers sont transférés individuellement sur une nouvelle pétri : les larves L1 sont comptées sur chacune des dix pétris.

Test de Longévité

Soixante vers synchronisés au stade larvaire L4 ont été cultivés sur un milieu de culture agar NGM (vingt vers/pétri) et trois expériences indépendantes ont été réalisées. Les différents tests ont été effectués à 20 et 25°C. Lors des tests de longévité avec Bleu de Méthylène les vers ont été cultivés sur milieu NGM ou NGM+ 60 μM de Bleu de

Méthylène puis transférés sur milieu NGM-5-fluorodexyuridine (FUdR, 12,5 mg/ml) ou NGM-FUdR + 60 μ M de Bleu de Méthylène, à 20°C. Tous les deux jours les vers sont comptés à partir du stade adulte jour 1, jusqu'à leur mort. Les vers sont déclarés morts s'ils ne répondent à aucun stimulus (tactile ou thermique).

Expériences d'ARNi

Les souches traitées à l'ARNi ont été cultivées sur pétriensemencées avec la bactérie *E. coli* (HT115) contenant les clones ARNi suivants : le contrôle vecteur vide, Empty Vector (EV) ; *tdp-1* (F44G4.4) ; et *hsp-4* (F43E2.8). Tous les clones proviennent de la librairie ARNi ORFeome (Open Biosystems). Les expériences ARNi ont été réalisées à 20°C. Les vers ont été cultivés sur milieu NGM enrichi avec 1mM d'Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Pour les tests de longévité, les vers sont cultivés sur pétri ARNi contenant du FUdR à partir du 1^{er} au 7^{ème} jour du stade adulte. Les vers sont déclarés morts s'ils ne répondent à aucun stimulus (tactile ou thermique). (Vingt vers/pétri et en trois exemplaires)

Test de formation de vers « dauer »

Des vers jeunes adultes *daf-2(e1370)* sont placés une nuit à 20°C afin de pondre leurs œufs. Les œufs sont ensuite placés à 25°C et la formation de vers dauer est comptée cinq jours plus tard. Trois expériences distinctes ont été réalisées sur différents jours.

Expériences de réponse au stress

Les tests de stress ont été réalisés à 20°C (stress oxydatif et osmotique), à 25°C (test d'hypoxie) et à 37°C (stress thermique). Les vers ont été cultivés sur milieu NGM et transférés au stade adulte Jour 1 sur milieu NGM + 240 μ M Juglone (stress oxydatif), ou

NGM + 10mM de peroxide d'hydrogène (stress oxydatif), ou NGM + 400mM NaCl (stress osmotique), ou NGM + 611mM Sorbitol (stress osmotique).

Pour les expériences de réponse au stress avec Bleu de Méthylène : pour les tests de stress oxydatifs les vers ont été cultivés sur milieu NGM ou NGM + 60 μ M de Bleu de Méthylène puis transférés au premier jour du stade adulte sur milieu NGM + 240 μ M Juglone ; pour la résistance au stress thermique les vers ont été cultivés sur NGM ou NGM + 60 μ M de Bleu de Méthylène puis placés au stade adulte jour 1 à 37°C ; pour la résistance au stress osmotique les vers ont été cultivés sur milieu NGM ou NGM + 60 μ M de Bleu de Méthylène puis transférés au premier jour du stade adulte sur gélouses contenant 400mM NaCl.

Pour le stress oxydatif la survie des vers est évaluée toutes les trente minutes pendant les deux premières heures, puis toutes les deux heures jusqu'à quatorze heures. Pour les autres tests de stress les comptages se font toutes les deux heures du début à la fin. Les nématodes sont déclarés morts s'ils ne répondent à aucun stimulus (tactile ou thermique). Enfin, pour tous les tests vingt vers/pétri en trois exemplaires ont été utilisés, et trois expériences indépendantes réalisées.

Pour l'expérience d'irradiation aux Ultra-violets (UVs), des vers au premier jour du stade adulte ont été transférés sur milieu NGM sans source de nourriture (vingt vers/plates, en trois exemplaires) et exposé aux UVs (1200 J/m²). Les vers ont ensuite été transférés sur milieu NGMensemencé avec bactéries OP50 et comptés toute les deux heures jusqu'à quatorze heures après irradiation.

Test de composés chimiques sur agar

Les vers ont été cultivés sur géloses NGM avec ou sans composés. Les vers exprimant *mutFUS* ou *mutTDP-43* sont considérés paralysés s'ils ne répondent à aucun stimuli tactiles ou thermiques. Les vers sont comptés morts lorsqu'incapables de bouger leur tête après stimulus sur le nez et lorsque leur pharynx ne pompe plus de nourriture.

Expériences avec les souches sensibles à la température

Afin de compter le nombre de progéniture des souches *gas-1(fc21)* et *let-60(ga89)*, cinq vers L4 synchronisés ont été cultivés sur milieu NGM ou NGM + 60µM de Bleu de Méthylène (1 animal/pétri) puis placés à 15, 20 et 25°C toute une nuit afin de pondre leurs œufs. Les deux jours suivants les vers sont transférés individuellement sur une nouvelle pétri : les larves L1 sont comptées sur chaque pétri.

Construction des souches

Le système Gateway (Invitrogen) promoteur *tdp-1* et les clones du plasmide contenant le cadre de lecture de *tdp-1* ont été obtenus de Open Biosystems et recombinaisonnés avec le plasmide pDES-MB14 (don généreux de M. Vidal, Harvard), puis vérifiés par séquençage dans le but de créer un plasmide *tdp-1::TDP-1::GFP*. Le plasmide a été injecté à une concentration de 5 ng/µl à des vers *unc-119(ed3)* et les vers de phénotype sauvage fluorescent vert ont été conservés. Le transgène a ensuite été intégré par irradiation aux Ultra-Violets. Diverses souches transgéniques stables ont ainsi été isolées et croisées avec N2 quatre fois avant utilisation. La souche utilisée dans cette étude est la suivante : XQ93[P_{tdp-1}::TDP-1::GFP].

Microscopie à fluorescence

Les vers ont été montés sur lame avec agarose 2%, immobilisés avec 5mM de Levamisole en solution dans du tampon M9. Les caméras Leica CTR 6000 et Leica DFC 480 ont été utilisées pour visualiser les différentes souches.

Afin de visualiser l'expression de TDP-1 des vers au stade larvaire L4 ont été cultivés sur un milieu NGM et transférés sur un milieu NGM + 240 μ M Juglone (stress oxydatif) ou milieu NGM + 400mM NaCl (stress osmotique), pendant 90 minutes et observés sous microscope à fluorescence décrit ci-avant. Les images de *TDP-1::GFP* ont été inversées en noir et blanc à l'aide du logiciel Photoshop afin de permettre de mieux apprécier l'expression et le contraste du signal. Afin de compter les axones des vers transgéniques *mutTDP-43* et *mutFUS*, des vers synchronisés au stade adulte jours 1, 5 et 9, permettant de visualiser les motoneurones in vivo. Un minimum de 100 vers a été comptabilisé pour chaque traitement sur 4-6 essais. La moyenne et l'écart type ont été calculés pour chaque essai, et le test de student-Fisher a été utilisé pour l'analyse statistique. Pour la visualisation des souches de choc thermique *hsp-4::GFP*, *hsp-6::GFP*, *hsp-60::GFP* et *hsp-16.2::GFP*, des vers au stade L4 ont été cultivés sur milieu NGM ou NGM + Bleu de Méthylène ou NGM + Salubrinal. Les L4 ont été laissé le temps d'une nuit sur les milieux contenant ou non les composés, examinés par fluorescence et les photos quantifiées pas densitométrie à l'aide du logiciel Photoshop (Adobe).

RT-PCR

L'ARN total a été extrait à l'aide du kit RNeasy Mini (QIAGEN) selon les indications du fabricant, et rétro-transcrit en ADNc à l'aide du kit QuantiTect (QIAGEN) selon les instructions du fabricant.

Primers

ctl-1 forward, AGGTCACCCATGACATCACCAAGT ; *ctl-1* reverse, GATTGCGCTT CAGGGCATGAATGA ; *ctl-2* forward, TTCGCTGAGTTGAACAATCCG ; *ctl-2* reverse, GTTGCTGATTGTCATAAGCCATTGC ; *tdp-1* forward, AAAGTGGGATCG AGTGACGAC ; *tdp-1* reverse, GACAGCGTAACGAATGCAAAGC ; *sod-3* forward, CGAGCTCGAACCTGTAATCAGCCATG ; *sod-3* reverse, GGGGTACCGCTGATAT TCTTCCACTTG ; *act-3* forward, GTTGCCGCTCTTGTTGTAGAC ; *act-3* reverse, GGAGAGGACAGCTTGGATGG.

Lysats de nématodes

Les vers ont été collectés avec du tampon M9, lavés trois fois avec du M9, et les culots placés à -80°C toute une nuit. Les culots ont été lysés dans le tampon RIPA (150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate) + 0.1% inhibiteurs de protéases (Leupeptine 10mg/ml, Pepastatine A 10mg/ml, Chymostatine 10mg/ml : LPC ;1:1000). Puis les culots ont été passés dix fois à travers une seringue 27_{1/2}G, soniqués (2 x 5min) et centrifugés 10 min à 16 000 g. Les surnageants ont été collectés et conservés.

Test de solubilité protéique

Afin d'obtenir les fractions solubles et insolubles de nématodes transgéniques TDP-43 et FUS, les vers ont été lysés dans un tampon d'extraction (1M Tris-HCl, pH 8, 0.5M EDTA, 1M NaCl, 10% NP40 + inhibiteurs de protéases (LPC ;1:1000)). Les culots ont été passés à travers une seringue 27_{1/2}G, soniqués (5 min) et centrifugés à 100 000 g pendant 5 min. Le surnageant soluble a été conservé et le culot resuspendu dans le tampon d'extraction, soniqué (5 min) et centrifugé à 100 000 g pendant 5 min. Le culot

en résultant a ensuite été resuspendu dans 100µl de tampon RIPA, soniqué jusqu'à ce qu'il soit resuspendu en solution puis conservé à -80°C

Quantification protéique

Tous les surnageants récoltés ont été quantifiés à l'aide du kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific), selon les instructions du fabricant.

Immunobuvardage de type Western

Les échantillons protéiques de vers en suspension dans le tampon RIPA ont été resuspendu directement dans 1X de tampon Laemmli (175µg/puits), migrés sur gels de polyacrilamide 10%, transférés sur membrane de nitrocellulose (BioRad) et immunobuvardés. Anticorps utilisés : anti-TARDBP lapin (1:200 ; Proteintech), anti-TLS lapin (1:200 ; Abcam) and anti-Actine souris (1:5000 ; MP Biomedical). La révélation a été réalisée en utilisant le kit de révélation ECL (Thermo Scientific). La quantification des films a été réalisée à l'aide du logiciel Photoshop (Adobe).

Statistiques

Pour les expériences de longévité et résistance au stress, les courbes de survie ont été générées et comparées par utilisation du test du log-rang (Mantel-Cox) ; 20-30 vers ont été testés pour chaque génotype et les tests répétés au moins trois fois. Pour les tests de comptes de progénitures, de formation des vers « dauer » et d'hypoxie, la moyenne et l'écart type ont été calculés pour chaque essai, et le test de student-Fisher a été utilisé pour l'analyse statistique.

C. Manuscrit**TDP-1/TDP-43 Regulates Stress Signaling and Age-Dependent Proteotoxicity****Alexandra Vaccaro^{1,2,3}, Arnaud Tauffenberger^{1,2,3} & J Alex Parker^{1,2,3*}**

¹CRCHUM, ²Centre of Excellence in Neuromics, ³Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Abstract

TDP-43 is a multifunctional nucleic acid binding protein linked to several neurodegenerative diseases including Amyotrophic Lateral Sclerosis. To learn about the normal biological and abnormal pathological role of this protein we turned to *Caenorhabditis elegans* and its orthologue TDP-1. We report that TDP-1 functions in the Insulin/IGF pathway to regulate longevity and the oxidative stress response downstream from the forkhead transcription factor DAF-16/FOXO3a. However, although *tdp-1* mutants are stress sensitive, chronic upregulation of *tdp-1* expression is toxic and decreases lifespan. ALS-associated mutations in TDP-43 or the related RNA binding protein FUS activate the unfolded protein response, generate oxidative stress leading to the *daf-16* dependent upregulation of *tdp-1* expression with negative effects on neuronal function and lifespan. Consistently, deletion of endogenous *tdp-1* rescues mutant TDP-43 and FUS proteotoxicity in *C. elegans*. These results suggest that chronic induction of wild type TDP-1/TDP-43 by cellular stress may propagate neurodegeneration and decrease lifespan.

Introduction

TDP-1 is the *C. elegans* orthologue of the multifunctional DNA/RNA binding protein TDP-43 (TAR DNA Binding Protein 43). Mutations and accumulations of TDP-43 have been found in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal Dementia, and intracellular TDP-43 protein accumulations are observed in a growing number of neurodegenerative disorders [1]. As part of its numerous roles in RNA metabolism, TDP-43 is a component of the cytoplasmic ribonucleoprotein complexes known as stress granules that form in response to environmental stresses like heat shock, oxidative and osmotic stress among others [2,3]. ALS is an age-dependent neurodegenerative disorder and given that TDP-43 is a stress responsive protein we hypothesized that TDP-1 may regulate the longevity and the cellular stress response.

In worms a major axis of stress-response signalling and longevity is the Insulin/IGF-signaling (IIS) pathway. IIS follows an evolutionarily conserved and genetically regulated pathway that regulates numerous processes including development, metabolism, fecundity, cellular stress resistance and aging [4]. In *C. elegans*, IIS initiates a phosphorylation cascade through the DAF-2/Insulin-IGF receptor that phosphorylates the forkhead transcription factor DAF-16 and retains it in the cytoplasm [5-8]. Hypomorphic *daf-2* mutants relieve DAF-16 phosphorylation causing DAF-16 to translocate to the nucleus where it activates a large number of genes resulting in increased lifespan and augmented stress resistance [9]. *daf-2* mutants are also resistant to numerous stresses including oxidative, osmotic, thermal and proteotoxicity [10]. The IIS pathway likely employs multiple mechanisms to combat a variety of cellular insults but little is known about how these separate functions are regulated by DAF-16.

We attempted to address this issue by asking whether TDP-1 participated in the cellular stress response and longevity pathways in *C. elegans*. We asked if TDP-1 participated in the IIS pathway to specify developmental, stress response, and longevity outcomes. Given the importance of human TDP-43 to neurodegeneration we also asked if *tdp-1* regulated age-dependent proteotoxicity. Our work points to TDP-1 as a key stress response protein at the crossroads of IIS, proteotoxicity and ER stress. Moreover, persistent induction of TDP-1 may actively promote neurodegeneration.

Results

tdp-1 Regulates Lifespan

Downregulation of DAF-2 extends lifespan and promotes stress resistance via regulation of DAF-16 transcriptional activity [9]. To determine if *tdp-1* participated in the IIS pathway we used a deletion mutant *tdp-1(ok803)* that removes the two RNA Recognition Motifs of TDP-1 (Figure S1A). *tdp-1(ok803)* mutants are superficially wild type but have reduced progeny numbers compared to wild type N2 controls (Figure S1B).

Looking directly at the IIS pathway and longevity, *daf-2(e1370)* animals were long-lived but this phenotype was significantly reduced in a *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* double mutant strain (Figure 1A). Conversely, *daf-16(mu86)* mutants were short-lived compared to wild type worms and the inclusion of *tdp-1(ok803)* did not further reduce *daf-16* mutants' lifespan (Figure 1A). We confirmed that *tdp-1* regulated *daf-2* mediated longevity with RNA interference and observed that *tdp-1(RNAi)* reduced the extended lifespan of *daf-2* mutants (Figure 1B). These data suggest that *tdp-1* regulates the lifespan phenotypes of reduced IIS and the inability of *tdp-1* to further reduce *daf-16* lifespan suggests that this effect is dependent on *daf-16*.

Surprisingly, despite *tdp-1(ok803)* limiting the extreme lifespan of *daf-2* mutants we observed that at 20°C *tdp-1(ok803)* mutants had a small but significant increase in lifespan versus N2 controls (Figure 1C). However this effect was lost when the worms were grown at 25°C (Figure 1D) suggesting that *tdp-1* may respond to stressful environmental conditions. Consistently, opposite to reducing *tdp-1* function, overexpression of TDP-1 fused to GFP from the endogenous *tdp-1* promoter (*tdp-*

lp::TDP-1::GFP) greatly reduced lifespan compared to wild type N2 worms and *tdp-1* deletion mutants (Figure 1E). The lifespan of a *tdp-1(ok803);TDP-1::GFP* strain was greater than *TDP-1::GFP* alone, but less than either N2 worms or the *tdp-1(ok803)* deletion mutant (Figure 1E). These data show that *tdp-1* has a dose-dependent effect on lifespan in worms and that lifespan is sensitive to *tdp-1* expression levels, which is consistent with studies of TDP-43 in flies [11] and mice [12] where overexpression also reduces lifespan.

tdp-1 is Essential for Resistance Against Oxidative and Osmotic Stress

Intimately linked to IIS regulation of lifespan in worms is dauer formation and stress resistance [4]. *daf-2(e1370)* mutant larvae show near complete dauer formation when grown at 25°C, but this phenotype was not altered in *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* mutants (Figure S2A) suggesting that *tdp-1* does not function in the dauer formation axis of IIS in worms.

To further define the role of *tdp-1* in the *in vivo* stress response, we challenged worms against juglone induced oxidative stress. Juglone is a natural product derived from the black walnut tree that raises intracellular oxide levels [13]. Adult wild type N2 worms transferred to juglone plates showed complete mortality after 14 hours, while *daf-2(e1370)* worms were completely resistant (Figure 2A). If *tdp-1* were required for protection against stress we would expect the mutant *tdp-1* worms to be hypersensitive to juglone-induced toxicity. Interestingly, *tdp-1(ok803)* mutants were more sensitive to juglone than N2 worms, and *tdp-1(ok803)* completely abolished *daf-2*'s resistance to juglone in the *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* double mutant strain (Figure 2A). To

corroborate the role of *tdp-1* in resistance to oxidative stress we used hydrogen peroxide, which is another oxidative stress enhancer. Tested on hydrogen peroxide plates we observed that *tdp-1(ok803)* animals were more sensitive than wild type N2 worms, and *tdp-1(ok803)* sensitized the normally resistant *daf-2* animals to stress-induced mortality (Figure 2B). These data show that *tdp-1* is required for *daf-2* mediated resistance to oxidative stress. Given the effect of *tdp-1(ok803)* on *daf-2* mutants' stress resistance compared to the lack of effect on dauer phenotypes we wondered if *tdp-1* might have a more specific role in the stress response axis of IIS.

Not all forms of stress are equal at the cellular level so we investigated several additional forms of cellular stress including hypertonic stress with elevated sodium chloride (NaCl), increased temperature, low oxygen and ultraviolet irradiation. Compared to N2 worms, *tdp-1* mutants were sensitive to hypertonic stress (Figure 2C). Interestingly, both *daf-2(e1370)* and *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* mutants were resistant to hypertonic stress suggesting that *tdp-1* may not function, or may function in parallel to the IIS pathway to regulate the response to osmotic stress (Figure 2C). To confirm this hypothesis we used sorbitol, another hypertonic stress producer, and similarly observed that *tdp-1(ok803)* mutants were sensitive to osmotic stress but *daf-2(e1370)* and *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* mutants were both resistant (Figure 2D). Finally, *tdp-1* had no discernable role in the response to thermal stress, hypoxia, or radiation since there was no difference between N2 and *tdp-1(ok803)* worms, as well as *daf-2(e1370)* and *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* mutants in response to these stresses (Figures S2B-D). Thus, *tdp-1* functions in the IIS pathway to specify the response to oxidative stress and lifespan, but *tdp-1* is dispensable for the regulation of hypertonic stress by the IIS pathway.

Stress and Low Insulin/IGF Signaling Induce TDP-1 Expression

Given the remarkable sensitivity of *tdp-1(ok803)* mutants to oxidative and osmotic stresses we next wanted to see if there were *in vivo* changes in TDP-1 expression in response to these two stress conditions. In wild type unstressed animals TDP-1::GFP is primarily nuclear and is expressed in most tissues (Figure 3A, Figure S3). We next tested if shifting TDP-1::GFP animals to either juglone or NaCl plates affected TDP-1::GFP expression. Young adult TDP-1::GFP worms were exposed to either juglone or NaCl for 90 minutes and live animals were examined for changes in TDP-1::GFP expression. Strikingly, exposure to oxidative or hypertonic stress greatly increased TDP-1::GFP expression compared to untreated control worms (Figure 3, B and C). Endogenous *tdp-1* was not required for expression of the TDP-1::GFP transgene since expression was induced by stress in *tdp-1(ok803)* deletion mutants (Figure 3, D to F).

Given that our TDP-1::GFP transgenics are potent stress reporters, using *daf-2* and *daf-16* mutants we tested if IIS regulated this effect. We observed that TDP-1::GFP was highly induced in the *daf-2(e1370);TDP-1::GFP* strain (Figure 3G) compared to TDP-1::GFP controls (Figure 3A). TDP-1::GFP remained elevated in *daf-2* mutants exposed to stress (Figure 3, H and I). Additionally, upon exposure to stress or low IIS TDP-1::GFP was no longer restricted to the nucleus and was observed in the cytoplasm (Figure S4).

Previous research has shown that the increased stress resistance of *daf-2* mutants is dependent on *daf-16* mediated nuclear transcription [14]. TDP-1::GFP was not upregulated by mutation in *daf-16* (Figure 3J). Next, to directly test if *daf-16* was essential for the stress dependent induction of *tdp-1* we exposed *daf-16(mu86);TDP-*

1::GFP transgenics to stress. Treatment with juglone failed to induce TDP-1::GFP expression in the *daf-16* mutants (Figure 3K). However, exposure to NaCl continued to induce TDP-1::GFP expression in *daf-16* mutants (Figure 3L). These data suggest that the IIS pathway regulates TDP-1 expression in response to oxidative stress but the response to osmotic stress is independent of *daf-16*, which is consistent with our data showing that *tdp-1* is not required for *daf-2*'s resistance to hypertonic stress (Figure 2, C and D). Additionally, the upregulation of TDP-1::GFP in *daf-2* mutants was abolished by *daf-16*(RNAi) directly linking the IIS pathway to *tdp-1* expression (Figure 3, M and N).

Stress resistance and lifespan phenotypes from low IIS requires nuclear localization of DAF-16 and transcriptional activation of target genes [6,9,14] but we observed that *tdp-1(ok803)* had no effect on DAF-16::GFP stress-induced nuclear localization (Figure S5). We next examined if DAF-16 targets implicated in oxidative stress signalling were affected by *tdp-1*. We used RT-PCR to examine expression levels of three DAF-16 genes including the catalases *ctl-1* and *ctl-2*, as well as the superoxide dismutase *sod-3* in various genetic backgrounds. First of all, no expression of *tdp-1* was observed in strains containing the deletion allele *tdp-1(ok803)* (Figure O). Next we observed that *ctl-1* and *ctl-2* expression levels were unaltered by the deletion of *tdp-1*, either alone or in combination with *daf-2(e1370)* (Figure 3O). However, we observed that *sod-3* expression was greatly reduced in *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* animals (Figure O). These data suggest that under low IIS conditions *tdp-1* is required for the expression of certain DAF-16 targets implicated in oxidative stress and may partially explain the sensitivity of *tdp-1* mutants to juglone and hydrogen peroxide.

Proteotoxicity Induces TDP-1 Expression

Common to many late neurodegenerative disorders is proteotoxic stress caused by misfolded proteins, and mutations in human TDP-43 are believed to cause proteotoxicity leading to neuronal dysfunction and cell death [15]. We examined this directly with a transgenic worm strains expressing human wild type and mutant TDP-43 in worm motor neurons [16]. These strains show adult-onset and age-dependent motility defects accompanied by motor neuron degeneration (Vaccaro et. al *under revision*). HSP-4 is a *C. elegans* hsp70 protein orthologous to mammalian Grp78/BiP, and the transgenic *C. elegans* HSP-4::GFP reporter is activated in response to misfolded proteins within the endoplasmic reticulum (ER), including chemically by compounds like tunicamycin (Figures 4, A and B). Using this reporter we observed that transgenic strains expressing wild type TDP-43 did not induce reporter expression whereas transgenics expressing mutant TDP-43 strongly induced HSP-4::GFP expression (Figures 5, C and D). These data indicate that mutant TDP-43 toxicity may activate the ER unfolded protein response (UPR^{ER}). We did not observe induction of GFP in reporter strains for the mitochondrial specific hsp70 genes *hsp-6* and *hsp-60* (Figure S6).

Since we identified TDP-1 as a stress responsive protein we wondered if it also responded to ER and proteotoxic stress. We noticed increased expression of TDP-1::GFP in worms grown on plates with the ER stress inducing compound tunicamycin compared to untreated controls (Figure 5, A and B). Looking at proteotoxic stress we observed that wild type TDP-43 had no effect on TDP-1::GFP expression while mutant TDP-43 strongly induced TDP-1 expression (Figures 5, C and D). To confirm that induction of TDP-1::GFP was due to protein misfolding and proteotoxicity and not an

artefact of mutant TDP-43 transgenes we examined another proteotoxicity model based on the expression of wild type and mutant human FUS in motor neurons (Vaccaro et. al *under revision*). FUS is a nucleic acid binding protein related to TDP-43 that has also been implicated in ALS and dementia and the expression of an ALS-linked FUS allele in *C. elegans* motor neurons produces degenerative phenotypes similar to mutant TDP-43 [17]. Similar to the TDP-43 model, we observed no effect on TDP-1 expression from wild type FUS but mutant FUS greatly induced TDP-1 expression (Figures 5, E and F). These data suggest that misfolded mutant TDP-43 and FUS initiate the UPR^{ER}, which in turn activates expression of TDP-1. Finally, activation of TDP-1 by ER stress converged on the IIS since induction of TDP-1::GFP expression by tunicamycin was blocked by a null mutation in *daf-16* (Figure 5G).

Oxidative Stress Links Mutant TDP-43 and FUS Proteotoxicity to DAF-16

A consequence of processing misfolded proteins within the ER is the production of reactive oxygen species as part of what is termed the integrated stress response [18]. Our data shows that *tdp-1* responds to oxidative stress in a *daf-16* dependent matter so we hypothesized that the ER stress produced from mutant TDP-43 and FUS may generate oxidative stress thus linking proteotoxicity to the IIS pathway. To test this hypothesis we stained our transgenic TDP-43 and FUS strains with dihydrofluorescein diacetate (DHF), a compound that fluoresces when exposed to intracellular peroxides associated with oxidative stress [18]. We observed no DHF signal from wild type TDP-43 and FUS transgenics but strong fluorescence from mutant TDP-43 and transgenics (Figures 6, A to D). These data suggest that in addition to activating the UPR^{ER} mutant

TDP-43 and FUS generate oxidative stress. To further establish the link between proteotoxicity and the IIS we examined the subcellular localization of DAF-16. DAF-16::GFP is typically cytoplasmic under non-stressed and/or low insulin signalling conditions (Figure 6E). However we observed nuclear localization of DAF-16 in a TDP-43[A315T];DAF-16::GFP strain indicating that mutant TDP-43 causes cellular stress that is transmitted by the IIS pathway (Figure 6F).

Deletion of Endogenous *tdp-1* Reduces Mutant TDP-43 and FUS Neuronal Toxicity

Although loss of *tdp-1* sensitizes worms to oxidative and osmotic stress, elevated and chronic expression of TDP-1 leads to decreased lifespan suggesting that the induction of TDP-1 by proteotoxicity may exacerbate neuronal toxicity and decrease neuronal survival. We tested this hypothesis directly by crossing TDP-1::GFP worms with our mutant TDP-43 and FUS transgenics and scored for survival and the onset of paralysis. We observed that TDP-43 and FUS strains containing the TDP-1::GFP transgene had significantly decreased lifespans compared to control transgenics (Figures 7, A and B). The expression of either mutant TDP-43 or FUS causes motility defects leading to progressive paralysis and strains also expressing TDP-1::GFP had accelerated rates of paralysis compared to single transgenic controls (Figures 7, C and D). These data suggest that induction of wild type TDP-1 expression by proteotoxicity has negative consequences on survival and neuronal function.

To rule out the possibility that the negative effects observed were simply due to transgene effects from TDP-1 overexpression we predicted that removing endogenous

TDP-1 would reduce proteotoxicity. To test this we constructed *TDP-43[A315T];tdp-1(ok803)* and *FUS[S57Δ];tdp-1(ok803)* double mutant strains and observed that these animals had a significantly lower rate of paralysis compared to single transgenic TDP-43 and FUS worms (Figures 8, A and B). The expression of mutant TDP-43 and FUS is accompanied by the age-dependent degeneration of motor neurons that was reduced in animals mutant for *tdp-1* (Figures 8, C and D). To examine if protein misfolding was reduced in *tdp-1(ok803)* strains co-expressing mutant TDP-43 or mutant FUS, we used a biochemical assay to detect protein aggregation. We homogenized protein extracts from transgenic worms and separated them into two fractions, supernatant (detergent-soluble) and pellet (detergent-insoluble) fractions. We observed no change in protein solubility after deletion of the endogenous *tdp-1* suggesting that the protective effects are not due to downregulation or clearance of mutant proteins (Figures 8, E and F).

Discussion

TDP-1 regulates lifespan and the oxidative stress response

This work identified *tdp-1* as a key stress responsive gene at the interface of longevity, stress resistance and neurodegeneration. The role of TDP-1 in lifespan is complex and suggests that worms like other species are sensitive to TDP-1/TDP-43 levels [19-22]. TDP-1 overexpression reduces lifespan while deletion of *tdp-1* in unstressed worms promotes a modest increase in lifespan but leaves worms sensitive to specific environmental stresses. We showed that TDP-1 specifies the response to cellular stress, here with roles in oxidative, osmotic and protein-misfolding stress but independent of high temperature, low-oxygen and damage from radiation.

tdp-1 expression is also induced by low IIS conditions and *tdp-1* mutants block the long-lived phenotype and resistance to oxidative stress of *daf-2* mutants. Importantly, these activities can be uncoupled from the IIS pathway's role in dauer formation. Although *daf-2* mutants are resistant to numerous forms of environmental stress it is not known how specificity is achieved. We show here that *tdp-1* is essential for *daf-2* mutants resistance to oxidative stress but *tdp-1* is dispensable *daf-2* mutants resistance to osmotic stress. This is consistent with studies showing that *daf-2* mutants are resistant to osmotic stress even though *daf-16* activity is not up-regulated [23] similar to the situation here where *tdp-1* expression under osmotic stress is independent of *daf-16*. Furthermore, only subsets of DAF-16 targets are required for protection against osmotic stress by the IIS pathway [23], suggesting that alternative and overlapping osmotic stress resistance pathways exist [24]. Finally, consistent with *tdp-1*

promoting oxidative stress resistance we observed down-regulation of the known DAF-16 target superoxide dismutase *sod-3* under low IIS conditions in *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* mutants suggesting that *tdp-1* may function post-transcriptionally.

Regulation of TDP-1 by Insulin/IGF Signalling Pathway

The role of TDP-1/TDP-43 in regulating IIS may have relevance to human diseases like ALS and dementia. Mutant TDP-43 is known to form cytoplasmic aggregates in ALS and accumulations of wild type TDP-43 is observed in a number of neurodegenerative disorders [1]. Furthermore, reduced IIS has been shown to suppress the toxicity of aggregate-prone proteins in several models [25-27]. Recent work has demonstrated communication and feedback between the IIS pathway and the ER stress response [28] and we've shown that *tdp-1* expression is regulated by both of these pathways. Given the importance of IIS and the ER stress response to cellular survival, our identification of TDP-1/TDP-43 as a key effector of these pathways may directly link IIS and the UPR^{ER} to ALS pathogenesis.

Proteotoxic Induction of Wild Type TDP-1 Promotes Neurodegeneration

TDP-43 is under intense investigation as mutant TDP-43 has been linked to ALS and dementia while the accumulation of wild type TDP-43 has been observed in a wide range of protein conformational pathologies [1]. Given that dysregulation of TDP-43 expression levels is toxic in numerous systems, the interaction between wild type TDP-43 with mutant proteins is an emerging area of interest.

The expression of mutant TDP-43 and FUS in worm motor neurons leads to activation of the UPR^{ER} presumably in cellular efforts to reduce the toxicity of misfolded proteins. As outlined in Figure 9, a further consequence of proteotoxicity is upregulation TDP-1 expression beyond the nucleus and into the cytoplasm. Although *tdp-1* is required for stress resistance, in our TDP-43 and FUS transgenics, elevated levels of TDP-1 are toxic causing neurodegeneration and shortened lifespan. If this mechanism is conserved these data may help explain why the intracellular accumulation of wild type TDP-43 is observed in a growing number of neurodegenerative disorders. Furthermore, given TDP-43's propensity to aggregate and its inherent cytotoxicity wild type TDP-43 may actively contribute to neurodegeneration. Indeed recent hypotheses suggest that mutant proteins may act as seeds for the accumulation of wild type TDP-43 into pathogenic conformations as described for prion toxicity [29].

Our data show that *tdp-1* expression is induced by environmental stress as well as from genetically encoded proteotoxic mutations. TDP-43 is a component of the ribonucleoprotein complexes known as stress granules that form under stressful conditions where they perform molecular mRNA triage where mRNAs are sorted for storage, degradation, or translation during stress and recovery [3]. While the role of these ribonucleoprotein complexes in acute stress has been extensively studied, their role in response to chronic upregulation by reduced IIS or proteotoxicity is unknown. The stress-inducible aspect of *tdp-1/TDP-43* function reflects an ancient mechanism for enduring acute environmental stress until conditions improve. Unlike environmental stress, proteotoxicity produced by mutations in TDP-43 or FUS are not equivalent in that they are genetically encoded and persistent stresses that never resolve. Thus the continuous induction of stress signalling originating in the ER and terminating with

increased expression of TDP-1 leads to negative long-term consequences on neuronal survival.

Our model complements the “two-hits” hypothesis for sporadic diseases that highlights the role of as of yet poorly defined environmental stresses in combination with cytoplasmic accumulations of TDP-43 as part of the trigger for pathogenesis [30]. Proteostasis is essential to survival and healthy aging but gradually becomes less efficient as organisms age and may contribute to the accumulation of TDP-43 [31-33]. Add to this the stress-induced expression of TDP-43 and the cell is faced with increased cytoplasmic aggregation leading to pathogenesis.

Many TDP-43 models have been described and they all show toxicity from the over expression of wild type TDP-43, which is sometimes less toxic than mutant but not always [11,12,20,27,34-39]. These findings again demonstrate that control of TDP-43 levels is important for cell survival and that wild type TDP-43 may contribute to neuronal toxicity. We genetically tested this premise in *C. elegans* by creating transgenic strains that either overexpressed stress-activated TDP-1 or were missing the worm’s endogenous *tdp-1*. Paralysis and lifespan phenotypes of TDP-43 and FUS transgenics were worsened by increased expression of TDP-1. Consistently, deletion of endogenous *tdp-1* from strains expressing mutant TDP-43 or FUS remarkably reduced paralysis and motor neuron degeneration phenotypes. Taken together we directly showed that wild type *tdp-1* plays an important role in neurodegeneration caused by mutant TDP-43 and FUS proteins.

However two studies in *C. elegans* have shown no effect on TDP-43 toxicity in animals mutant for endogenous *tdp-1* [20,35]. This may be due to differences in our model, where animals express mutant TDP-43 in only 26 GABAergic motor neurons

[40] while the other models described rely on the expression of TDP-43 transgenes throughout the worms' entire nervous system [20,35]. In our model we see adult-onset, progressive motility defects and neurodegeneration (Vaccaro et. al *under revision*), while the other models describe uncoordinated motility problems from earlier stages. It may be that the pan neuronal expression of TDP-43 causes phenotypes that are too severe for modulation by reducing endogenous *tdp-1*. Furthermore, the fact that we see a reduction of mutant FUS toxicity by deleting *tdp-1* bolsters the notion that proteotoxic induction of TDP-1 propagates toxicity and this may not be a phenomenon restricted to mutant TDP-43.

A recent study demonstrated that the overexpression of wild type TDP-43 and/or FUS in *Drosophila* enhances the toxicity of mutant TDP-43 or FUS [41]. We extend upon this finding by showing that deletion of endogenous wild type *tdp-1* in worms rescues mutant TDP-43 and FUS motor neuron toxicity. This is an important finding given the inherent toxicity from overexpression phenotypes of TDP-43 in many systems and suggests that the expression of wild type TDP-1/TDP-43 at physiologically relevant levels actively contributes to neurodegeneration.

It is still unclear if mutant TDP-43 results in a gain, a loss of function or both but work from zebrafish TDP-43 models suggests that it may be both [39]. Our data introduces a novel gain of function mechanism where the increased expression of wild type TDP-1 is induced by proteotoxic stress. Several strategies come to mind to alleviate the neuronal toxicity caused by wild type and mutant TDP-43 including reducing levels of wild type TDP-43, mutant TDP-43, and/or reducing UPR^{ER} stress by promoting protein folding. In the future it will be important to determine if strategies to reduce

TDP-43 neuronal toxicity may be applicable to additional neurodegenerative disease as a shared mechanism of cell death in the development of new therapeutics.

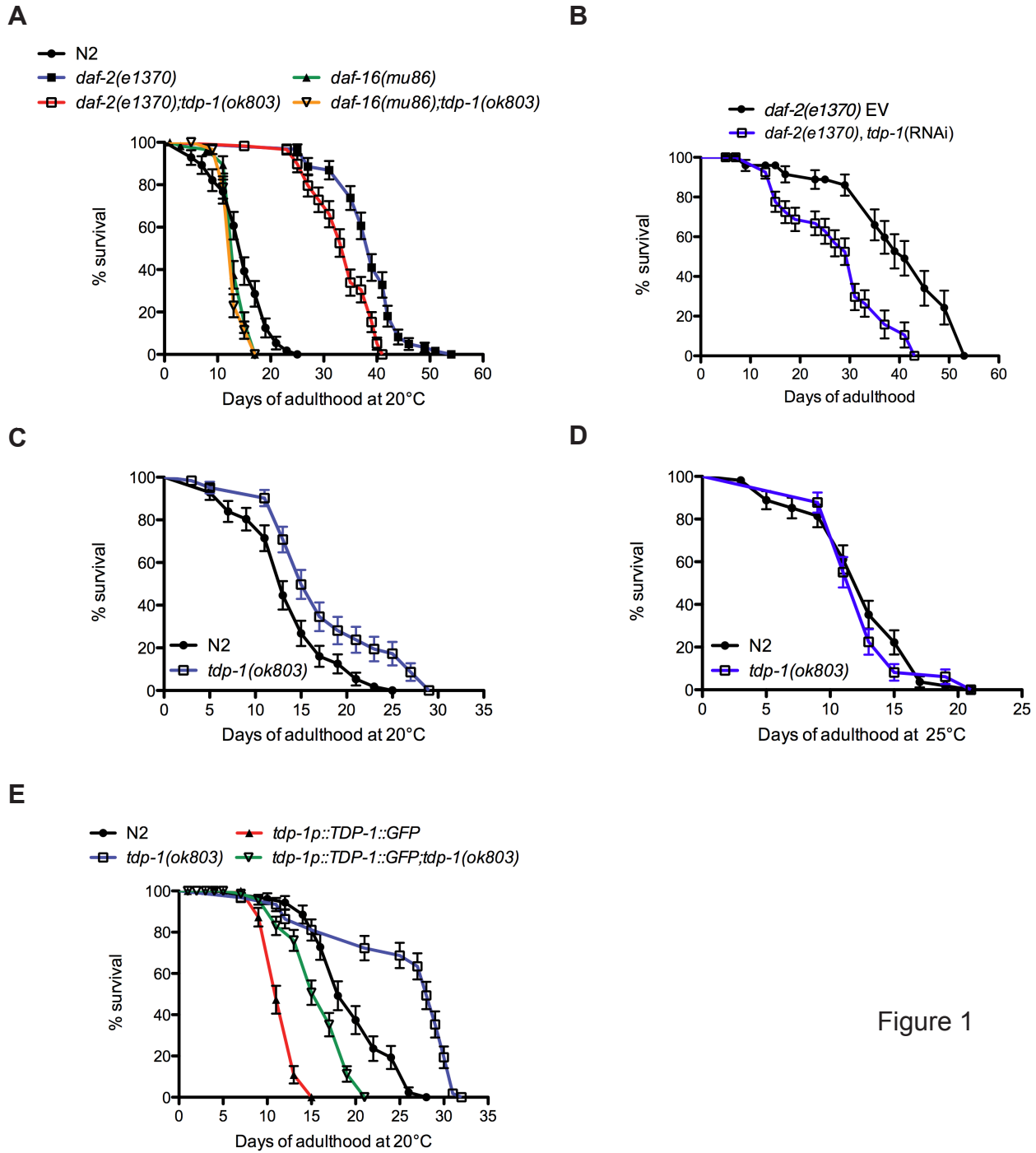


Figure 1

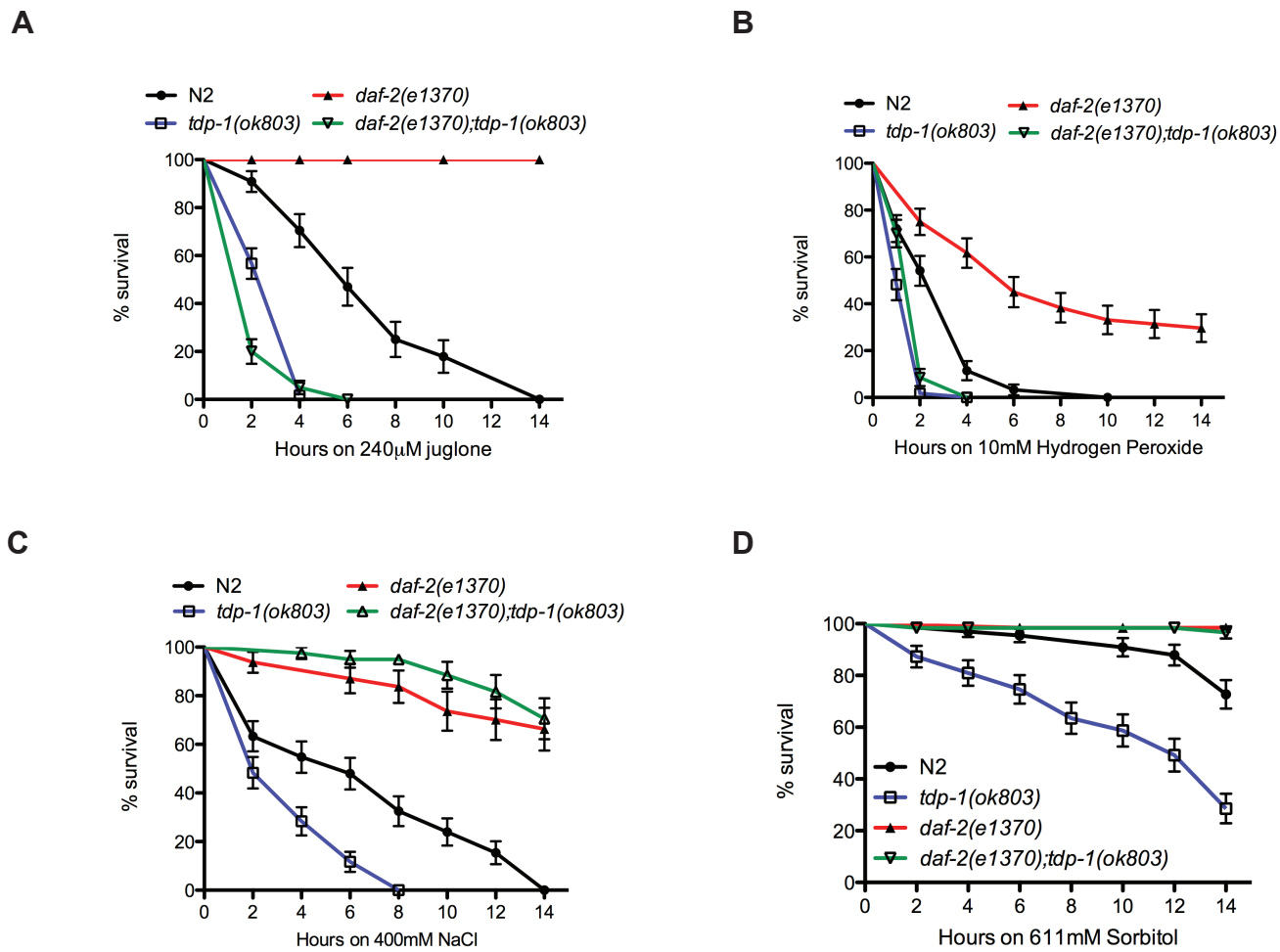


Figure 2

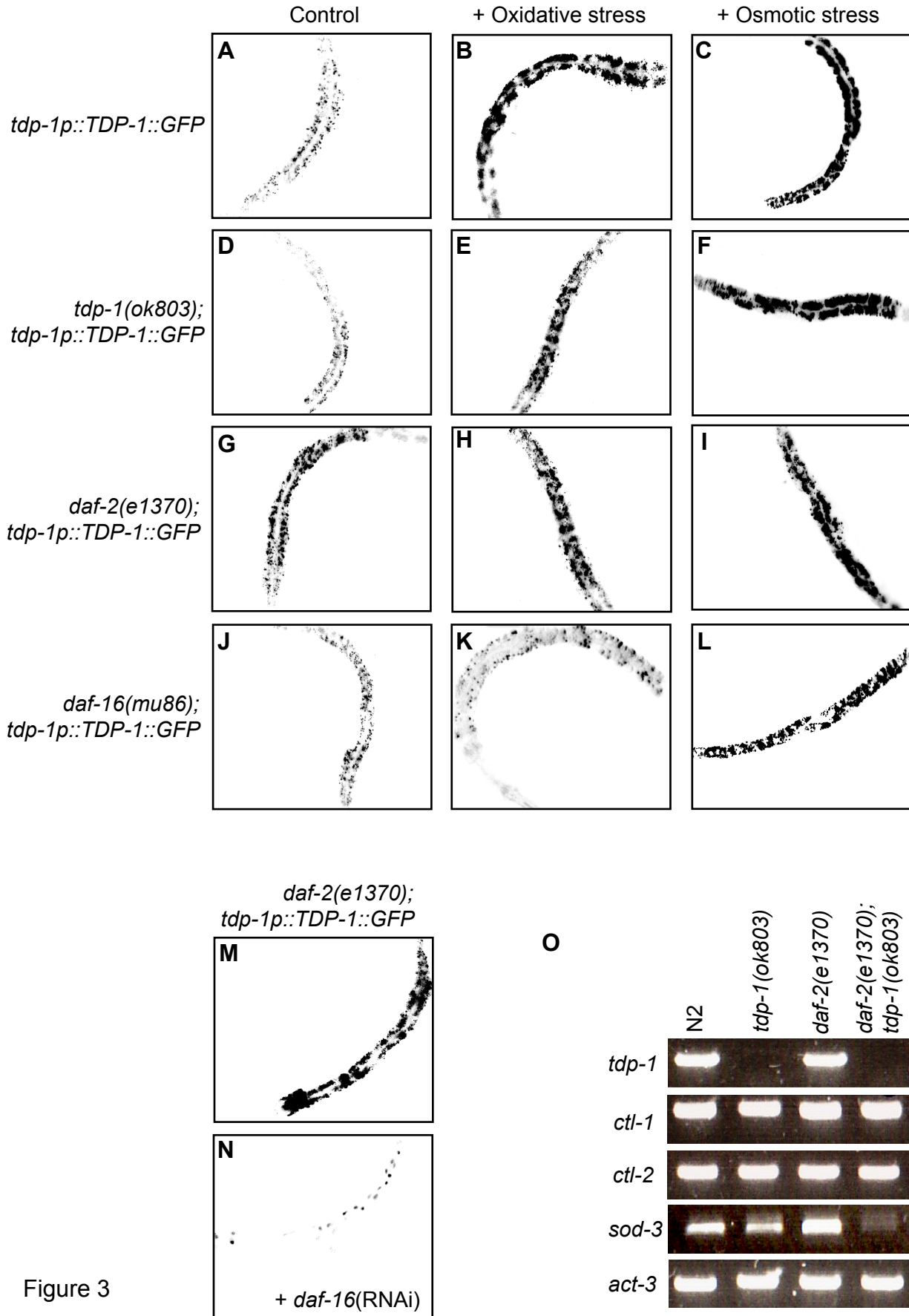


Figure 3

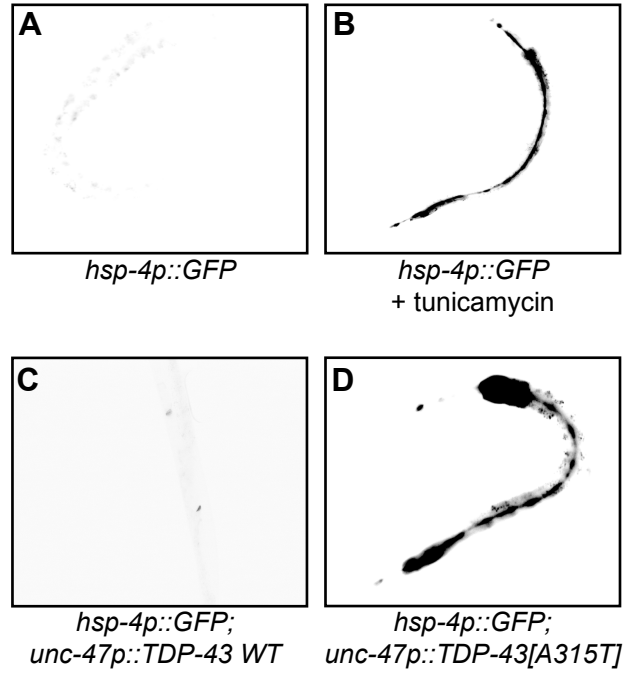


Figure 4

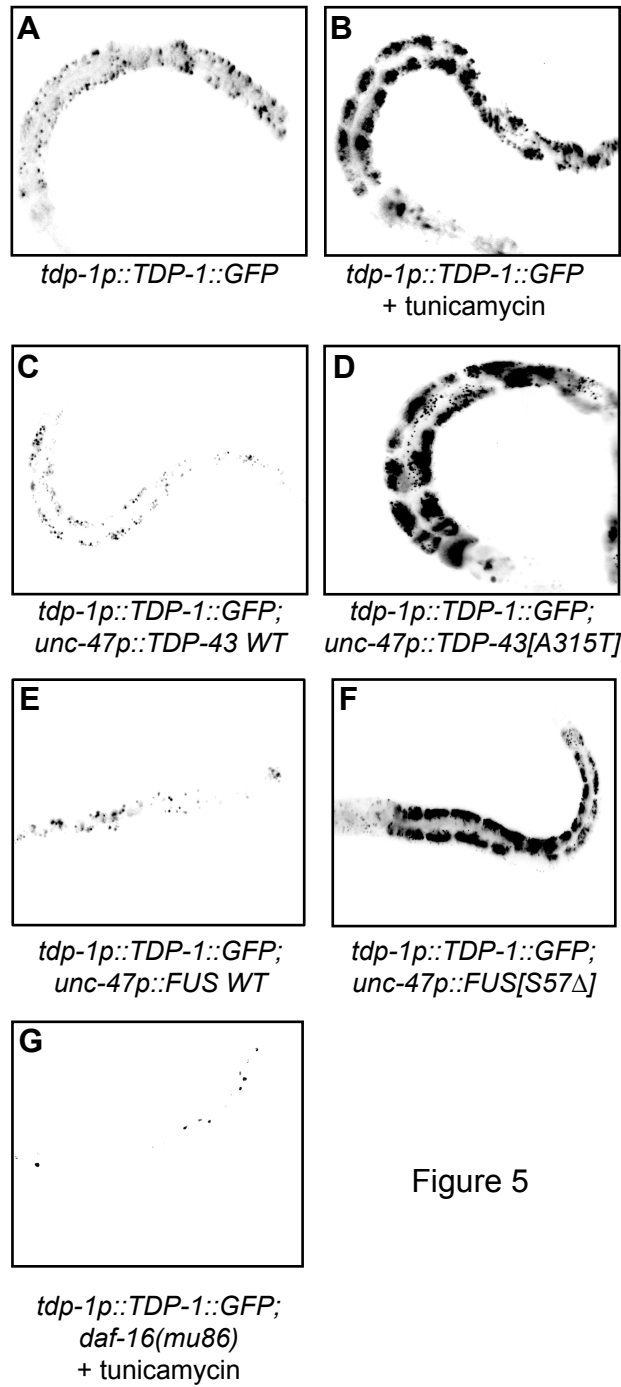


Figure 5

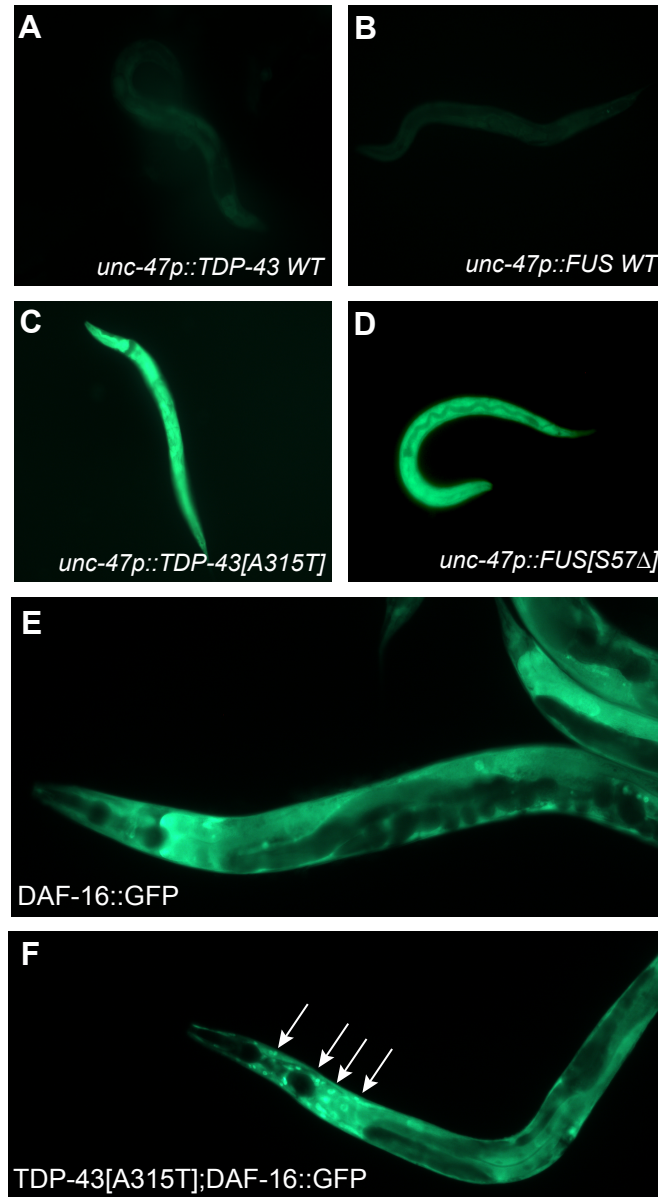


Figure 6

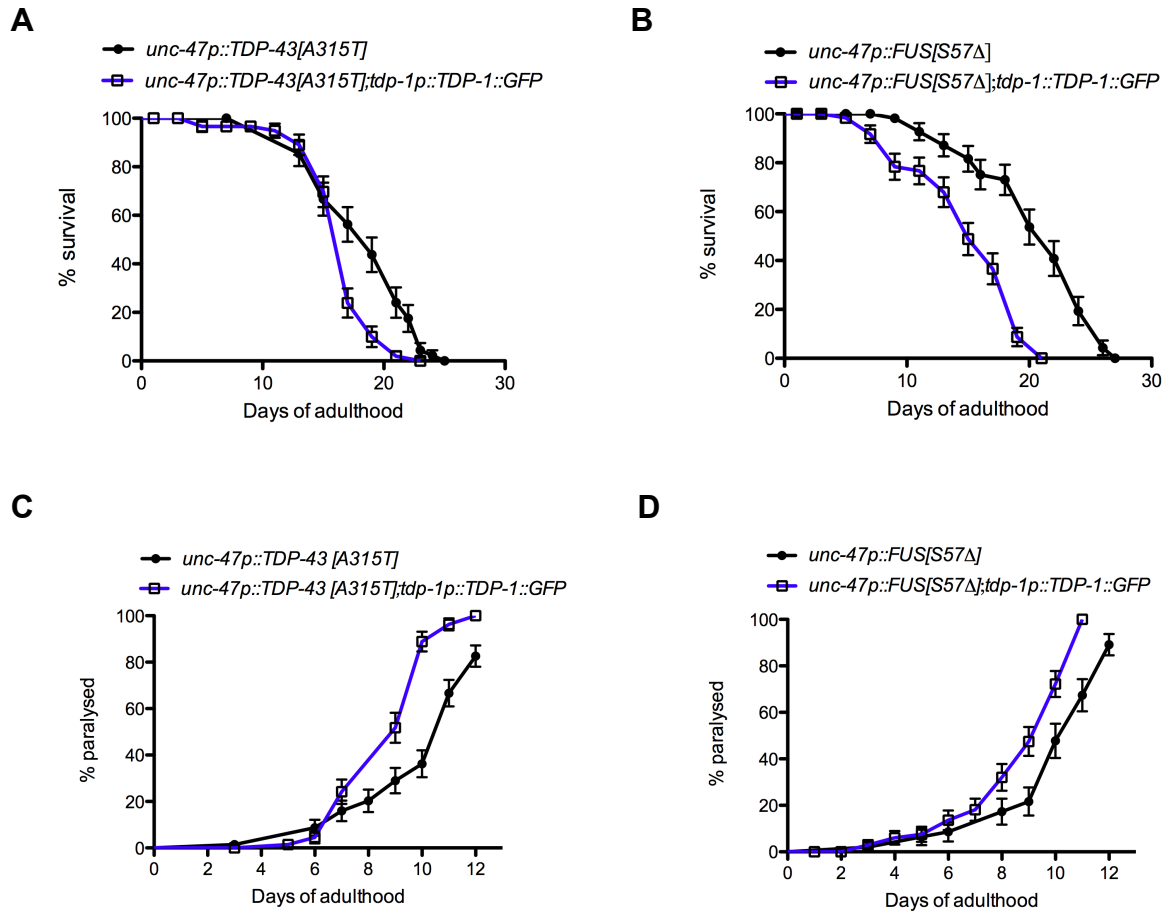


Figure 7

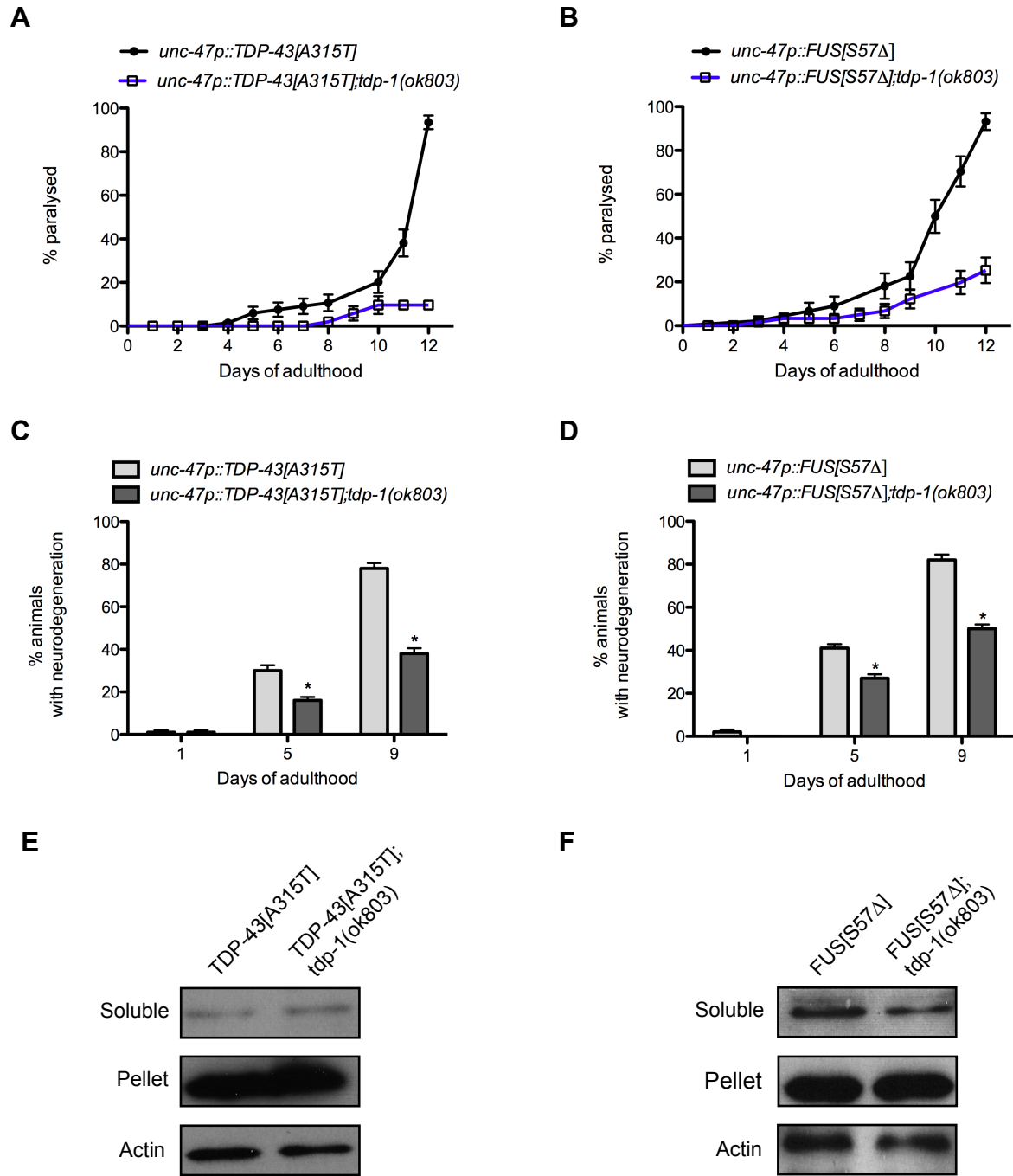


Figure 8

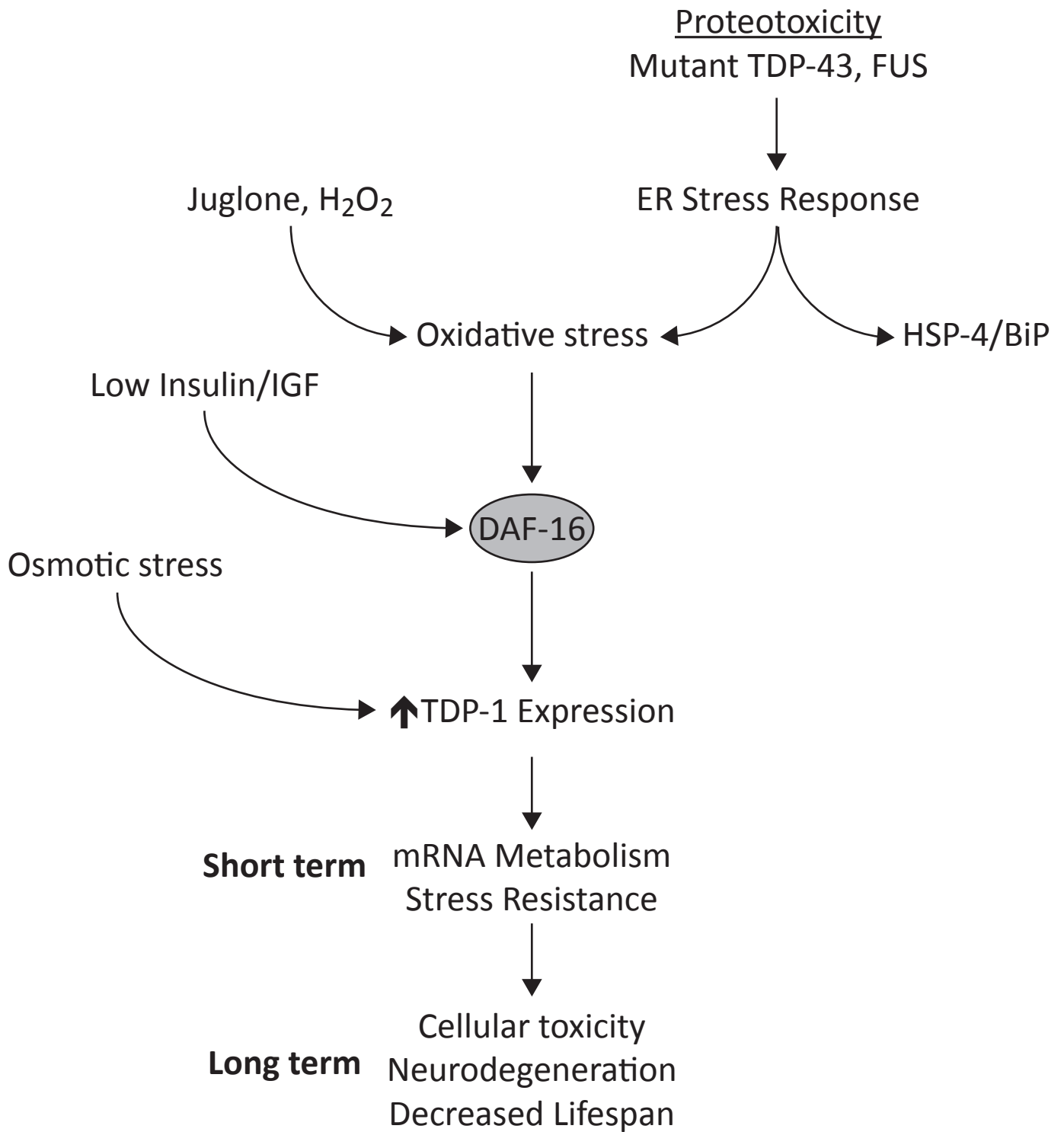


Figure 9

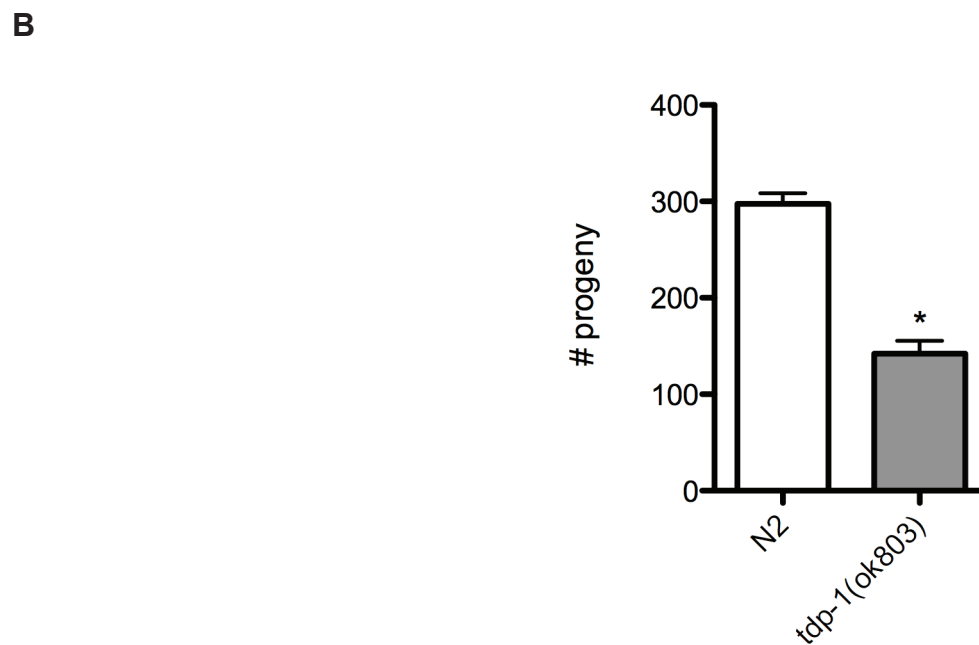
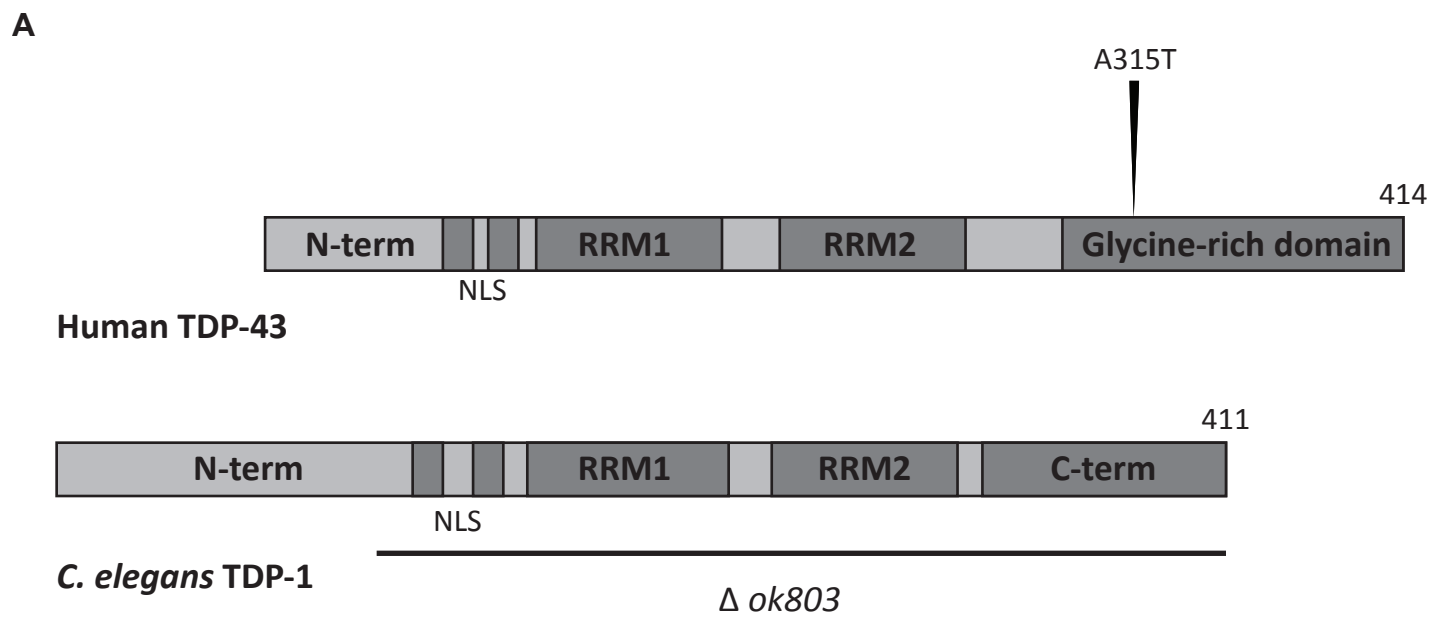
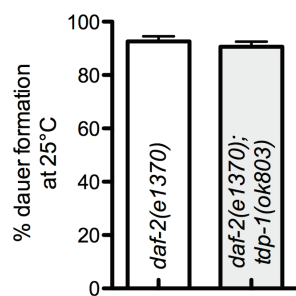
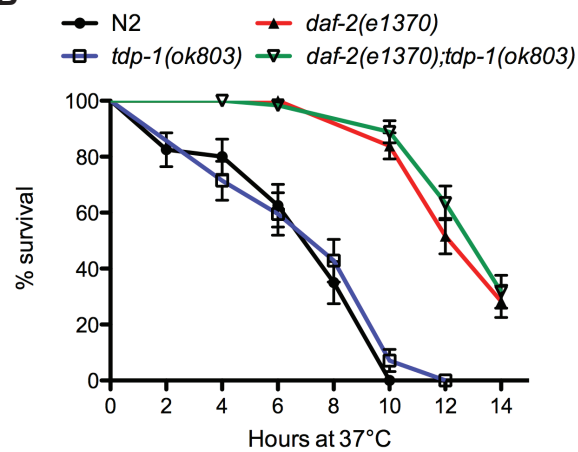


Figure S1

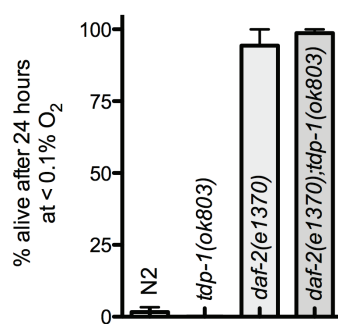
A



B



C



D

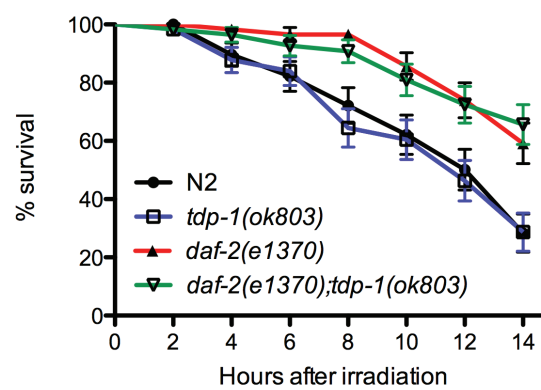


Figure S2

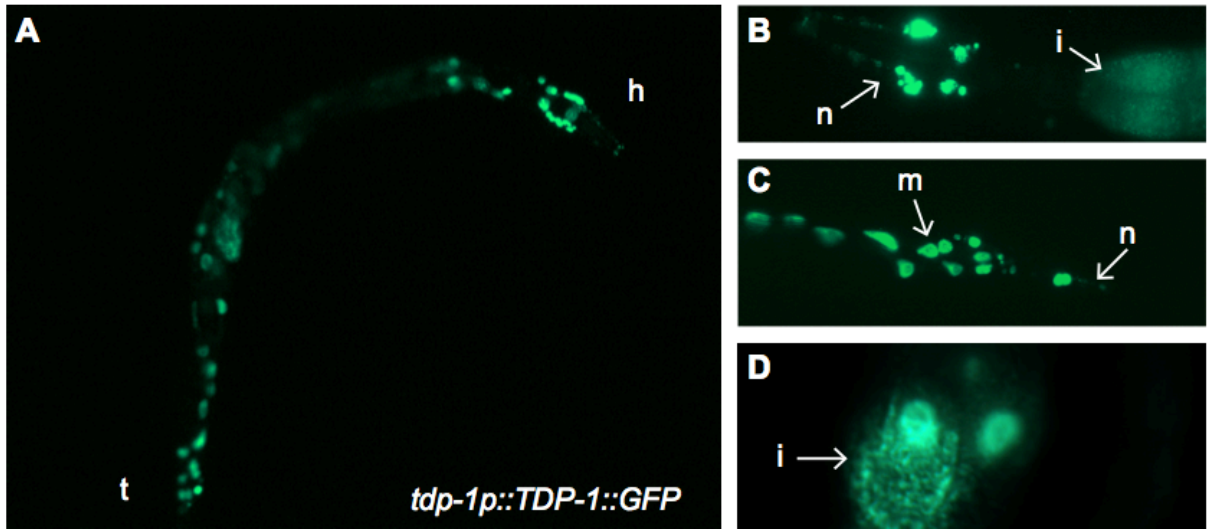


Figure S3

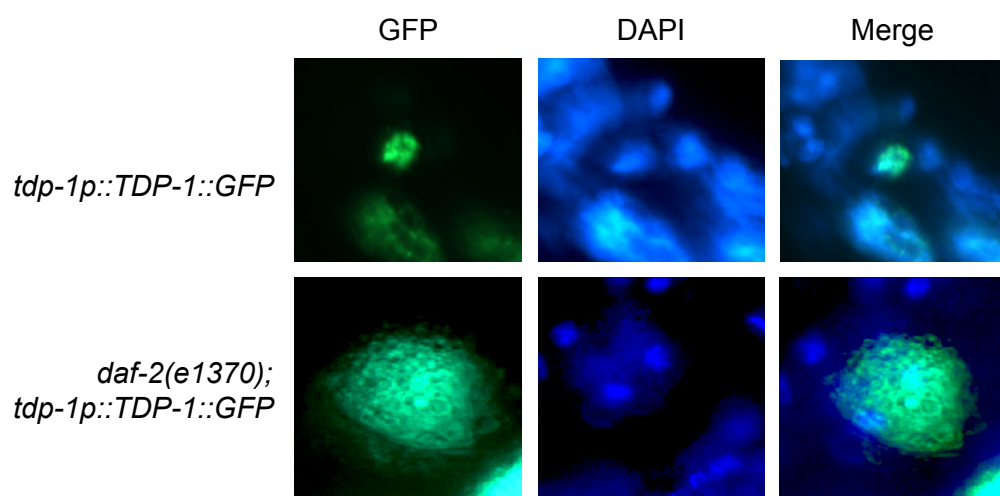


Figure S4

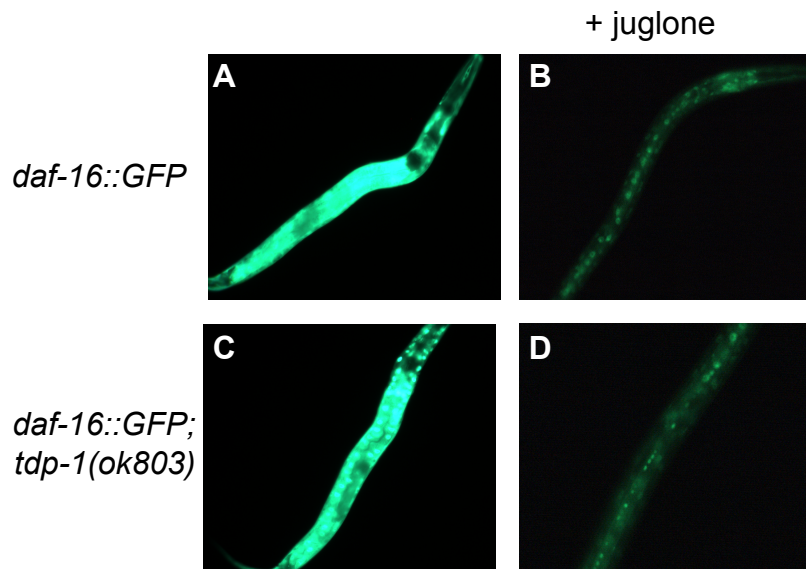


Figure S5

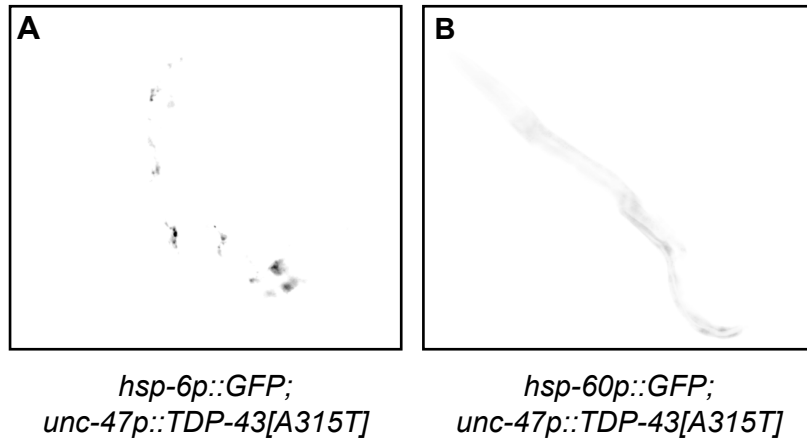


Figure S6

Materials and Methods

C. elegans strains

Nematode strains were received from the *Caenorhabditis elegans* Genetics Center CGC (St Paul, MN) unless indicated otherwise. All strains were maintained following standard methods on OP50 bacteria plates. Mutations used in this study were: *tdp-1(ok803)* outcrossed 5 times to N2 prior to use, *daf-2(e1370)*, *daf-16(mu86)*, *zcls4[hsp-4::GFP]*, *zcls9[hsp-60::GFP]*, *zcls13[hsp-6::GFP]*, *xqls132[unc-47::TDP-43-WT;unc-119(+)]*, *xqls133[unc-47::TDP-43[A315T];unc-119(+)]*, *xqls173[unc-47::FUS-WT;unc-119(+)]*, *xqls98[unc-47::FUS[S57Δ];unc-119(+)]* and *xqls93 Ptdp-1::TDP-1::GFP*.

Progeny test

Ten synchronized L4 worms were grown on NGM agar plates. (1 animal/plate) The worms were placed at 20°C overnight to lay eggs. The next two days the worms were individually transferred to a new plate: L1 were scored for each plate.

Lifespan assays

Sixty synchronized L4 were grown on OP50 bacteria plates (20 animals/plate) and three independent assays were performed. Life spans were performed at 20 and 25°C: worms were scored every two days from adult day 1 until death. Worms were declared dead if they didn't respond to tactile or heat stimulus.

RNAi experiments

RNAi-treated strains were fed with *E. coli* (HT115) containing an Empty Vector (EV) or *tdp-1* (F44G4.4) RNAi clones from the ORFeome RNAi library (Open Biosystems). RNAi experiments were performed at 20°C. Worms were grown on NGM enriched with 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). For lifespan, worms were transferred to RNAi 5-fluorodeoxyuridine (FUDR, 12.5 mg/L) plates at adult day 1 until death. Worms were declared dead if they didn't respond to tactile or heat stimulus. (20 animals/plate by triplicates)

Dauer formation assay

Young adult *daf-2(e1370)* were allowed to lay eggs overnight at 20°C. The eggs were then transferred to 25°C and scored for dauer formation 5 days later. Three different trials on different days were performed.

Stress assays

Stress tests were performed at 20°C (oxidative and osmotic stress), 25°C (hypoxia) and 37°C (thermal stress). Worms were grown on NGM and transferred to NGM plates + 240μM juglone (oxidative stress), or NGM plates + 10mM Hydrogen peroxide (oxidative stress), or NGM plates + 400mM NaCl (osmotic stress), or NGM plates + 611mM Sorbitol (osmotic stress), all at adult day 1. For the oxidative, osmotic and thermal stress assays, worms were evaluated for survival every 30 min for the first 2 hours and every 2 hours after up to 14 hours. Nematodes were scored as dead if they

were unable to move in response to heat or tactile stimuli. For all tests worms, 20 animals/plate by triplicates were scored.

For UVs irradiation, adult day 1 worms were transferred to NGM plates without any food source (20 animals/plate by triplicates) and exposed to UVs (1200 J/m²). Then the worms were transferred to NGM plates with OP50 bacteria and counted every 2 hours till 14h after irradiation.

Strain construction

Gateway system (Invitrogen) compatible *tdp-1* promoter and open reading frame plasmid clones were obtained from Open Biosystems and recombined with plasmid pDES-MB14 (kindly donated by M. Vidal, Harvard), and verified by sequencing to create a *tdp-1::TDP-1::GFP* plasmid, which was injected at 5 ng/μl into *unc-119(ed3)* animals and wild type transformants expressing GFP were kept. The transgene was integrated using UV radiation. Multiple stable transgenics were isolated and outcrossed to N2 4 times before use. Strain XQ93[Ptdp-1::TDP-1::GFP] was used in this study.

Fluorescence microscopy

For visualization of *TDP-1::GFP* animals, M9 buffer with 5 mM levamisole was used for immobilization. Animals were mounted on slides with 2% agarose pads. *TDP-1* expression was visualized with a Leica CTR 6000 and a Leica DFC 480 camera. L4 animals were grown on NGM plates and transferred to NGM plates + 240 μM juglone (oxidative stress) or NGM plates + 400mM NaCl (osmotic stress) for 90 minutes, and examined for fluorescence with the Leica system described above. Image processing was done with Adobe Photoshop. For images of TDP-1::GFP alone images were converted to black and white and the images reversed to allow for better contrast and visualization.

Dihydrofluorescein diacetate assay

For visualization of oxidative damage in the transgenic strains the worms were incubated on a slide for 30 min with 5mM dihydrofluorescein diacetate dye and then wash with PBS 1X three times. After the slide was fixed and fluorescence was observed with the Leica system described above.

RT-PCR

RNA was extracted with RNAeasy kit (Qiagen) and reverse transcribed with QuantiTect (Qiagen).

Primers : PCR

ctl-1 forward, AGGTCACCCATGACATCACCAAGT ; *ctl-1* reverse, GATTGCGCTT CAGGGCATGAATGA ; *ctl-2* forward, TTCGCTGA GTTGAACAATCCG ; *ctl-2* reverse, GTTGCTGATTGTCATAAGCCATTGC ; *tdp-1* forward, AAAGTGGGA TCGAGTGACGAC ; *tdp-1* reverse, GACAGCGTAACGAATGCAAAGC ; *sod-3* forward, CGAGCTCGAACCTGTAATCAGCCATG ; *sod-3* reverse, GGGGTACCG

CTGATATTCTTCCACTTG ; act-3 forward, GTTGCCGCTCTTGTGTAGAC ; act-3 reverse, GGAGAGGACAGCTTGGATGG.

Worm lysates

Worms were collected in M9 buffer, washed 3 times with M9 and pellets were placed at -80°C overnight. Pellets were lysed in RIPA buffer (150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate) + 0.1% protease inhibitors (10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml pepstatin A, 10 mg/ml chymostatin LPC;1/1000). Pellets were passed through a 27_{1/2} G syringe 10 times, sonicated and centrifuged at 16000g. Supernatants were collected.

Protein solubility

For TDP-43 and FUS transgenics soluble/insoluble fractions, worms were lysed in Extraction Buffer (1M Tris-HCl pH 8, 0.5M EDTA, 1M NaCl, 10% NP40 + protease inhibitors (LPC;1/1000)). Pellets were passed through a 27_{1/2} G syringe 10 times, sonicated and centrifuged at 100000g for 5 min. The soluble supernatant was saved and the remaining pellet was resuspended in extraction buffer, sonicated and centrifuged at 100000g for 5 min. The remaining pellet was resuspended into 100ml of RIPA buffer, sonicated until the pellet was resuspended in solution and saved.

Protein quantification.

All supernatants were quantified with the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) following the manufacturer instructions.

Immunoblot.

Worm RIPA samples (175µg/well) were resuspended directly in 1x Laemmli sample buffer, migrated in 10% polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes (BioRad) and immunoblotted. Antibodies used: rabbit anti-TDP-43 (1:200, Proteintech), rabbit anti-FUS/TLS (1:200, Abcam), mouse anti-Actin (1:10000, MP Biomedical). Blots were visualized with peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific).

Statistics

For lifespan and stress-resistance tests, survival curves were generated and compared using the Log-rank (Mantel-Cox) test, and 20-30 animals were tested per genotype and repeated at least three times. For progeny counts, dauer-formation assays and hypoxia tests the mean and SEM were calculated for each trial and two-tailed t-tests were used for statistical analysis.

Acknowledgments

We thank A. Aulas for technical advice, S. Peyrard and E. Bourgeois for technical support. J.A.P is a CIHR New Investigator. This research was supported by the CHUM Foundation, by the NSERC Discovery program to J.A.P, the CIHR, the Frick Foundation for ALS Research, and the Bernice Ramsay Discovery Grant program from the ALS Society of Canada to J.A.P.

REFERENCES

1. Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW (2010) TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 19: R46-64.
2. Anderson P, Kedersha N (2009) Stress granules. *Curr Biol* 19: R397-398.
3. Anderson P, Kedersha N (2009) RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 430-436.
4. Kenyon C (2005) The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120: 449-460.
5. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461-464.
6. Libina N, Berman JR, Kenyon C (2003) Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* 115: 489-502.
7. Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C (1997) *daf-16*: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 278: 1319-1322.
8. Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C (2001) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet* 28: 139-145.
9. Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, et al. (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424: 277-283.
10. Cohen E, Dillin A (2008) The insulin paradox: aging, proteotoxicity and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 9: 759-767.
11. Estes PS, Boehringer A, Zwick R, Tang JE, Grigsby B, et al. (2011) Wild-type and A315T mutant TDP-43 exert differential neurotoxicity in a *Drosophila* model of ALS. *Hum Mol Genet*.
12. Xu YF, Gendron TF, Zhang YJ, Lin WL, D'Alton S, et al. (2010) Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J Neurosci* 30: 10851-10859.
13. Van Raamsdonk JM, Hekimi S (2009) Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase *sod-2* extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 5: e1000361.
14. Henderson ST, Johnson TE (2001) *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 11: 1975-1980.
15. Douglas PM, Dillin A (2010) Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *J Cell Biol* 190: 719-729.
16. Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, Mayo K, Norton JB, et al. (2008) TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann Neurol*.
17. Murakami T, Yang SP, Xie L, Kawano T, Fu D, et al. (2011) ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in *Caenorhabditis elegans* by a dominant gain-of-function mechanism. *Hum Mol Genet*.

18. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, et al. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11: 619-633.
19. Ayala YM, De Conti L, Avendano-Vazquez SE, Dhir A, Romano M, et al. (2011) TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J* 30: 277-288.
20. Ash PE, Zhang YJ, Roberts CM, Saldi T, Hutter H, et al. (2010) Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in *C. elegans*. *Hum Mol Genet*.
21. Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM, Baloh RH (2009) TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18809-18814.
22. Johnson BS, McCaffery JM, Lindquist S, Gitler AD (2008) A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
23. Lamitina ST, Strange K (2005) Transcriptional targets of DAF-16 insulin signaling pathway protect *C. elegans* from extreme hypertonic stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C467-474.
24. Rohlfing AK, Miteva Y, Hannenhalli S, Lamitina T (2010) Genetic and physiological activation of osmosensitive gene expression mimics transcriptional signatures of pathogen infection in *C. elegans*. *PLoS One* 5: e9010.
25. Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW, Dillin A (2006) Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* 313: 1604-1610.
26. Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, et al. (2009) Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell* 139: 1157-1169.
27. Zhang T, Mullane PC, Periz G, Wang J (2011) TDP-43 neurotoxicity and protein aggregation modulated by heat shock factor and insulin/IGF-1 signaling. *Hum Mol Genet*.
28. Henis-Korenblit S, Zhang P, Hansen M, McCormick M, Lee SJ, et al. (2010) Insulin/IGF-1 signaling mutants reprogram ER stress response regulators to promote longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 9730-9735.
29. Polymenidou M, Cleveland DW (2011) The Seeds of Neurodegeneration: Prion-like Spreading in ALS. *Cell* 147: 498-508.
30. Pesiridis GS, Tripathy K, Tanik S, Trojanowski JQ, Lee VM (2011) A "two-hit" hypothesis for inclusion formation by carboxyl-terminal fragments of TDP-43 protein linked to RNA depletion and impaired microtubule-dependent transport. *J Biol Chem* 286: 18845-18855.
31. Makrides SC (1983) Protein synthesis and degradation during aging and senescence. *Biol Rev Camb Philos Soc* 58: 343-422.
32. Partridge L, Gems D (2002) Mechanisms of ageing: public or private? *Nat Rev Genet* 3: 165-175.
33. Rattan SI, Clark BF (1996) Intracellular protein synthesis, modifications and aging. *Biochem Soc Trans* 24: 1043-1049.
34. Wils H, Kleinberger G, Janssens J, Pereson S, Joris G, et al. (2010) TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3858-3863.

35. Liachko NF, Guthrie CR, Kraemer BC (2010) Phosphorylation promotes neurotoxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of TDP-43 proteinopathy. *J Neurosci* 30: 16208-16219.
36. Li Y, Ray P, Rao EJ, Shi C, Guo W, et al. (2010) A *Drosophila* model for TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3169-3174.
37. Barmada SJ, Skibinski G, Korb E, Rao EJ, Wu JY, et al. (2010) Cytoplasmic mislocalization of TDP-43 is toxic to neurons and enhanced by a mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 30: 639-649.
38. Zhang YJ, Xu YF, Cook C, Gendron TF, Roettges P, et al. (2009) Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7607-7612.
39. Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, Dion PA, Bercier V, et al. (2009) Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Hum Mol Genet* 19: 671-683.
40. McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389: 870-876.
41. Lanson NA, Jr., Maltare A, King H, Smith R, Kim JH, et al. (2011) A *Drosophila* model of FUS-related neurodegeneration reveals genetic interaction between FUS and TDP-43. *Hum Mol Genet* 20: 2510-2523.

Figure Legends

Figure 1. *tdp-1* regulates lifespan

(A) Mutation in *tdp-1* reduced the life span of *daf-2(e1370)* mutants but did not further reduce the life span of *daf-16(mu86)* mutants.

(B) RNAi against *tdp-1* reduced the life span of *daf-2(e1370)* mutants.

(C) *tdp-1(ok803)* mutants had increased lifespan compared to N2 worms at 20°C.

(D) *tdp-1(ok803)* mutants and N2 worms had comparable lifespan at 25°C.

(E) TDP-1::GFP overexpression strains had reduced life spans compared to N2 worms or *tdp-1(ok803)* mutants.

Figure 2. *tdp-1* specifies stress response signalling

(A) *tdp-1(ok803)* mutants were more sensitive to juglone than N2 worms ($P < 0.001$). *daf-2(e1370)* mutants were completely resistant to juglone-induced mortality after 14 hours of exposure. *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* mutants were highly sensitive to juglone toxicity compared to N2 or *daf-2(e1370)* controls ($P < 0.001$).

(B) *tdp-1(ok803)* mutants were more sensitive to hydrogen peroxide than N2 worms ($P < 0.001$). *daf-2(e1370)* mutants were more resistant to hydrogen peroxide-induced mortality after 14 hours of exposure than N2 Worms. *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* mutants were highly sensitive to hydrogen peroxide toxicity compared to N2 or *daf-2(e1370)* controls ($P < 0.001$).

(C) *tdp-1(ok803)* were more sensitive to high NaCl levels than N2 worms ($P < 0.001$), while *daf-2(e1370)* and *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* mutants were more resistant to NaCl-induced mortality than N2 worms after 14 hours of exposure.

(D) *tdp-1(ok803)* were more sensitive to high sorbitol levels than N2 worms ($P < 0.001$), while *daf-2(e1370)* and *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* mutants were totally resistant to Sorbitol-induced mortality after 14 hours of exposure.

Figure 3. Insulin/IGF signalling and cellular stress regulate TDP-1 expression

(A) TDP-1::GFP is primarily nuclear under normal conditions.

(B-C) TDP-1::GFP expression was highly induced by (B) oxidative or (C) osmotic stress.

(D-F) TDP-1::GFP expression was observed in *tdp-1(ok803)* mutants and was induced by oxidative and osmotic stress.

(G) Compared to untreated controls in (A) TDP-1::GFP expression was upregulated in *daf-2(e1370)* mutants.

(H-I) TDP-1::GFP was upregulated by stress in *daf-2(e1370)* mutants.

(J) TDP-1::GFP showed faint expression and nuclear localization in *daf-16(mu86)* mutants.

(K) TDP-1::GFP was not induced by oxidative stress in *daf-16(mu86)* mutants.

(L) Osmotic stress induced TDP-1::GFP expression in *daf-16(mu86)* mutants.

(M) TDP-1::GFP expression was upregulated in *daf-2(e1370)* mutants and was unaffected by empty vector RNAi controls.

(N) *daf-16(RNAi)* abolished the increased expression of TDP-1::GFP in *daf-2(e1370)* mutants.

(O) No expression of *tdp-1* was observed in *tdp-1(ok803)* or *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* mutants. RT-PCR revealed no change in the expression of the catalases *ctl-1* and *ctl-2* by

deletion of *tdp-1*. Expression of the superoxide dismutase *sod-3* was diminished in *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* mutants.

Figure 4. Mutant TDP-43 induces HSP-4/BiP expression

(A) Representative image of a young adult worm containing an integrated *hsp-4p::GFP* transgene under non-stressed conditions.

(B) *hsp-4p::GFP* expression was induced by the ER stressor tunicamycin.

(C) *hsp-4p::GFP* expression was not induced by WT TDP-43 in a double transgenic *TDP-43 WT;hsp-4p::GFP* strain.

(D) *hsp-4p::GFP* expression was induced by mutant TDP-43 in a double transgenic *TDP-43[A315T];hsp-4p::GFP* strain.

Figure 5. TDP-1 Expression is Induced by Proteotoxicity

(A) Low expression and nuclear localization of TDP-1::GFP under normal growth conditions.

(B) The ER stressor tunicamycin highly induced TDP-1::GFP expression.

(C) Wild type TDP-43 did not induce TDP-1::GFP expression in a *TDP-1::GFP;TDP-43 WT* transgenic strain.

(D) Mutant TDP-43 induced TDP-1::GFP expression in a *TDP-1::GFP;TDP-43[A315T]* transgenic strain.

(E) Wild type FUS did not induce TDP-1::GFP expression in a *TDP-1::GFP;FUS WT* transgenic strain.

(F) Mutant FUS induced TDP-1::GFP expression in a *TDP-1::GFP;FUS[S57Δ]* transgenic strain.

(G) Mutation in *daf-16* blocked the induction of TDP-1::GFP expression by tunicamycin treatment.

Figure 6. Mutant TDP-43 and FUS increase oxidative stress

(A-B) Photographs of young adult transgenic worms exposed to dihydrorofluorescein diacetate.

Transgenics expressing wild type (A) TDP-43 or (B) wild type FUS showed no fluorescence compared to the bright fluorescent signals observed in animals expressing (C) mutant TDP-43 or (D) mutant FUS. (E) Diffuse appearance of predominantly cytoplasmic DAF-16::GFP. (F) Introduction of mutant TDP-43 causes nuclear localization (arrows) of DAF-16::GFP.

Figure 7. Proteotoxic Induction of TDP-1 enhances neuronal dysfunction and decreases lifespan

(A) *unc-47p::TDP-43[A315T];tdp-1p::TDP-1::GFP* transgenics had shorter lifespans than transgenics expressing mutant TDP-43 alone ($P < 0.01$). (B) *unc-47p::FUS[S57Δ];tdp-1p::TDP-1::GFP* transgenics had shorter lifespans than transgenics expressing mutant FUS alone ($P < 0.001$). Transgenics expressing (C) mutant TDP-43 or (D) mutant FUS along with TDP-1::GFP had accelerated rates of paralysis compared to transgenics expressing either mutant TDP-43 or mutant FUS alone ($P < 0.001$ for mutant TDP-43 or FUS compared to mutant TDP-43;TDP-1::GFP or mutant FUS;TDP-1::GFP respectively).

Figure 8. Deletion of wild type TDP-1 reduces mutant TDP-43 and FUS proteotoxicity in *C. elegans*

(A) Transgenics expressing mutant TDP-43 show age-dependent paralysis that is greatly reduced in worms harbouring a deletion mutation of endogenous *tdp-1* ($P < 0.001$). (B) Deletion of *tdp-1* reduced the rate of paralysis in transgenic worms expressing mutant FUS in motor neurons ($P < 0.001$). Age-dependent motor neuron degeneration was reduced in (C) *tdp-1(ok803);unc-47p::TDP-43[A315T]* and (D) *tdp-1(ok803);unc-47p::FUS[S57Δ]* strains compared to *TDP-43[A315T]* or *FUS[S57Δ]* transgenics respectively (* $P < 0.001$). Deletion of *tdp-1* did not affect the proportion of insoluble (E) mutant TDP-43 or (F) FUS proteins in extracts from whole worms.

Figure 9. Integrated Model for Stress Induced TDP-1 Expression.

tdp-1 expression is induced by different forms of cellular stress. *tdp-1* induction by oxidative stress and/or the Insulin/IGF pathway is dependent on *daf-16*, while induction by osmotic stress is independent of *daf-16*. Misfolded proteins activate the unfolded protein response and secondary consequence of this is the generation of oxidative stress that in turn can activate *tdp-1* expression via *daf-16*. The downstream consequences of *tdp-1* expression are dependent on the length and strength of *tdp-1* expression. *tdp-1* mutants are sensitive to stress suggesting that *tdp-1* is essential for protection against acute stress. Genetically-encoded proteotoxicity from proteins like mutant TDP-43 leads to chronic induction of *tdp-1* expression with negative consequences including enhanced neurodegeneration and decreased lifespan. This model also suggests that mutant proteins may act as a seed for the induction of pathological *tdp-1* expression.

Supporting Information

Figure S1. *tdp-1* predicted protein structure ; *tdp-1(ok803)* mutants exhibit a reduced number of progeny.

(A) Comparison of human TDP-43 and *C. elegans* TDP-1 proteins. The extent of the deletion allele *ok803* is indicated. RRM: RNA Recognition Motif, NLS: Nuclear Localization Signal. (B) *tdp-1(ok803)* mutants have approximately half the number of progeny of wild type N2 animals (*P<0.001).

Figure S2. *tdp-1* is not required for dauer formation or resistance to heat, hypoxia or radiation.

(A) *tdp-1(ok803)* did not interfere with the constitutive dauer-formation phenotype of *daf-2(e1370)* animals grown at 25°C. (B) *tdp-1(ok803)* mutants and N2 worms showed similar sensitivity to thermal stress. *daf-2(e1370)* and *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* mutants were highly resistant to thermal stress compared to N2 controls (P<0.001). (C) Wild type N2 worms and *tdp-1(ok803)* mutants were both highly susceptible to mortality caused by low oxygen conditions. *tdp-1(ok803)* did not interfere with the resistance of *daf-2(e1370)* animals against hypoxia. (D) *tdp-1(ok803)* mutants and N2 worms were equally sensitive to UV radiation. *daf-2(e1370)* and *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* mutants were both highly resistant to UV compared to N2 controls (P<0.001).

Figure S3. TDP-1 is widely expressed in *C. elegans*.

GFP signals are detected in most tissues and is primarily nuclear in a *tdp-1p::TDP-1::GFP* transgenic strain.

- (A) h : head ; t : tail.
- (B) n : neurons ; i : intestine.
- (C) m : muscles ; n : neurons.
- (D) i : intestine.

Figure S4. Cytoplasmic expression of TDP-1 in *daf-2* mutants.

Top panels: TDP-1::GFP is primarily expressed in the nuclei (marked with DAPI) of non-stressed transgenics. Bottom Panels: TDP-1::GFP expression is increased and is now also found in the cytoplasm of animals with low insulin/IGF signaling.

Figure S5. *tdp-1* does not affect DAF-16::GFP nuclear localization

(A) DAF-16::GFP is cytoplasmic and diffuse under normal conditions but is (B) localized to nuclei when the animals are exposed to juglone. (C) The GFP signal is diffuse in unstressed *daf-16::GFP;tdp-1(ok803)* transgenics and (D) localizes within the nuclei of transgenics treated with juglone.

Figure S6. Mutant TDP-43 does not activate the mitochondrial Hsp70 chaperones.

Mutant TDP-43 was crossed into the mitochondrial chaperone reporter strains *hsp-6p::GFP* and *hsp-60p::GFP* but did not activate the expression of either transgene.

D. Modulation pharmacologique de la toxicité neuronale associée à TDP-43 et FUS *in vivo*

Nos nouveaux modèles *in vivo* *C. elegans* transgéniques TDP-43 et FUS mutants (respectivement *mutTDP-43* et *mutFUS*) constituent d'excellents outils pouvant être utilisés aussi bien dans l'approfondissement des mécanismes pathogéniques impliqués dans la SLA que pour le développement de stratégies thérapeutiques.

Le ver *C. elegans* représente un modèle bien établi dans la réalisation de criblages moléculaires et a déjà été largement utilisé pour de nombreuses maladies afin d'identifier et valider des approches thérapeutiques [92-95].

I. Le Bleu de Méthylène réduit la toxicité neuronale causée par TDP-43 et FUS

À l'aide de ces modèles transgéniques exprimant *mutTDP-43* ou *mutFUS* dans les motoneurones nous avons criblés une quinzaine de composés chimiques en culture liquide. Ces composés ont été choisis car leur activité positive ou négative sur d'autres modèles de maladies neurodégénératives est connue. Ce criblage nous a permis d'identifier le Bleu de Méthylène (BM) comme composé neuroprotecteur. Les vers transgéniques *mutTDP-43* et *mutFUS* cultivés sur agar contenant 6 μ M ou 60 μ M de BM présentent un taux de paralysie significativement réduit comparé aux vers non traités (**Figure 1.1 a, b**). Nous avons déterminé que la concentration la plus efficace était 60 μ M de BM et avons donc utilisé cette dose pour le reste des expériences concernant cette partie du projet. Nous constatons aussi chez les transgéniques *mutTDP-43* et *mutFUS* une dégénérescence des motoneurones qui augmente avec l'âge et

significativement réduite après traitement au BM (**Figure 1.1 c, d**) sans altérer l'expression du transgène (**Figure Supplémentaire 1.1**). Ces résultats démontrent que le BM peut significativement réduire les phénotypes moteurs causés par l'expression de *mutTDP-43* et *mutFUS* chez les modèles génétiques de maladie.

II. Le Bleu de Méthylène réduit la protéotoxicité via le RE

Par la suite, nous avons voulu tester si le BM pouvait réduire le mauvais repliement de protéines en utilisant des vers porteurs de mutations sensibles à la températures (temperature sensitive or *ts*) tels que la souche *gas-1* (sous-unité du complexe I mitochondrial), ou *let-60/RAS* [96]. Ces mutants sont viables à une température permissive (15°C), mais les produits du gène sont non fonctionnels à des températures restrictives (20°C ou plus) causant de la stérilité pour ces vers [96].

Lorsque ces mutants *ts* sont cultivés en milieu agar contenant 60 µM BM à partir de leur éclosion puis transférés vers des températures restrictives une fois adultes, nous observons que le BM est capable d'améliorer significativement la fécondité des mutants *gas-1* et *let-60* à 20°C et 25°C (**Figure 2.1, a, b**).

Le BM semble aussi permettre une protection contre le stress puisque les vers sauvages N2, non transgéniques, cultivés sur du BM sont résistants au stress oxydatif généré par le Juglone (**Figure 2.1, c**). Cependant, même chez les vers N2 le BM ne permet pas de protection contre des stress osmotique ou thermique, suggérant que l'action du BM est spécifique dans ses capacités protectrices cellulaires (**Figure Supplémentaire 2.1, a, b**). Enfin, le traitement par le BM ne montre aucun effet sur la longévité de vers sauvages N2 ce qui indique que ses mécanismes de protection

cellulaire ne passent pas par une extension de la durée de vie (**Figure Supplémentaire 2.1, c**).

Le BM est une molécule pléiotropique qui empêche l'agrégation de la β -amyloïde et de tau *in vitro*. Il permet d'améliorer les performances cognitives pour des patients atteints de la maladie d'Alzheimer en Phase III d'essais cliniques. Toutefois son mécanisme d'action moléculaire reste encore peu compris à ce jour [97-100]. Nous avons donc ensuite dirigé notre étude afin de savoir si la neuroprotection assurée par le BM impliquait une activation compensatoire de voies de signalisations de réponse au stress cellulaire. Pour cela nous avons utilisé les souches transgéniques *C. elegans* exprimant GFP en fusion de protéine telles que : *hsp-4*, protéine HSP70 protectrice induite par le stress du RE [101] ; *hsp-6*, protéine HSP70 mitochondriale [102] ; *hsp-60*, protéine HSP60 mitochondriale [102] ; et *hsp-16.2*, protéine de choc thermique HSP16 [103]. Nous avons pu observer que le BM induit spécifiquement l'expression de *hsp-4::GFP* (**Figure 2.1, d**) mais n'a aucun effet sur l'expression de *hsp-6*, *hsp-60* ou *hsp-16.2* (**Figure Supplémentaire 2.2**). HSP-4 est l'homologue *C. elegans* de Grp78/BiP chez les mammifères et est induite en condition de stress du RE sous le contrôle de l'épissage du facteur de transcription XBP-1 par l'endoribonucléase IRE-1. La forme épissée de XBP-1 constitue la forme protectrice contre le stress du RE [104]. Des mutations de *xbp-1* ou *ire-1* ont pour conséquences de bloquer l'induction de l'expression de *hsp-4::GFP* par le BM (**Figure 2.1, d**) suggérant que le BM exerce son activité neuroprotectrice via la réponse au stress du RE. Généralement, l'induction de chaperonnes telles que HSP-4 via XBP-1 se fait en réponse à la présence de protéines ayant subi un mauvais repliement dans le RE. Afin de déterminer si l'effet neuroprotecteur du BM nécessite la réponse UPR du RE (UPR^{ER}) nous avons utilisé une technique d'ARN interférence (ARNi) dans

le but de diminuer l'activité d'*hsp-4*. Nous avons constaté que le BM ne permet plus de supprimer la paralysie des vers transgéniques *mutTDP-43* lorsque qu'ils sont soumis à l'ARNi dirigé contre *hsp-4*. Ceci démontre que *hsp-4* est requis pour que le BM puisse exercer ses effets neuroprotecteurs (**Figure 2.1, e**).

Dans la continuité de ce travail et dans l'optique de pouvoir établir un lien entre les différents aspects de ce projet nous sommes retournés vers nos modèles *tdp-1p::TDP-1::GFP;TDP-43[A315T]*. Nous avons présenté précédemment que cette souche montre une induction de l'expression de la protéine TDP-1 en conditions physiologiques. Lorsque ces vers sont cultivés sur un milieu contenant 60 μ M de BM sur une période d'environ 18h l'expression de TDP-1 reste à un niveau basal et n'est pas davantage activée (**Figure 2.1, f**). Cette observation souligne encore une fois l'effet protecteur d'une diminution pharmacologique de la réponse au stress du RE contre la protéotoxicité liée à TDP-43 et FUS mutantes.

III. Le salubrinal permet également de diminuer la toxicité neuronale liée à TDP-43 et FUS

Pour renforcer nos observations sur la protection contre la protéotoxicité centrée dans le RE et permettant de réduire les déficits des motoneurones, nous avons examinés la possibilité que d'autres manipulations pharmacologiques de la réponse au stress du RE puissent aussi être neuroprotectrices. Le Salubrinal (Sal) est un inhibiteur spécifique des phosphatases du facteur eIF2 α qui protège le RE contre des stress tels que le mauvais repliement de protéines. Il a été prouvé que ce composé est efficace pour réduire la toxicité chez les souris transgéniques SOD1 (modèle pathologique de SLA)

[105]. De plus, le Sal permet aussi l'activation de l'expression d'*hsp-4::GFP* chez les vers (**Figure 3.1, a**) suggérant que tout comme le BM, le Sal provoque l'activation de la réponse UPR^{ER}. Par la suite nous avons exploré les potentielles propriétés neuroprotectrices du Sal contre *mutTDP-43* et *mutFUS*. Les vers *mutTDP-43* cultivés sur agar contenant 5 μ M ou 50 μ M Sal présentent un taux de paralysie significativement réduit comparé aux mêmes vers non traités (**Figure 3.1, b**). Le traitement au Sal permet aussi de diminuer la neurodégénérescence des vers transgéniques *mutTDP-43* (**Figure 3.1, c**) sans altérer l'expression du transgène (**Figure Supplémentaire 3.1**). Enfin, le Sal protège également contre la toxicité causée par *mutFUS* chez les vers (**Figure Supplémentaire 3.2**).

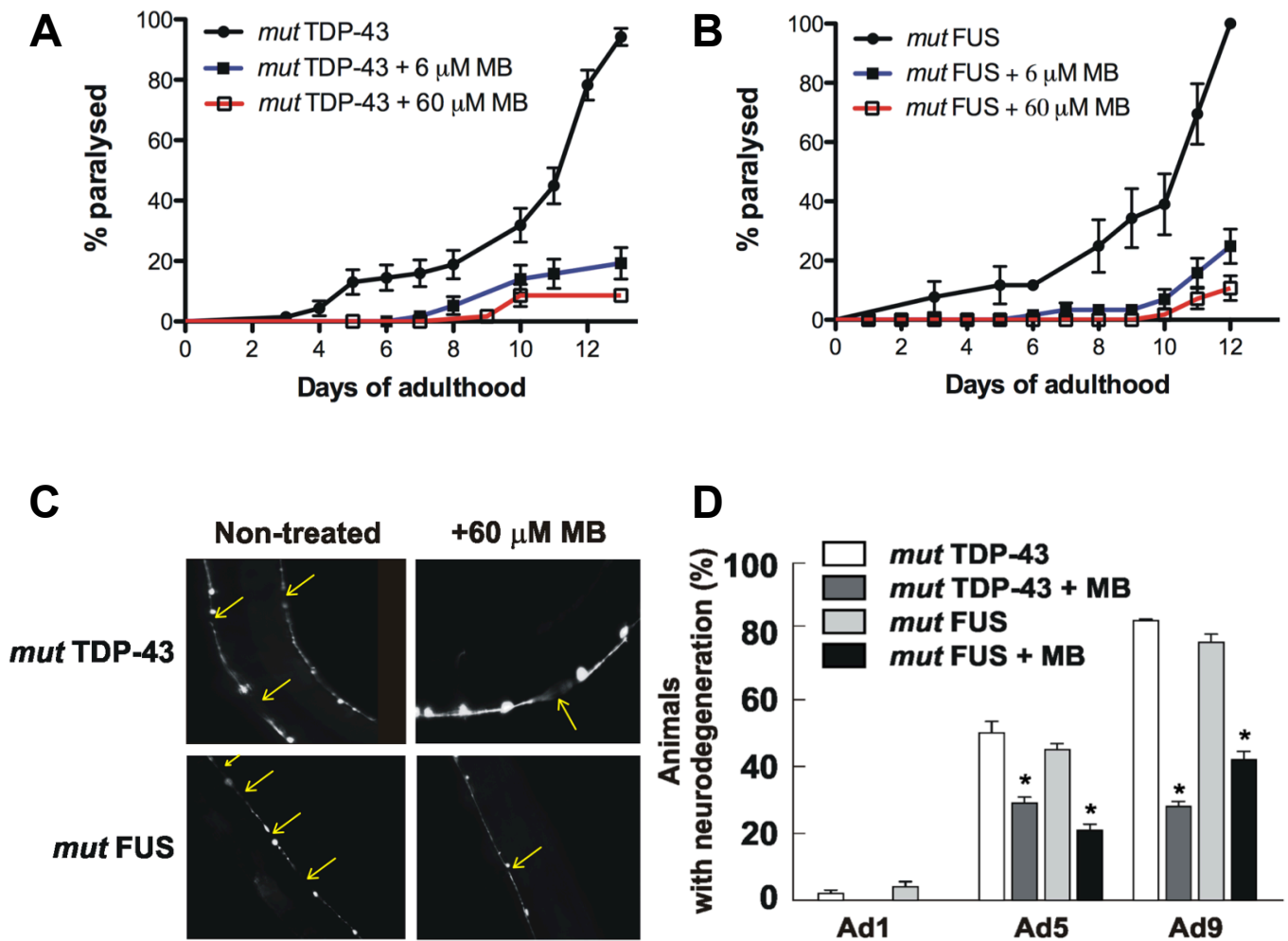


Figure 1.1: Le Bleu de Méthylène (MB) réduit la toxicité neuronale causée par TDP-43 et FUS.

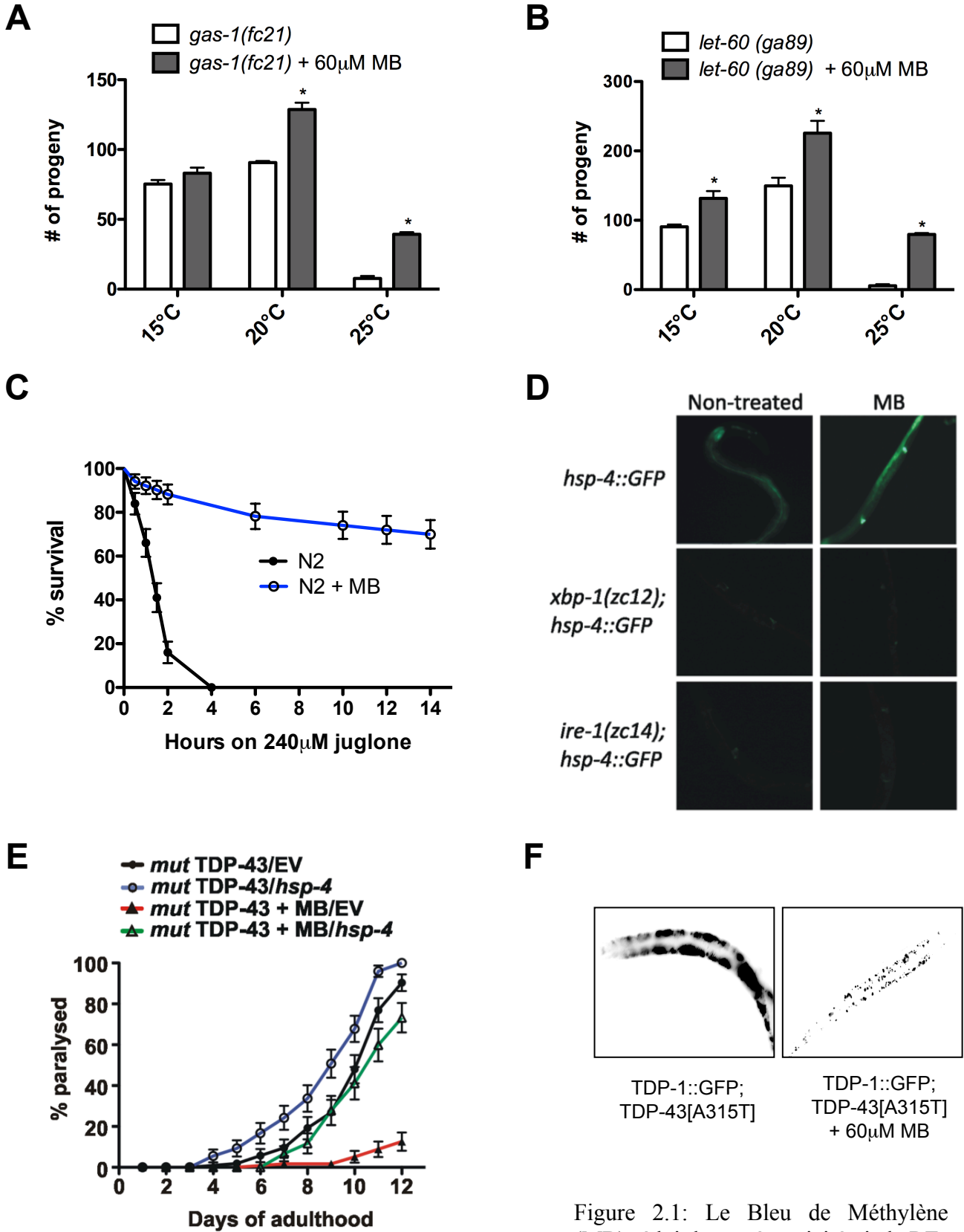
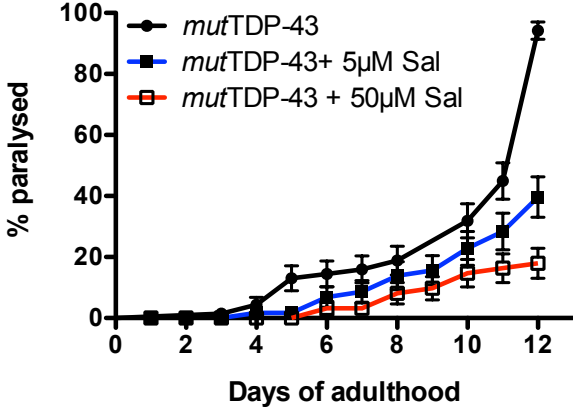


Figure 2.1: Le Bleu de Méthylène (MB) réduit la protéotoxicité via le RE.

A



B



C

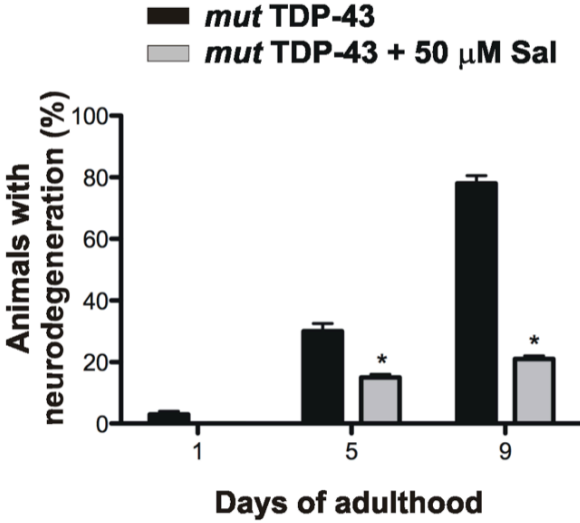


Figure 3.1 : Le salubrinal (Sal) permet aussi de diminuer la toxicité neuronale liée à TDP-43 et FUS.

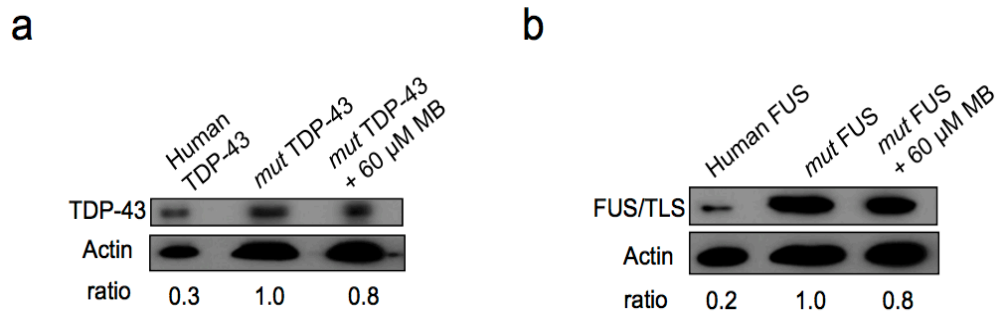


Figure Supplémentaire 1.1

Le traitement au Bleu de Méthylène n'affecte pas l'expression de *mut*TDP-43 ou *mut*FUS chez le ver.

a. Immunobuvardage de type western montrant des extraits de lymphoblastes humains (Human TDP-43) et vers transgéniques exprimant TDP-43 mutante avec ou sans 60 μ M de MB (Bleu de Méthylène). Les différences de niveau d'expression ne sont pas significatives après traitement au MB.

b. Immunobuvardage de type western montrant des extraits de lymphoblastes humains (Human FUS) et vers transgéniques exprimant FUS mutante avec ou sans 60 μ M de MB (Bleu de Méthylène). Les différences de niveau d'expression ne sont pas significatives après traitement au MB.

Ces expériences ont été réalisées trois fois en utilisant des extraits protéiques indépendants, une figure représentative est présentée ci-dessus. Les ratios sont le résultat de trois expériences indépendantes.

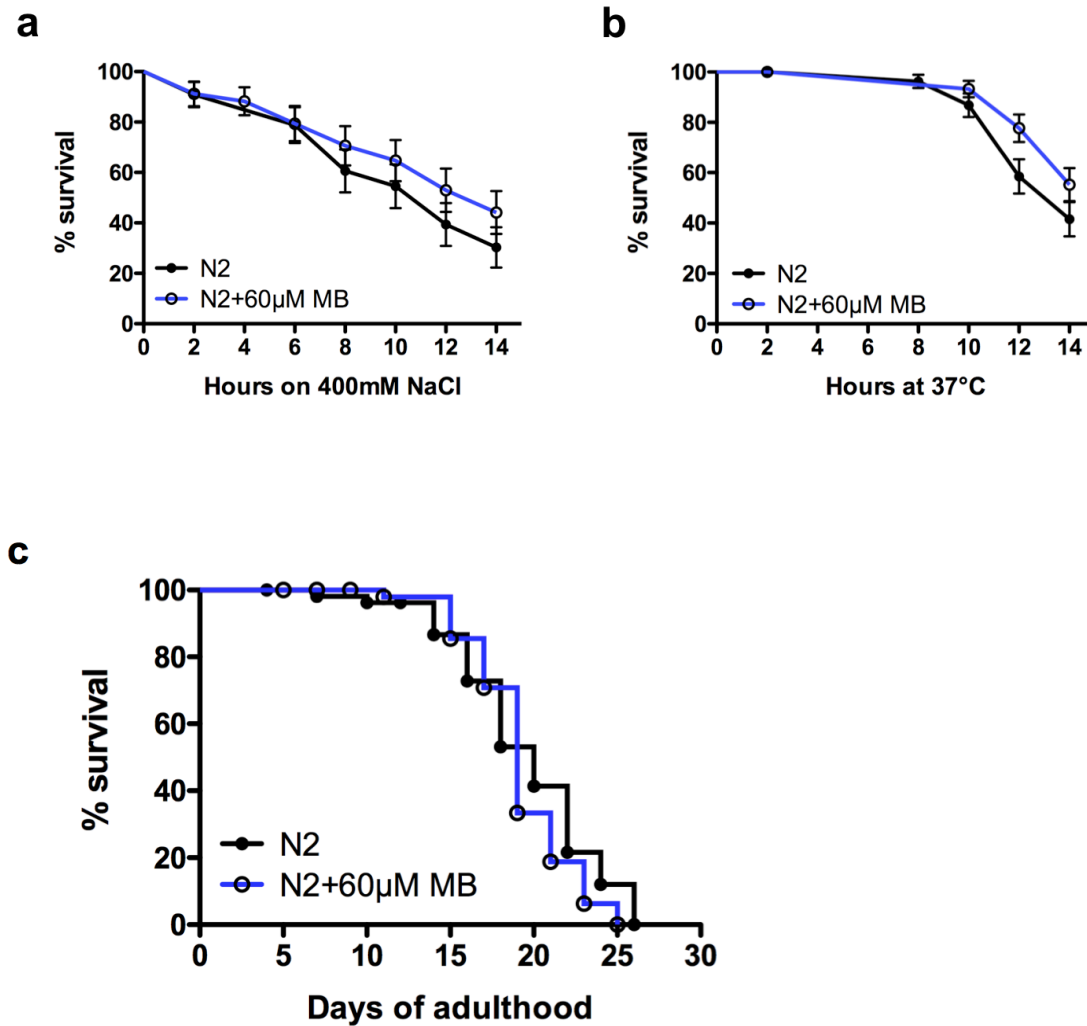


Figure Supplémentaire 2.1

Le Bleu de Méthylène n'a aucun effet sur le stress osmotique, le stress thermique et la longévité.

a. Les vers N2 sauvages traités avec 60 μ M de MB (Bleu de Méthylène) sont aussi sensibles au stress osmotique que des vers non traités.

b. Le MB ne permet pas au vers N2 sauvages d'être résistants au stress thermique.

c. Les vers cultivés sur MB présentent une durée de vie comparable à celle de vers N2 non traités.

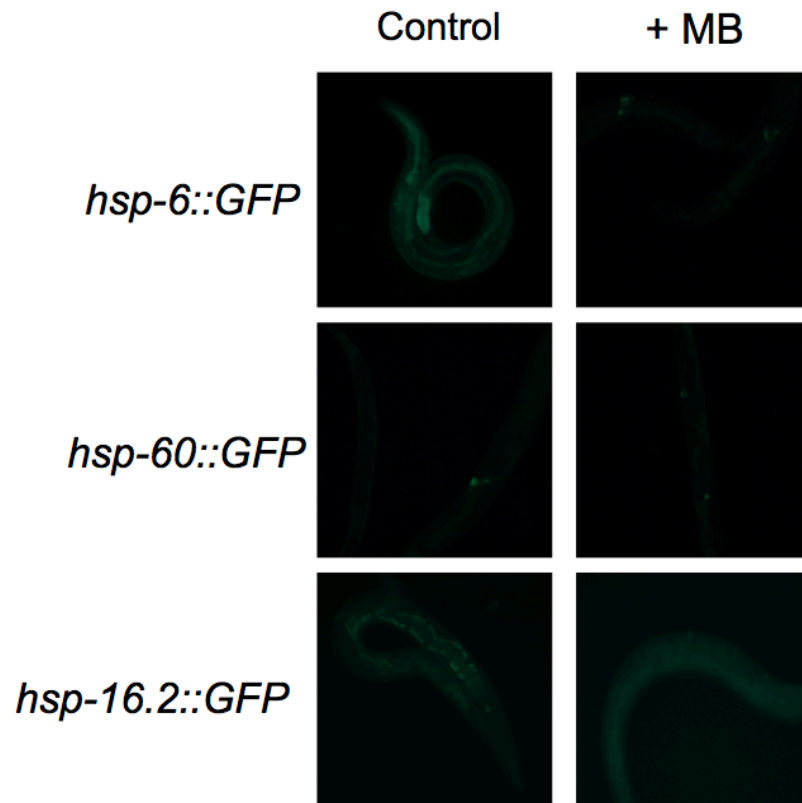


Figure Supplémentaire 2.2

Le Bleu de Méthylène ne permet pas d'induire une réponse au stress globale.

Le Bleu de Méthylène (MB) n'induit pas l'expression de GFP dans certaines souches de réponse au stress dont *hsp-6*, *hsp-60* et *hsp-16.2*.

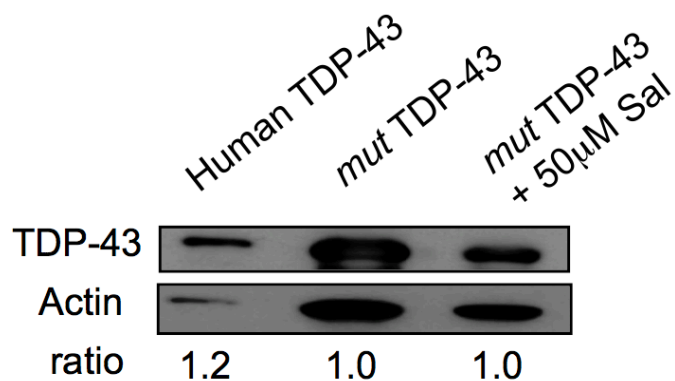


Figure Supplémentaire 3.1

L'expression de TDP-43 est inchangée après traitement au Salubrinal.

« Human TDP-43 » montre l'expression de TDP-43 humaine dans des lignées cellulaires de lymphoblastes humains. *mut*TDP-43 fait référence à l'expression de TDP-43 mutante humaine chez les vers transgéniques. Le niveau d'expression de TDP-43 n'est pas affecté après traitement des vers au Salubrinal (Sal).

Ces expériences ont été réalisées trois fois en utilisant des extraits protéiques indépendants, une figure représentative est présentée ci-dessus. Les ratios sont le résultat de trois expériences indépendantes.

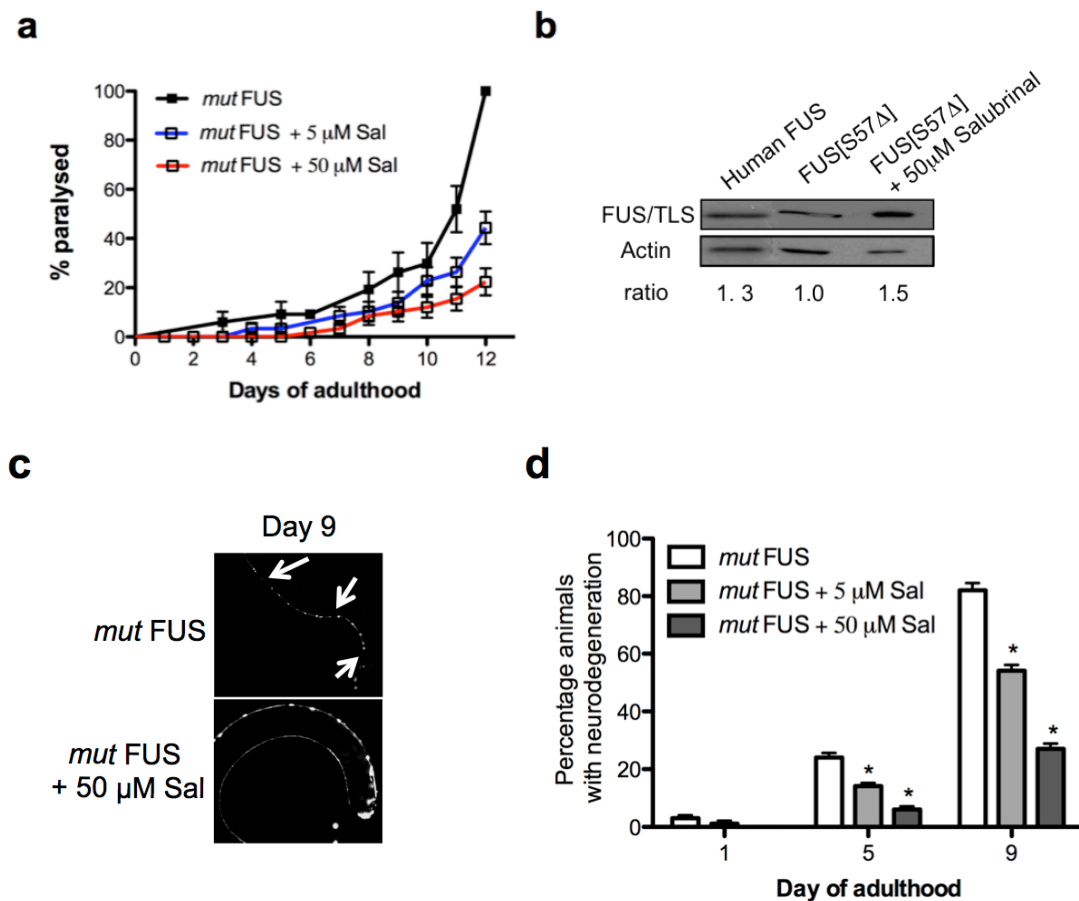


Figure Supplémentaire 3.2

Le Salubrinol réduit la toxicité associée à FUS mutante chez le ver.

a. Le traitement au Salubrinol (Sal) permet de réduire le taux de paralysie des vers transgéniques FUS ($P < 0.001$ comparé aux vers non traités).

b. « Human FUS » montre l'expression de la protéine FUS humaine dans des lignées cellulaires de lymphoblastes humains. Le Sal ne provoque pas de réduction de l'expression de *mutFUS* comparé au vers non traités.

c. Photos représentatives des motoneurones chez des vers transgéniques exprimant *mutFUS* avec ou sans traitement au Sal. Les flèches montrent la dégénérescence des motoneurones.

d. Quantification de la neurodégénérescence des motoneurones chez des vers transgéniques *mutFUS* avec ou sans traitement au Sal. *P < 0.001 comparé aux vers non traités.

E. Discussion

tdp-1 est important pour la longévité et la réponse au stress cellulaire

Le travail réalisé lors de cette étude démontre que *tdp-1* est un gène clé dans la réponse au stress cellulaire, à l'interface entre la voie de signalisation Insuline/IGF, le stress du RE et la protéotoxicité. Le rôle de TDP-1 dans la longévité semble complexe et suggère que les vers, tout comme d'autres espèces, sont sensibles au niveau d'expression de TDP-1/TDP-43 [21, 73, 78]. En effet, en conditions normales sa surexpression est toxique et réduit la longévité, tandis que sa délétion provoque une légère augmentation de la durée de vie des vers tout en les rendant spécifiquement sensibles à certains stress environnementaux. TDP-1 semble aussi essentiel pour la protection contre les stress oxydatif et osmotique, toutefois la régulation de *tdp-1* en réponse au stress osmotique coïncide en partie seulement avec la voie de signalisation Insuline/IGF et est indépendante de DAF-16.

L'ensemble de nos résultats chez *C. elegans* indique qu'il existe une interaction génétique entre *tdp-1* et *daf-16*/FOXO, ce dernier faisant partie d'une famille de facteurs de transcription très importants dans la réponse au stress et le vieillissement [106]. De plus, nous observons chez les vers mutants *daf-2(e1370);tdp-1(ok803)* une diminution de l'expression d'un gène cible de DAF-16, la superoxide dismutase *sod-3*, suggérant une activité post-transcriptionnelle de *tdp-1*.

Le stress cellulaire régule l'expression de TDP-1 via la voie de signalisation Insuline/IGF

Un aspect intéressant de la régulation de l'expression de *tdp-1* par la voie Insuline/IGF développé dans notre étude repose sur le mouvement de TDP-1 depuis le noyau vers le cytoplasme. En effet, TDP-1 est supposée être une protéine de liaison à ADN/ARN et sa présence dans le cytoplasme suggère un rôle potentiel dans l'homéostasie des ARNs induite par le stress. Nous savons qu'en condition de stress cellulaire des complexes ribonucléoprotéiques tels que les GS se forment afin de réaliser le triage moléculaire des ARNs. En effet, ceux-ci sont triés dans le but d'être stockés, dégradés ou traduits pendant la durée du stress et le temps de récupération [107]. Le rôle de ces complexes dans le cadre de stress aigus a été largement étudié [107] alors que leur rôle dans la réponse à un stress chronique, par diminution de la voie Insuline/IGF par exemple, reste inconnu. Plus particulièrement dans le cas de mutations de TDP-43 ou FUS, la protéotoxicité qui en résulte va générer différentes formes de stress persistants, encodés génétiquement, et différents des stress environnementaux. Par conséquent, l'augmentation de l'expression de TDP-1 qui en résulte aura des effets négatifs sur la survie neuronale à long terme.

La souche *TDP-1::GFP*, exprimant la protéine TDP-1 sous contrôle du promoteur *tdp-1*, représente un outil de qualité pour l'observation des effets du stress sur l'expression de cette protéine dans le ver. Grâce à cet outil nous avons pu confirmer les résultats obtenus lors de nos tests de résistance aux stress. En effet, l'expression de *tdp-1* est reliée à la voie Insuline/IGF. Une diminution de l'activité de cette voie de signalisation, de même que l'exposition aux stress oxydatif et osmotique provoquent une augmentation de l'expression de *tdp-1*.

Puis, via ce modèle *in vivo* nous confirmons que l'augmentation de l'expression de *tdp-1* en condition de stress oxydatif est dépendante de *daf-16*. En revanche, en condition de stress osmotique l'expression de *tdp-1* est indépendante de *daf-16*, l'ensemble soutenant l'existence de voies de signalisation alternatives et chevauchantes dans la réponse au stress osmotique [108].

TDP-1/TDP-43 et la réponse au stress du RE

Nous avons démontré que l'expression de *tdp-1* est régulée à la fois par la voie de signalisation Insuline/IGF et la réponse au stress du RE au sein de nos modèles. Étant donné l'importance de ces deux voies dans la survie cellulaire, l'identification de TDP-1/TDP-43 en tant qu'élément clé de ces voies de signalisation pourrait directement les relier au développement de la pathologie de la SLA. C'est pourquoi l'étude du rôle de TDP-1/TDP-43 ainsi que l'étude de la régulation de la voie Insuline/IGF pourraient être pertinentes dans le cas de maladies humaines telles que la SLA ou la DFTL.

La forme mutante de TDP-43 est connue pour ses propriétés d'agrégation cytoplasmique dans la SLA, et l'accumulation de TDP-43 sauvage a été observée dans plusieurs autres maladies neurodégénératives [17]. En effet, il est aujourd'hui reconnu que certaines conditions cellulaires telles que la présence de mutations faux-sens provoquent une augmentation du mauvais repliement protéique menant à un stress du RE sévère. Ces mutations auront aussi pour conséquence l'accumulation de protéines non/mal repliées causant un stress du RE fatal [109, 110]. Avec l'utilisation de la dihydrofluorescéine diacétate nous avons observé chez nos souches mutantes TDP-43 et FUS la présence d'importants dommages du stress oxydatif non constatés chez les souches sauvages. Ces

résultats suggèrent qu'en plus de l'activation de la réponse UPR^{ER}, TDP-43 et FUS mutantes génèrent du stress oxydatif. Ainsi, ces informations renforcent l'idée que la mort cellulaire résultant du stress du RE puisse constituer un mécanisme à la base de la mort des motoneurones dans la SLA [65].

La réduction de la voie Insuline/IGF permet de diminuer la toxicité des protéines qui tendent à s'agréger comme TDP-43 au sein de plusieurs modèles de protéotoxicité [75, 111]. Enfin, de récents travaux ont établi l'existence d'un dialogue et d'une rétroaction entre la voie Insuline/IGF et la réponse au stress du RE allant en faveur d'une relation entre ces deux voies de signalisation dans le développement de la SLA [112].

Impact de la modulation de l'expression de TDP-1 sur la protéotoxicité associée aux mutations de TDP-43 et FUS

En observant une augmentation de la réponse UPR^{ER} nous avons démontré que TDP-43 mutante cause de la protéotoxicité chez *C. elegans*. Ce phénomène semble se produire dans le but de réduire la toxicité associée à un mauvais repliement de TDP-43. Une des conséquences de la protéotoxicité liée à TDP-43 ou FUS mutantes repose sur l'induction de l'expression du gène *tdp-1* endogène qui devient davantage cytoplasmique. *tdp-1* est requis pour la résistance au stress mais des niveaux d'expression élevés de ce gène sont toxiques, aggravent la paralysie et la neurodégénérescence, et réduisent la longévité de nos vers transgéniques. De ce point de vue, nous pouvons penser que l'induction de *tdp-1* sauvage en condition de protéotoxicité puisse favoriser et accélérer la neurodégénérescence. Cette donnée pourrait être cruciale dans la compréhension de l'accumulation de TDP-43 sauvage dans le cas de plusieurs désordres neurodégénératifs.

Par ailleurs, nous savons que TDP-43 peut lier son propre ARNm et réguler son propre niveau d'expression [21]. Une induction chronique de TDP-43 due à de la protéotoxicité et/ou à une perte progressive d'autorégulation liées au vieillissement pourraient donc aussi contribuer à la neurodégénérescence.

Les modèles TDP-43 déjà décrits montrent tous de la toxicité liée à la surexpression de TDP-43 sauvage, et parfois même autant de toxicité que pour l'expression de TDP-43 mutante [73-75, 82, 85, 89, 113]. Ceci renforce l'idée que le contrôle des niveaux d'expression de TDP-43 est crucial pour le fonctionnement et la survie cellulaires car TDP-43 contribue fort probablement à la toxicité neuronale. Nous avons testé cette hypothèse génétiquement à l'aide de nos modèles *C. elegans* en construisant des souches qui co-expriment TDP-43 mutante et une délétion du gène *tdp-1* endogène du ver. Ces souches montrent une réduction significative du déficit moteur et de la dégénérescence des motoneurons normalement observés chez les vers exprimant la protéine TDP-43 humaine mutante. D'autres études se sont intéressées à ce type de construction et n'ont observé aucun effet sur la toxicité associée à TDP-43 après délétion du gène *tdp-1* endogène [73, 74]. Nous pensons que ceci est dû aux différences dans la construction de nos modèles, les nôtres exprimant TDP-43 uniquement dans les 26 motoneurons GABAergiques [114] alors que les autres modèles décrits reposent sur l'expression de TDP-43 dans tout le système nerveux du ver [73, 74].

Nos modèles transgéniques montrent des déficits moteurs progressifs à l'âge adulte et de la neurodégénérescence (Vaccaro et al. en révision) alors que ceux développés par d'autres groupes présentent des problèmes de non coordination motrice précoces. Cette différence semble indiquer que l'expression de TDP-43 dans l'intégralité

du système nerveux provoque des phénotypes trop sévères pour qu'une modulation par réduction de l'expression du gène *tdp-1* endogène soit possible. D'autre part, nos résultats sont renforcés par nos observations chez le mutant FUS où l'on peut aussi réduire la toxicité liée à FUS par délétion de *tdp-1* endogène. Enfin, tout ceci consolide un peu plus la notion selon laquelle l'induction protéotoxique de TDP-1 puisse propager la toxicité de manière non restrictive à la protéine TDP-43.

À l'inverse, une étude récente montre que la surexpression de TDP-43 sauvage et/ou FUS chez la *Drosophila* contribue à augmenter la toxicité associée à TDP-43 ou à FUS mutantes [115]. Dans cette étude nous avons approfondi ce résultat en montrant que la délétion de *tdp-1* sauvage endogène permet de supprimer la toxicité de TDP-43 et FUS dans les motoneurones. Ces informations sont d'une grande importance étant donné la toxicité observée dans d'autres systèmes de surexpression de TDP-43, et suggèrent que l'expression de TDP-1/TDP-43 sauvage à un niveau physiologique contribue activement à la neurodégénérescence.

La diminution du stress du RE par voie pharmacologique protège contre la toxicité neuronale associée à TDP-43 et FUS *in vivo*

Nous avons développé une nouvelle plateforme génétique de criblage pharmacologique pour la SLA qui pourrait être pertinente dans le cadre d'autres neuropathologies associées à TDP-43 et FUS. Nous avons réalisé un criblage pilote d'une quinzaine de composés déjà connus pour leur effet positif ou négatif sur le système nerveux. Nous avons ainsi validé notre système comme outil de détection de suppresseurs de toxicité associée à TDP-43 et FUS, et de cette façon avons isolé le Bleu de Méthylène (BM), un composé capable de réduire significativement les déficits

moteurs de nos souches transgéniques en culture liquide. Ensuite nous avons validé l'efficacité du BM sur milieu NGM en montrant que ce composé permet de réduire les déficits moteurs et la neurodégénérescence des souches transgéniques mutantes TDP-43 et FUS. Les effets positifs observés sont dépendants de la dose de BM utilisée. Le BM a aussi un effet sur le repliement protéique puisque le traitement des mutants *gas-1* et *let-60* avec du BM permet une amélioration de la fécondité, ces deux souches devenant stériles à certaines températures par mauvais repliement protéique. Enfin, le BM confère une protection contre le stress oxydatif généré par le Juglone chez les vers N2 sauvages non transgéniques.

Le BM n'est pas inconnu du milieu de la recherche sur le système nerveux. En effet, ce composé a déjà démontré ses propriétés thérapeutiques sur des modèles de maladies d'Alzheimer et de Parkinson [99, 100] et subit actuellement des essais cliniques de phase III pour des patients atteints de la maladie d'Alzheimer [98]. Dans notre cas nous avons pu observer que le BM fonctionne à travers la voie de signalisation de réponse au stress du RE. Le BM induit spécifiquement l'expression de la chaperone du RE, *hsp-4*, et une diminution de l'expression de ce gène par ARNi annule l'effet du BM sur la paralysie. Enfin, nous avons montré que le traitement avec du BM des vers *TDP-1::GFP ;TDP-43[A315T]* permet de limiter l'induction de TDP-1.

En restant sur la piste du RE nous avons cherché à tester un autre composé connu pour fonctionner via l'activation de voies de signalisations du stress du RE. De cette façon nous avons testé le Salubrinal (Sal), déjà connu pour sa capacité d'activation de voies de signalisations de réponse au stress généralement activées par du stress oxydatif ou par l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE. Le traitement des vers

transgéniques TDP-43 mutants montre une réduction significative des déficits moteurs et de la dégénérescence neuronale. Puis, le traitement de vers *hsp-4::GFP* avec du Sal présentent une induction du signal GFP témoignant de l'augmentation de l'expression de cette chaperone impliquée dans la réponse au stress du RE.

L'activation de la réponse au stress du RE pourrait bien être une caractéristique commune de la mort des motoneurones dans la SLA [65]. À travers l'utilisation de nos souches transgéniques nous démontrons que le BM confère des propriétés protectrices contre la paralysie, la neurodégénérescence, le mauvais repliement protéique, et le stress oxydatif. Nous avons ainsi découvert que la diminution pharmacologique de la réponse au stress du RE protège les motoneurones contre la protéotoxicité liée à TDP-43 ou FUS mutantes. Notre stratégie génétique pharmacologique tend vers de plus amples approfondissements du rôle du stress du RE dans la mort des motoneurones. En effet, cette stratégie représente un outil de grande valeur pour le développement et la découverte de futurs traitements contre les maladies neurodégénératives.

F. Conclusion

Le mécanisme de toxicité causée par la protéine TDP-43 mutante reste encore mystérieux à ce jour, et des questions persistent quant à l'implication d'un mécanisme de gain et/ou de perte de fonction(s). Toutefois, des travaux réalisés sur le poisson zébré suggèrent que ce mécanisme impliquerait à la fois un gain et une perte de fonction(s) de cette protéine [116].

Nos résultats introduisent un nouveau mécanisme de gain de fonction dans lequel l'augmentation de l'expression de TDP-1 sauvage est induite suite à un stress protéotoxique. En effet, les résultats de notre étude démontrent que le stress protéotoxique, généré par une mutation de TDP-43 par exemple, induit la réponse UPR et active la voie de réponse au stress du RE, comme en témoigne l'induction de l'expression de la chaperone du RE HSP-4. Nous savons par ailleurs que l'activation de la réponse UPR induit une augmentation de l'expression de Ero1. Par conséquent, un stress du RE soutenu et une activation prolongée de la réponse UPR provoquent une hausse de la production d'espèces réactives à l'oxygène [117]. Dans notre étude, nous avons pu le constater chez nos souches transgéniques TDP-43 et FUS mutantes via l'utilisation de la dihydrofluorescéine diacétate dont la fluorescence témoigne de la présence de dommages oxydatifs. Enfin, nous avons aussi montré que le stress oxydatif cause une hausse de l'expression de TDP-1 via le facteur de transcription DAF-16 dans la voie Insuline/IGF. Il est aussi intéressant de remarquer que l'induction de l'expression de TDP-1 par le stress osmotique est elle, indépendante de DAF-16, et semble fonctionner dans une voie parallèle/chevauchante à celle activée lors d'un stress oxydatif.

Quant aux effets sur l'organisme de l'augmentation de l'expression de TDP-1 sauvage, il semble qu'à court terme elle soit importante pour le métabolisme des ARNms et la résistance au stress ; toutefois à plus long terme, c'est-à-dire au cours du vieillissement, cette hausse soutenue de la quantité de TDP-1/TDP-43 sauvage semble créer une réponse à un stress chronique avec des effets néfastes sur l'organisme tels que de la toxicité cellulaire, de la neurodégénérescence et une réduction de la longévité.

D'autre part, dans le but d'identifier de nouvelles molécules neuroprotectrices nous avons réalisé un criblage pilote de molécules capables de supprimer la toxicité neuronale causée par les formes mutantes de TDP-43 et FUS au sein de nos modèles *C. elegans* transgéniques. Nous avons ainsi identifié le Bleu de Méthylène et le Salubrinal comme supprimeurs potentiels de toxicité liée à TDP-43 et FUS, via réduction de la réponse au stress du RE. Enfin, nos résultats indiquent que l'homéostasie de repliement protéique dans le RE constitue une cible importante dans le développement de thérapies contre les maladies neurodégénératives.

De là, plusieurs stratégies peuvent être mises en place afin de réduire la toxicité neuronale causée par TDP-43 sauvage ou mutante. Parmi celles-ci, nous pourrions penser à viser une diminution du niveau d'expression de TDP-43 sauvage et mutante, et/ou une réduction de la réponse au stress UPR^{ER} en favorisant le repliement protéique. Pour le futur et dans l'optique d'un mécanisme commun de mort cellulaire, il sera important de déterminer si ces stratégies visant à diminuer la toxicité neuronale causée par TDP-43 sont appropriées pour d'autres maladies neurodégénératives.

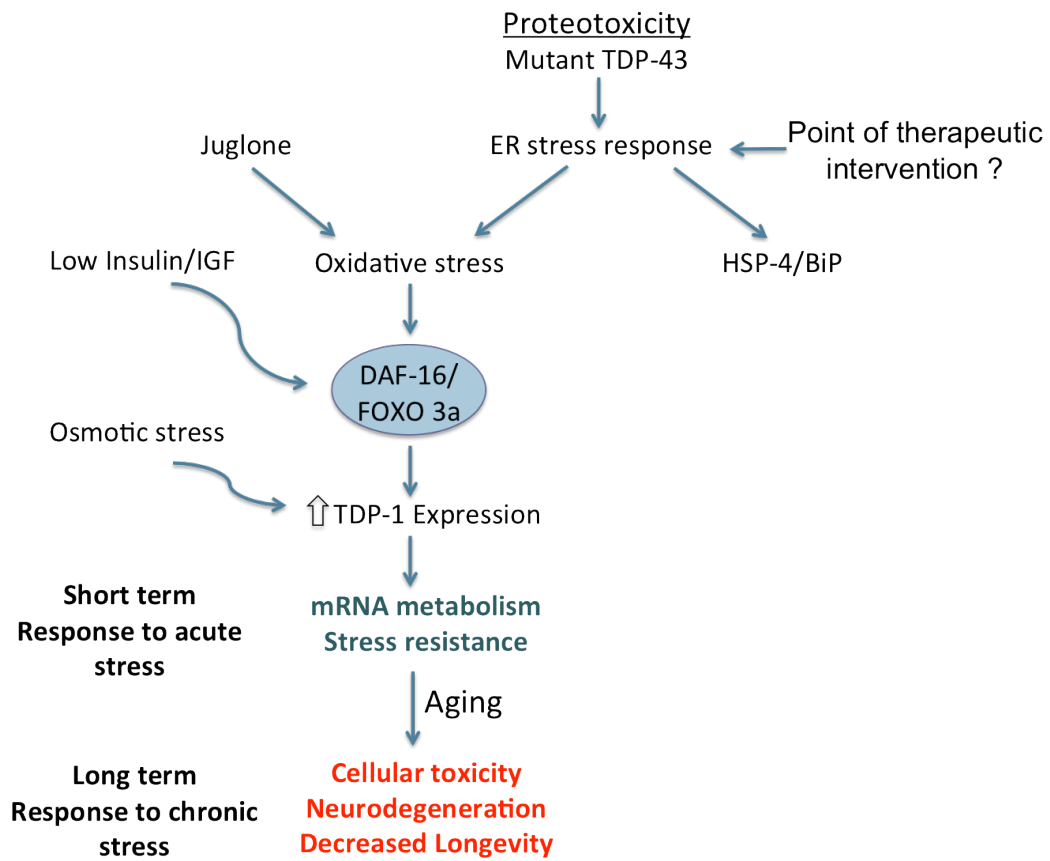


Figure 1.1 : Modèle de l'implication de TDP-1/TDP-43 dans la réponse au stress et le vieillissement. (Vaccaro et al., *en préparation*)

Bibliographie

1. Bruijn, L.I., T.M. Miller, and D.W. Cleveland, *Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS*. *Annu Rev Neurosci*, 2004. **27**: p. 723-49.
2. van Blitterswijk, M. and J.E. Landers, *RNA processing pathways in amyotrophic lateral sclerosis*. *Neurogenetics*, 2010. **11**(3): p. 275-90.
3. Silani, V., V. Meininger, and F. Fornai, *Introducing Amyotrophic lateral sclerosis*. *Arch Ital Biol*, 2011. **149**(1): p. 1-4.
4. Strong, M.J., *The basic aspects of therapeutics in amyotrophic lateral sclerosis*. *Pharmacol Ther*, 2003. **98**(3): p. 379-414.
5. Kim, S.U. and J. de Vellis, *Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review*. *J Neurosci Res*, 2009. **87**(10): p. 2183-200.
6. Barber, S.C. and P.J. Shaw, *Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **48**(5): p. 629-41.
7. Mattson, M.P., *Apoptosis in neurodegenerative disorders*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. **1**(2): p. 120-9.
8. Dion, P.A., H. Daoud, and G.A. Rouleau, *Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(11): p. 769-82.
9. Deng, H.X., et al., *Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia*. *Nature*, 2011. **477**(7363): p. 211-5.
10. DeJesus-Hernandez, M., et al., *Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS*. *Neuron*, 2011. **72**(2): p. 245-56.
11. Renton, A.E., et al., *A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD*. *Neuron*, 2011. **72**(2): p. 257-68.
12. Andersen, P.M. and A. Al-Chalabi, *Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know?* *Nat Rev Neurol*, 2011. **7**(11): p. 603-15.
13. Lagier-Tourenne, C. and D.W. Cleveland, *Rethinking ALS: the FUS about TDP-43*. *Cell*, 2009. **136**(6): p. 1001-4.

14. Neumann, M., et al., *Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis*. Science, 2006. **314**(5796): p. 130-3.
15. Kwiatkowski, T.J., Jr., et al., *Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis*. Science, 2009. **323**(5918): p. 1205-8.
16. Vance, C., et al., *Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6*. Science, 2009. **323**(5918): p. 1208-11.
17. Lagier-Tourenne, C., M. Polymenidou, and D.W. Cleveland, *TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(R1): p. R46-64.
18. Da Cruz, S. and D.W. Cleveland, *Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond*. Curr Opin Neurobiol, 2011.
19. Buratti, E. and F.E. Baralle, *The multiple roles of TDP-43 in pre-mRNA processing and gene expression regulation*. RNA Biol, 2010. **7**(4): p. 420-9.
20. Gendron, T.F., K.A. Josephs, and L. Petrucelli, *Review: transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43): mechanisms of neurodegeneration*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2010. **36**(2): p. 97-112.
21. Ayala, Y.M., et al., *TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop*. EMBO J, 2011. **30**(2): p. 277-88.
22. Ayala, Y.M., et al., *Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 22): p. 3778-85.
23. Budini, M. and E. Buratti, *TDP-43 Autoregulation: Implications for Disease*. J Mol Neurosci, 2011.
24. Nishimoto, Y., et al., *Characterization of alternative isoforms and inclusion body of the TAR DNA-binding protein-43*. J Biol Chem, 2010. **285**(1): p. 608-19.
25. Kabashi, E., et al., *TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 572-4.
26. Polymenidou, M., et al., *Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43*. Nat Neurosci, 2011. **14**(4): p. 459-68.

27. Anderson, P. and N. Kedersha, *Stress granules: the Tao of RNA triage*. Trends Biochem Sci, 2008. **33**(3): p. 141-50.
28. McDonald, K.K., et al., *TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(7): p. 1400-10.
29. Liu-Yesucevitz, L., et al., *Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13250.
30. Colombrita, C., et al., *TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult*. J Neurochem, 2009. **111**(4): p. 1051-61.
31. Dewey, C.M., et al., *TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(5): p. 1098-108.
32. Amador-Ortiz, C., et al., *TDP-43 immunoreactivity in hippocampal sclerosis and Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 2007. **61**(5): p. 435-45.
33. Bigio, E.H., *TAR DNA-binding protein-43 in amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal lobar degeneration, and Alzheimer disease*. Acta Neuropathol, 2008. **116**(2): p. 135-40.
34. Rutherford, N.J., et al., *Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis*. PLoS Genet, 2008. **4**(9): p. e1000193.
35. Xiao, S., et al., *RNA targets of TDP-43 identified by UV-CLIP are deregulated in ALS*. Mol Cell Neurosci, 2011. **47**(3): p. 167-80.
36. Buratti, E. and F.E. Baralle, *TDP-43: new aspects of autoregulation mechanisms in RNA binding proteins and their connection with human disease*. FEBS J, 2011. **278**(19): p. 3530-8.
37. Daoud, H., et al., *Contribution of TARDBP mutations to sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. J Med Genet, 2009. **46**(2): p. 112-4.
38. Ling, S.C., et al., *ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(30): p. 13318-23.

39. Gal, J., et al., *Nuclear localization sequence of FUS and induction of stress granules by ALS mutants*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(12): p. 2323 e27-40.
40. Chen-Plotkin, A.S., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease*. Nat Rev Neurol, 2010. **6**(4): p. 211-20.
41. Yang, S., et al., *Fused in sarcoma/translocated in liposarcoma: a multifunctional DNA/RNA binding protein*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(9): p. 1408-11.
42. Morohoshi, F., et al., *Genomic structure of the human RBP56/hTAFII68 and FUS/TLS genes*. Gene, 1998. **221**(2): p. 191-8.
43. Aman, P., et al., *Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS*. Genomics, 1996. **37**(1): p. 1-8.
44. Burd, C.G. and G. Dreyfuss, *Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins*. Science, 1994. **265**(5172): p. 615-21.
45. Iko, Y., et al., *Domain architectures and characterization of an RNA-binding protein, TLS*. J Biol Chem, 2004. **279**(43): p. 44834-40.
46. Neumann, M., et al., *A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology*. Brain, 2009. **132**(Pt 11): p. 2922-31.
47. Ito, D., et al., *Nuclear transport impairment of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations in FUS/TLS*. Ann Neurol, 2010.
48. Perrotti, D., et al., *BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2*. Nat Genet, 2002. **30**(1): p. 48-58.
49. Law, W.J., K.L. Cann, and G.G. Hicks, *TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2006. **5**(1): p. 8-14.
50. Calvio, C., et al., *Identification of hnRNP P2 as TLS/FUS using electrospray mass spectrometry*. RNA, 1995. **1**(7): p. 724-33.
51. Zinszner, H., et al., *TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleocytoplasmic shuttling*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 15): p. 1741-50.
52. Fujii, R., et al., *The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology*. Curr Biol, 2005. **15**(6): p. 587-93.

53. Andersson, M.K., et al., *The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response*. BMC Cell Biol, 2008. **9**: p. 37.
54. Dormann, D., et al., *ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import*. EMBO J, 2010. **29**(16): p. 2841-57.
55. Blair, I.P., et al., *FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2010. **81**(6): p. 639-45.
56. Geser, F., et al., *Evidence of multisystem disorder in whole-brain map of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis*. Arch Neurol, 2008. **65**(5): p. 636-41.
57. Nishihira, Y., et al., *Sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration is associated with relatively mild TDP-43 pathology*. Acta Neuropathol, 2009. **117**(1): p. 45-53.
58. Arai, T., et al., *Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy*. Neuropathology, 2010. **30**(2): p. 170-81.
59. Bosco, D.A., et al., *Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(21): p. 4160-75.
60. Schroder, M., *Endoplasmic reticulum stress responses*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(6): p. 862-94.
61. Fulda, S., et al., *Cellular stress responses: cell survival and cell death*. Int J Cell Biol, 2010. **2010**: p. 214074.
62. Duan, W., et al., *Mutant TAR DNA-binding protein-43 induces oxidative injury in motor neuron-like cell*. Neuroscience, 2010. **169**(4): p. 1621-9.
63. Palotai, R., M.S. Szalay, and P. Csermely, *Chaperones as integrators of cellular networks: changes of cellular integrity in stress and diseases*. IUBMB Life, 2008. **60**(1): p. 10-8.
64. Csermely, P., *Chaperone overload is a possible contributor to 'civilization diseases'*. Trends Genet, 2001. **17**(12): p. 701-4.

65. Kanekura, K., et al., *ER stress and unfolded protein response in amyotrophic lateral sclerosis*. Mol Neurobiol, 2009. **39**(2): p. 81-9.
66. Ilieva, E.V., et al., *Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. Brain, 2007. **130**(Pt 12): p. 3111-23.
67. Atkin, J.D., et al., *Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. Neurobiol Dis, 2008. **30**(3): p. 400-7.
68. Wang, H.Y., et al., *Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family*. Genomics, 2004. **83**(1): p. 130-9.
69. M.-A. Félix, M.L., L. Ségalat, *Caenorhabditis elegans-Un organisme modèles en biologie*. Hermann ed2002.
70. *Worm Book*. Available from: http://www.wormbook.org/chapters/www_gaba/gaba.html.
71. *Worm Base*. Available from: <http://www.wormbase.org/>.
72. Ayala, Y.M., et al., *Human, Drosophila, and C.elegans TDP43: nucleic acid binding properties and splicing regulatory function*. J Mol Biol, 2005. **348**(3): p. 575-88.
73. Ash, P.E., et al., *Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in C. elegans*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(16): p. 3206-18.
74. Liachko, N.F., C.R. Guthrie, and B.C. Kraemer, *Phosphorylation promotes neurotoxicity in a Caenorhabditis elegans model of TDP-43 proteinopathy*. J Neurosci, 2010. **30**(48): p. 16208-19.
75. Zhang, T., et al., *TDP-43 neurotoxicity and protein aggregation modulated by heat shock factor and insulin/IGF-1 signaling*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(10): p. 1952-65.
76. Murakami, T., et al., *ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in Caenorhabditis elegans by a dominant gain-of-function mechanism*. Hum Mol Genet, 2011.

77. Bastow, E.L., C.W. Gourlay, and M.F. Tuite, *Using yeast models to probe the molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis*. *Biochem Soc Trans*, 2011. **39**(5): p. 1482-7.
78. Johnson, B.S., et al., *A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(17): p. 6439-44.
79. Armakola, M., M.P. Hart, and A.D. Gitler, *TDP-43 toxicity in yeast*. *Methods*, 2011. **53**(3): p. 238-45.
80. Kryndushkin, D., R.B. Wickner, and F. Shewmaker, *FUS/TLS forms cytoplasmic aggregates, inhibits cell growth and interacts with TDP-43 in a yeast model of amyotrophic lateral sclerosis*. *Protein Cell*, 2011. **2**(3): p. 223-36.
81. Fushimi, K., et al., *Expression of human FUS/TLS in yeast leads to protein aggregation and cytotoxicity, recapitulating key features of FUS proteinopathy*. *Protein Cell*, 2011. **2**(2): p. 141-9.
82. Kabashi, E., et al., *Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo*. *Hum Mol Genet*, 2010. **19**(4): p. 671-83.
83. Kabashi, E., et al., *FUS and TARDBP but not SOD1 interact in genetic models of amyotrophic lateral sclerosis*. *PLoS Genet*, 2011. **7**(8): p. e1002214.
84. Voigt, A., et al., *TDP-43-mediated neuron loss in vivo requires RNA-binding activity*. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12247.
85. Li, Y., et al., *A Drosophila model for TDP-43 proteinopathy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(7): p. 3169-74.
86. Feiguin, F., et al., *Depletion of TDP-43 affects Drosophila motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(10): p. 1586-92.
87. Tsai, K.J., et al., *Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTL D-U*. *J Exp Med*, 2010. **207**(8): p. 1661-73.
88. Swarup, V., et al., *Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments*. *Brain*, 2011. **134**(Pt 9): p. 2610-26.

89. Wils, H., et al., *TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(8): p. 3858-63.
90. Wang, D.B., et al., *Expansive gene transfer in the rat CNS rapidly produces amyotrophic lateral sclerosis relevant sequelae when TDP-43 is overexpressed*. Mol Ther, 2010. **18**(12): p. 2064-74.
91. Huang, C., et al., *FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration*. PLoS Genet, 2011. **7**(3): p. e1002011.
92. Owens, K.N., et al., *Identification of genetic and chemical modulators of zebrafish mechanosensory hair cell death*. PLoS Genet, 2008. **4**(2): p. e1000020.
93. Peterson, R.T., et al., *Small molecule developmental screens reveal the logic and timing of vertebrate development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 12965-9.
94. Jones, A.K., S.D. Buckingham, and D.B. Sattelle, *Chemistry-to-gene screens in Caenorhabditis elegans*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(4): p. 321-30.
95. Kwok, T.C., et al., *A small-molecule screen in C. elegans yields a new calcium channel antagonist*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 91-5.
96. Gidalevitz, T., et al., *Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases*. Science, 2006. **311**(5766): p. 1471-4.
97. Schirmer, R.H., et al., *"Lest we forget you - methylene blue ..."*. Neurobiol Aging, 2011.
98. Gura, T., *Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places*. Nat Med, 2008. **14**(9): p. 894.
99. Necula, M., et al., *Methylene blue inhibits amyloid Abeta oligomerization by promoting fibrillization*. Biochemistry, 2007. **46**(30): p. 8850-60.
100. Wischik, C.M., et al., *Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 11213-8.
101. Urano, F., et al., *A survival pathway for Caenorhabditis elegans with a blocked unfolded protein response*. J Cell Biol, 2002. **158**(4): p. 639-46.

102. Yoneda, T., et al., *Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 18): p. 4055-66.
103. Link, C.D., et al., *Direct observation of stress response in Caenorhabditis elegans using a reporter transgene*. Cell Stress Chaperones, 1999. **4**(4): p. 235-42.
104. Calfon, M., et al., *IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 92-6.
105. Saxena, S., E. Cabuy, and P. Caroni, *A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice*. Nat Neurosci, 2009. **12**(5): p. 627-36.
106. Murphy, C.T., et al., *Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of Caenorhabditis elegans*. Nature, 2003. **424**(6946): p. 277-83.
107. Anderson, P. and N. Kedersha, *RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(6): p. 430-6.
108. Rohlffing, A.K., et al., *Genetic and physiological activation of osmosensitive gene expression mimics transcriptional signatures of pathogen infection in C. elegans*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9010.
109. Bartoszewski, R., et al., *Activation of the unfolded protein response by deltaF508 CFTR*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **39**(4): p. 448-57.
110. Ito, D. and N. Suzuki, *Seipinopathy: a novel endoplasmic reticulum stress-associated disease*. Brain, 2009. **132**(Pt 1): p. 8-15.
111. Cohen, E., et al., *Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice*. Cell, 2009. **139**(6): p. 1157-69.
112. Henis-Korenblit, S., et al., *Insulin/IGF-1 signaling mutants reprogram ER stress response regulators to promote longevity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(21): p. 9730-5.
113. Estes, P.S., et al., *Wild-type and A315T mutant TDP-43 exert differential neurotoxicity in a Drosophila model of ALS*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(12): p. 2308-21.

114. McIntire, S.L., et al., *Identification and characterization of the vesicular GABA transporter*. Nature, 1997. **389**(6653): p. 870-6.
115. Lanson, N.A., Jr., et al., *A Drosophila model of FUS-related neurodegeneration reveals genetic interaction between FUS and TDP-43*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(13): p. 2510-23.
116. Kabashi, E., et al., *Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo*. Hum Mol Genet, 2009. **19**(4): p. 671-83.
117. Haynes, C.M., E.A. Titus, and A.A. Cooper, *Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death*. Mol Cell, 2004. **15**(5): p. 767-76.

G. Annexes**Mutant TDP-43 and FUS cause age-dependent paralysis and neurodegeneration in *C. elegans***

Alexandra Vaccaro^{1,2,3}, Arnaud Tauffenberger^{1,2,3}, Dina Aggad^{1,2,3}, Guy Rouleau^{1,2,4}, Pierre Drapeau^{2,3}, and J. Alex Parker^{1,2,3*}

¹CRCHUM, ²Centre of Excellence in Neuromics, ³Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, ⁴Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Abstract

Mutations in the DNA/RNA binding proteins TDP-43 and FUS are associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal lobar degeneration. Intracellular accumulations of wild type TDP-43 and FUS are observed in a growing number of late-onset diseases suggesting that TDP-43 and FUS proteinopathies may contribute to multiple neurodegenerative diseases. To better understand the mechanisms of TDP-43 and FUS toxicity we have created transgenic *Caenorhabditis elegans* strains that express full-length, untagged human TDP-43 and FUS in the worm's GABAergic motor neurons. Transgenic worms expressing mutant TDP-43 and FUS display adult-onset, age-dependent loss of motility, progressive paralysis and neuronal degeneration that is distinct from wild type alleles. Additionally, mutant TDP-43 and FUS proteins are highly insoluble while wild type proteins remain soluble suggesting that protein misfolding may contribute to toxicity. Populations of mutant TDP-43 and FUS transgenics grown on solid media become paralyzed over 7 to 12 days. We have developed a liquid culture assay where the paralysis phenotype evolves over several hours. We introduce *C. elegans* transgenics for mutant TDP-43 and FUS motor neuron toxicity that may be used for rapid genetic and pharmacological suppressor screening.

Introduction

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a late-onset progressive disease affecting motor neurons ultimately causing fatal paralysis [1,2]. Most cases are sporadic, but ~10% of patients have an inherited familial form of the disease. Dominant mutations in SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase 1) account for ~20% of familial ALS cases and ~1% of sporadic cases [1]. The recent discovery of mutations in TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43) and Fused in sarcoma (FUS, also named TLS) in both familial ALS and frontotemporal dementia (FTD) has shifted research into disease mechanisms and potential therapeutics [3-9].

TDP-43 and FUS are evolutionarily conserved DNA/RNA binding proteins that shuttle between the nucleus and cytoplasm having multiple roles including DNA transcription and RNA processing [3,9-12]. Mutant TDP-43 and FUS (mTDP-43 and mFUS) are found in cytoplasmic inclusions in the disease state while the accumulation of wild type TDP-43 and FUS (wtTDP-43 and wtFUS) are observed in an increasing number of disorders including Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and the polyglutamine diseases (reviewed in [10]). The pathogenic mechanisms for mutant TDP-43 and FUS age-dependent neuronal toxicity remain unclear. As of now there is no consensus whether mutant TDP-43 and FUS employ a loss-of-function, a gain-of-function, or both in motor neuron cell death.

Since TDP-43 and FUS are evolutionarily conserved we used the nematode *Caenorhabditis elegans* to investigate mutant TDP-43 and FUS age-dependent neurodegeneration. We created transgenic nematodes that express full-length wild type or mutant TDP-43 and FUS in the worm's GABAergic motor neurons. Transgenic TDP-

43 and FUS worms recapitulate a salient feature of ALS; they display adult-onset, age-dependent, progressive paralysis and degeneration of motor neurons. Importantly, mTDP-43 and mFUS, but not wtTDP-43 and wtFUS, strains show the presence of insoluble proteins in extracts from whole animals suggesting that protein misfolding may be a primary cause of toxicity. We introduce a genetically tractable platform to investigate motor neuron toxicity caused by mutant TDP-43 and FUS that can be used for suppressor screening.

Results

Transgenic worms expressing full-length human TDP-43 or FUS in motor neurons display age-dependent paralysis

Since ALS is a motor neuron disease we expressed wild type and mutant human TDP-43 and FUS proteins in the worm's 26 GABAergic motor neurons with the vesicular GABA transporter (*unc-47*) promoter (Figures 1A, B) [13]. Multiple transgenic strains carrying extrachromosomal arrays were obtained by microinjection and stable lines with chromosomally-integrated transgenes were isolated after UV-irradiation [14]. Both wild type TDP-43 and the ALS-associated A315T mutant proteins were expressed in transgenic worms as detected by immunoblotting of worm protein extracts with a human specific TDP-43 antibody (Figure 2A) [4]. Similarly, using a FUS antibody we confirmed the expression of wild type and the ALS-linked S57 Δ mutant proteins by western blotting (Figure 2B) [15].

All strains were morphologically normal and showed no adverse phenotypes during development. However, during adulthood the transgenic strains begin to display uncoordinated motility phenotypes that progressed to paralysis. Paralysis was age-dependent and occurred at higher rate for mTDP-43 and mFUS worms compared to wtTDP-43 and wtFUS transgenics (Figures 3 A, B). Typically, after 12-13 days on plates 100% of the mTDP-43 and mFUS worms were paralysed while only 20% of the wtTDP-43 and wtFUS worms were affected. The low rate of paralysis for wtTDP-43 and wtFUS strains is comparable to what is observed in transgenics expressing GFP from the same *unc-47* promoter (Figure 3C). Additionally, the paralysis assay is widely used to study age-dependent degenerative phenotypes and is not observed in wild type

non-transgenic worms until they reach advanced age (approximately 20 days) [16-18]. Finally, motility defects and adult onset paralysis have been previously observed in worms with degenerating GABAergic motor neurons suggesting that mTDP-43 and mFUS may negatively affect GABAergic neuronal function and survival [19].

TDP-43 and FUS transgenics have normal lifespans

One of the signs of aging in worms is decreased motility [18,20]. Thus the progressive paralysis phenotypes observed in the TDP-43 and FUS transgenics may be due to overall decreased health from the expression of toxic non-native proteins leading to accelerated mortality, a part of which is a decline in motility. We conducted lifespan analyses and observed that all of the transgenics had lifespans indistinguishable from non-transgenic wild type N2 worms (Figures 4A, B and Table S1). These observations suggest that the paralysis observed in our models is specific to the expression of TDP-43 and FUS in motor neurons and not due to secondary effects from general sickness and reduced lifespan.

TDP-43 and FUS cause neuronal dysfunction

The progressive paralysis phenotypes caused by mTDP-43 and mFUS suggest there may be motor neuron dysfunction and/or degeneration in these animals. *C. elegans* body wall muscle cells receive excitatory (acetylcholine) and inhibitory (GABA) inputs to coordinate muscle contraction/relaxation and facilitate movement [21,22]. Body wall muscle activity can be measured indirectly with the acetylcholinesterase inhibitor aldicarb [23]. Exposure to aldicarb causes accumulation of acetylcholine at

neuromuscular junctions resulting in hyperactive cholinergic synapses, muscle hypercontraction, and acute paralysis [23]. Hypersensitivity to aldicarb-induced paralysis has been used to identify genes that increase acetylcholine secretion or decrease inhibitory GABA signalling [24]. For example mutants lacking genes required for GABA transmission like the vesicular GABA transporter *unc-47* are hypersensitive to aldicarb-induced paralysis [25]. To investigate if our TDP-43 and FUS transgenics had abnormal activity at the neuromuscular junction we exposed the animals to aldicarb. We observed that, like *unc-47* mutants, mTDP-43 and mFUS animals were hypersensitive to aldicarb-induced paralysis, while wtTDP-43 and wtFUS transgenics showed a rate paralysis identical to non-transgenic N2 worms (Figures 5A, B). These data suggest that the inhibitory GABA signalling is impaired in mTDP-43 and mFUS transgenics. *unc-47* mutants are classically described as having a “shrinker” phenotype, where in response to touch the worm does not move away but instead the whole body undergoes longitudinal shortening [21], and we observed that the shrinker phenotype was weakly penetrant in adult mTDP-43 and mFUS worms. To determine if impaired GABAergic neurotransmission contributed to the paralysis phenotype we examined two *unc-47* loss-of-function mutants and they both showed age-dependent paralysis, a phenotype not previously reported for *unc-47* (Figure 5C) [21]. Thus, mTDP-43 and mFUS cause neuronal dysfunction in GABA neurons leading to progressive motility defects culminating in paralysis, a phenotype similar to animals deficient in GABAergic signalling.

TDP-43 and FUS cause progressive degeneration of motor neurons

Many neurodegenerative diseases are characterized by neuronal dysfunction prior to degeneration [26]. To investigate if the progressive paralysis phenotypes in our TDP-43 and FUS transgenics were accompanied by neurodegeneration we crossed all of the transgenics with an integrated reporter (*unc-47p::GFP*) that expresses GFP in the same GABAergic motor neurons [13] (Figures 6A, B). Similar to reports from another *C. elegans* TDP-43 toxicity model [27], we observed gaps/breaks in motor neuron processes in TDP-43 and FUS animals compared to animals expressing *unc-47p::GFP* alone (Figures 6 C-F). We extended our analysis by scoring degeneration in living GFP, wtTDP-43, mTDP-43, wtFUS and mFUS transgenics at days 1, 5 and 9 of adulthood. We observed that degeneration was age-dependent and occurred at higher rate for the mTDP-43 and mFUS animals compared to the wtTDP-43 and wtFUS transgenics (Figure 6G). Thus our TDP-43 and FUS transgenics mimic the adult-onset, gradual decline of neuronal function ultimately resulting in age-dependent motor neuron degeneration seen in diseases like ALS.

Mutant TDP-43 and FUS are highly insoluble

Since TDP-43 and FUS are prone to aggregation in several model systems including *C. elegans*, we tested if the same was true for our transgenics [27-33]. To examine if protein misfolding is more pronounced for strains expressing mTDP-43 and mFUS, we used a biochemical assay to detect protein aggregation. Here homogenized protein extracts from transgenic worms were separated into supernatant (detergent-soluble) and pellet (detergent-insoluble) fractions [30]. Immunoblotting the TDP-43

transgenics with a human TDP-43 antibody revealed the accumulation of mTDP-43 in the pelleted, insoluble fraction, while wtTDP-43 proteins were predominantly detected in the supernatant, or soluble fractions (Figure 7A). Similar results were obtained for the FUS transgenics where immunoblotting with a human FUS antibody showed that mFUS accumulated in the insoluble pellet fraction while wtFUS proteins remained soluble (Figure 7B). These data suggest that mTDP-43 and mFUS proteins are susceptible to misfolding leading to insolubility and aggregation that may contribute to motor neuron dysfunction and degeneration.

Next focusing on the mTDP-43 and mFUS transgenics we fixed whole *unc-47p::GFP;mTDP-43* and *unc-47p::GFP;mFUS* worms and respectively stained them with human TDP-43 and human FUS antibodies. We detected mTDP-43 and mFUS in both the nuclei and cytoplasm of motor neurons (Figure 8). The cytoplasmic accumulation of mTDP-43 and mFUS in our transgenics is consistent with findings in patients suggesting that these proteins misfold leading to intracellular build-up and aggregation.

Finally, we noticed that the fixed mTDP-43 and mFUS showed gaps or breaks along the GFP labelled neuronal processes similar to what was observed in living animals (Figures 6D, F). To confirm that neurodegeneration was not simply due to loss of GFP signals, we stained whole *unc-47p::GFP;mTDP-43* and *unc-47p::GFP;mFUS* worms for GABA [22]. We observed that the gaps along the processes as visualized by a loss of GFP signal likewise corresponded to a loss of GABA staining (Figure 9). Altogether these data suggest that the expression of TDP-43 and FUS lead to degeneration of motor neurons as has been observed for TDP-43 in other worm models [27].

Paralysis phenotypes are enhanced in liquid culture

One goal in developing these transgenics is for use in genetic and pharmacological suppressor screens. TDP-43 and FUS transgenics may have decreased inhibitory GABA signalling ultimately causing muscle hypercontraction leading to paralysis. When grown on solid media the mTDP-43 and mFUS paralysis phenotypes manifest over a period of 5 to 13 days (Figure 2). Worms grown in liquid culture exhibit a stereotypical swimming motion that is considerably more vigorous than worms crawling on solid media [34]. We hypothesized that placing worms in liquid culture would increase activity at the neuromuscular junction and precipitate paralysis phenotypes much earlier than worms grown on solid media.

Using age-synchronized worms we transferred young adult TDP-43 and FUS transgenics to 96-well plates with liquid media and scored their motility every 2 hours. We observed a rapid onset of paralysis for the mTDP-43 and mFUS lines with approximately 80% of the population becoming immobile after 6 hours progressing to 100% paralysis after 12 hours (Figure 10A, B Videos S1-S4). wtTDP-43 and wtFUS animals also showed increased paralysis but at a much lower rate, with approximately 20% of the animals immobile after 6 hours moving to 80% paralysis after 12 hours (Figure 10, Videos S5-S8). Non-transgenic N2 animals showed a very low rate of paralysis of approximately 15% after 12 hours (Figure 10C, Videos S9-S10). In comparison, approximately 50% of transgenic *unc-47p::GFP* control animals were paralysed after 12 hours, a rate intermediate between non-transgenic N2 worms and transgenic wtTDP-43 and wtFUS animals (Figure 10C, Videos S11-S12). The difference between wild type and mutant transgenic lines is easy to distinguish, particularly at 6

hours, and suggests that this phenotype may be used for rapid genetic and chemical screening.

Discussion

Here we introduce a novel *C. elegans* platform for investigating mechanisms of motor neuron toxicity caused by mTDP-43 and mFUS. To more closely model human disease we chose to express full-length human TDP-43 and FUS without additional tags since the inclusion of tags like GFP can mask or enhance the phenotypes of wild type and mutant proteins [35,36]. Additionally, we reasoned that restricting expression to a smaller set of neurons might produce phenotypes less severe, or later, than observed in other *C. elegans* models [27,29,30,33]. Since ALS is characterized by degeneration of the motor neurons we engineered strains expressing human TDP-43 and FUS in the animal's 26 GABAergic neurons [13,22]. Additionally, ALS patients show cortical hyperexcitability that may be due to reduced inhibitory signalling from the GABAergic system [37,38]. We believe our transgenic mTDP-43 and mFUS worms recapitulate this pathophysiological mechanism; they show decreased GABA staining and are hypersensitive to the acetylcholinesterase inhibitor aldicarb, suggesting a reduction of inhibitory GABA input at neuromuscular junctions [24,25]. In our models sensitivity to aldicarb can be detected in day 1 adult worms, while paralysis and motor neuron degeneration can first be detected starting at day 5 of adulthood demonstrating that similar to ALS, neuronal dysfunction occurs prior to neurodegeneration [39].

Importantly, our transgenic TDP-43 and FUS animals only begin to show motility defects once they have reached adulthood a feature absent from other models [27,29,30,33]. Thus our models mirror a prominent clinical feature of ALS, they display adult-onset, age-dependent, progressive paralysis [40,41]. Additionally, unlike previously described TDP-43 and FUS models based on pan-neuronal expression

[27,30,33] our transgenics do not show reduced lifespan suggesting the behavioural phenotypes observed in our transgenics are not influenced by general sickness. Our transgenics do share many features with other neuronal-based models, notably the aggregation and insolubility of mutant TDP-43 and FUS as well as degeneration of motor neurons suggesting there may be common mechanisms of toxicity amongst the models [27,29,30,32,33,42-45]. However, cytoplasmic aggregation of TDP-43 and FUS is a prominent feature of the human pathologies and this is seen in a recently described worm FUS model [33], but is absent from previously reported TDP-43 models [27,29,30]. We detect TDP-43 and FUS in both the nucleus and the cytoplasm of motor neurons from young adult (Day 1) transgenics. The preferential toxicity of mutant TDP-43 and FUS alleles along with their cytoplasmic accumulation suggests our models may recapitulate aspects of neurotoxicity relevant to the disease state.

With no clear mechanism for TDP-43 and FUS neuronal toxicity it is currently not possible to design *in vitro* assays for high-throughput drug screening. Thus the further development and characterization of *in vivo* models for neurodegeneration will guide studies in mammalian systems. We believe our models strike an optimal balance between strong, age-dependent phenotypes and the expression of mutant proteins in relatively few neurons, and may be useful for modifier screening. In terms of sensitivity, genetic mechanisms and/or small molecules need only to work on 26 neurons to achieve suppression. In terms of speed, our transgenics offer the possibility of medium-throughput suppressor screening based on the accelerated paralysis phenotype of mTDP-43 and mFUS worms grown in liquid culture. mTDP-43 and mFUS cause neuronal dysfunction in advance of motor neuron degeneration. The path from protein misfolding to neuronal dysfunction and cell death takes many decades in humans and it may be

more efficient to target therapies to early pathogenic stages. Thus using simple systems to screen for suppression of neuronal dysfunction may be useful to prevent subsequent neurodegeneration.

A number of models for TDP-43 and FUS toxicity in various systems have been described, but there is still no clear answer whether TDP-43 and FUS neuronal toxicity are due to a loss/gain of function of these proteins individually or together in some common genetic pathway [44-46]. Furthermore it is still unclear if all TDP-43 and FUS mutations share similar pathogenic mechanisms but having similarly constructed models for each may address this question. Now that we have validated the *unc-47* motor neuron approach for modelling toxicity, future work will focus on the development of new transgenics with additional TDP-43 and FUS mutations.

We present here novel transgenics for investigating age-dependent motor neuron toxicity caused by mutant TDP-43 and FUS. We expect these strains will be useful for identifying genetic and chemical suppressors to give insights into disease mechanisms and support the development of new therapies for age-dependent neurodegeneration.

Materials and Methods

Nematode strains

Standard methods of culturing and handling worms were used [47]. Worms were maintained on standard NGM plates streaked with OP50 *E. coli*. Strains used in this study were obtained from the *C. elegans* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis) and include: N2, *oxIs12[unc-47p::GFP + lin-15]*, *unc-47(e307)*, *unc-47(gk192)* and *unc-119(ed3)*.

Transgenic TDP-43 and FUS worms

Human cDNAs for wild type and mutant TDP-43[A315T], and wild type and mutant FUS-TLS[S57Δ] were obtained from Dr. Guy Rouleau (CRCHUM, Université de Montréal). The cDNAs were amplified by PCR and cloned into the Gateway vector pDONR221 following the manufacturer's protocol (Invitrogen). Multisite Gateway recombination was performed with the pDONR TDP-43 and FUS clones along with clones containing the *unc-47* promoter (kind gift from Dr. Erik Jorgensen, University of Utah), the *unc-54* 3'UTR plasmid pCM5.37 (Dr. Geraldine Seydoux, Johns Hopkins, Addgene plasmid 17253) and the destination vector pCFJ150 to create *unc-47::TDP-43* and *unc-47::FUS* expression vectors. Transgenic lines were created by microinjection of *unc-119(ed3)* worms, multiple lines were generated and strains behaving similarly were kept for further analysis. Transgenes were integrated by UV irradiation and lines were outcrossed to wild type N2 worms 5 times before use. The main strains used in this study include: *xqIs132[unc-47::TDP-43-WT;unc-119(+)]*, *xqIs133[unc-47::TDP-43[A315T];unc-119(+)]*, *xqIs173[unc-47::FUS-WT;unc-119(+)]*, and *xqIs98[unc-47::FUS[S57Δ];unc-119(+)]*.

Paralysis assays on plates

For worms expressing TDP-43 or FUS, 20-30 adult day 1 animals were picked to NGM plates and scored daily for movement. Animals were counted as paralyzed if they failed to move upon prodding with a worm pick. Worms were scored as dead if they failed to move their head after being prodded in the nose and showed no pharyngeal pumping. All experiments were conducted at 20°C.

Lifespan assays

Worms were grown on NGM-FUDR plates to prevent progeny from hatching. 20 animals/plate by triplicates were tested at 20°C from adult day 1 until death. Worms were declared dead if they did not respond to tactile or heat stimulus. Survival curves were produced and compared using the Log-rank (Mantel-Cox) test.

Aldicarb test

To evaluate synaptic transmission, worms were grown on NGM and transferred to NGM plates + 1mM aldicarb at adult day 1. Paralysis was scored after 1 and 2 hours on aldicarb plates. Animals were counted as paralyzed if they failed to move upon prodding with a worm pick. All tests were performed at 20°C.

Liquid culture protocol

Synchronized populations of worms were obtained by hypochlorite extraction. Young adult worms were distributed in 96-wells plate (20 μ l per well; 20-30 worms per well), containing bacteria and incubated for up to 6h at 20°C on a shaker. The motility test was assessed by stereomicroscopy. Videos of worms were taken with on an Olympus S7x7 stereomicroscope equipped with a Grasshopper GRAS-03K2M camera using Flycap software (Point Grey Research) at a rate of 300 frames per second.

Immunostaining of whole worms

Age synchronized, adult day 1, whole worms were fixed and stained as described in WormBook [48]. Antibodies used include: rabbit anti-TDP-43 (1:50, Proteintech), rabbit anti-FUS/TLS (1:50, AbCam), and rabbit anti-GABA (1:50, Proteintech).

Fluorescence microscopy

For scoring gaps/breaks from TDP-43 and FUS transgenics, synchronized animals were selected at days 1, 5 and 9 of adulthood for visualization of motor neurons *in vivo*. Animals were immobilized in M9 with 5 *mM* levamisole and mounted on slides with 2% agarose pads. Motor neurons were visualized with a Leica 6000 microscope and a Leica DFC 480 camera. A minimum of 100 animals was scored per treatment over 4-6 trials. The mean and SEM were calculated for each trial and two-tailed t-tests were used for statistical analysis.

Worm lysates

Worms were collected in M9 buffer, washed 3 times with M9 and pellets were placed at -80°C overnight. Pellets were lysed in RIPA buffer (150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate) + 0.1% protease inhibitors (10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml pepstatin A, 10 mg/ml chymostatin LPC;1/1000). Pellets were passed through a 27_{1/2} G syringe 10 times, sonicated and centrifuged at 16000g. Supernatants were collected.

Protein quantification

All supernatants were quantified with the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) following the manufacturer instructions.

Protein solubility

For TDP-43 and FUS transgenics soluble/insoluble fractions, worms were lysed in Extraction Buffer (1M Tris-HCl pH 8, 0.5M EDTA, 1M NaCl, 10% NP40 + protease inhibitors (LPC;1/1000)). Pellets were passed through a 27_{1/2} G syringe 10 times, sonicated and centrifuged at 100000g for 5 min. The soluble supernatant was saved and the remaining pellet was resuspended in extraction buffer, sonicated and centrifuged at 100000g for 5 min. The remaining pellet was resuspended into 100 μ l of RIPA buffer, sonicated until the pellet was resuspended in solution and saved.

Immunoblots

Worm RIPA samples (175 µg/well) were resuspended directly in 1x Laemmli sample buffer, migrated in 12.5% or 10% polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes (BioRad) and immunoblotted. Antibodies used: rabbit anti-human-TDP-43 (1:200, Proteintech), rabbit anti-human-FUS/TLS (1:200, AbCam), and mouse anti-actin (1:10000, MP Biomedical). Blots were visualized with peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). Densitometry was performed with Photoshop (Adobe).

Statistics

For paralysis and stress-resistance tests, survival curves were generated and compared using the Log-rank (Mantel-Cox) test, and 60-100 animals were tested per genotype and repeated at least three times. For image analysis statistical significance was determined by Student's t-test and the results shown as mean \pm standard error. Prism 5 (GraphPad Software) was used for all statistical analyses.

Acknowledgements

We thank S. Peyrard, E. Bourgeois and S. Al Ameri for technical support, and Dr. E. Jorgensen for the *unc-47* plasmid. JAP is a CIHR New Investigator. This research was supported by the CHUM Foundation, by the NSERC Discovery program to JAP, the CIHR, the FRSQ, the Frick Foundation for ALS Research, and the Bernice Ramsay Discovery Grant program from the ALS Society of Canada to JAP.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JAP. Performed the experiments: AV AT DA.

Analyzed the data: AV JAP. Contributed reagents/materials/analysis tools: GAR PD.

Wrote the paper: AV JAP.

References

1. Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52: 39-59.
2. Lomen-Hoerth C (2008) Amyotrophic lateral sclerosis from bench to bedside. *Semin Neurol* 28: 205-211.
3. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, et al. (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314: 130-133.
4. Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, Mayo K, Norton JB, et al. (2008) TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann Neurol*.
5. Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, et al. (2008) TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*.
6. Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, et al. (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319: 1668-1672.
7. Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, et al. (2009) Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323: 1208-1211.
8. Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, et al. (2011) Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*.
9. Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M (2010) TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 9: 995-1007.
10. Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW (2010) TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 19: R46-64.
11. Kim SH, Shanware NP, Bowler MJ, Tibbetts RS (2010) Amyotrophic lateral sclerosis-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to co-regulate HDAC6 mRNA. *J Biol Chem* 285: 34097-34105.
12. Ling SC, Albuquerque CP, Han JS, Lagier-Tourenne C, Tokunaga S, et al. (2010) ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13318-13323.
13. McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389: 870-876.
14. Evans TC (2006) Transformation and microinjection. *WormBook*: 1-15.
15. Belzil VV, Valdmanis PN, Dion PA, Daoud H, Kabashi E, et al. (2009) Mutations in FUS cause FALS and SALS in French and French Canadian populations. *Neurology* 73: 1176-1179.
16. Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW, Dillin A (2006) Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* 313: 1604-1610.
17. Steinkraus KA, Smith ED, Davis C, Carr D, Pendergrass WR, et al. (2008) Dietary restriction suppresses proteotoxicity and enhances longevity by an hsf-1-dependent mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 7: 394-404.

18. Collins JJ, Huang C, Hughes S, Kornfeld K (2008) The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*: 1-21.
19. Earls LR, Hacker ML, Watson JD, Miller DM, 3rd (2010) Coenzyme Q protects *Caenorhabditis elegans* GABA neurons from calcium-dependent degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14460-14465.
20. Herndon LA, Schmeissner PJ, Dudaronek JM, Brown PA, Listner KM, et al. (2002) Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature* 419: 808-814.
21. Jorgensen EM (2005) Gaba. *WormBook*: 1-13.
22. McIntire SL, Jorgensen E, Kaplan J, Horvitz HR (1993) The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 364: 337-341.
23. Mahoney TR, Luo S, Nonet ML (2006) Analysis of synaptic transmission in *Caenorhabditis elegans* using an aldicarb-sensitivity assay. *Nat Protoc* 1: 1772-1777.
24. Loria PM, Hodgkin J, Hobert O (2004) A conserved postsynaptic transmembrane protein affecting neuromuscular signaling in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 24: 2191-2201.
25. Vashlishan AB, Madison JM, Dybbs M, Bai J, Sieburth D, et al. (2008) An RNAi screen identifies genes that regulate GABA synapses. *Neuron* 58: 346-361.
26. Saxena S, Caroni P (2011) Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron* 71: 35-48.
27. Liachko NF, Guthrie CR, Kraemer BC (2010) Phosphorylation Promotes Neurotoxicity in a *Caenorhabditis elegans* Model of TDP-43 Proteinopathy. *J Neurosci* 30: 16208-16219.
28. Johnson BS, McCaffery JM, Lindquist S, Gitler AD (2008) A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
29. Ash PE, Zhang YJ, Roberts CM, Saldi T, Hutter H, et al. (2010) Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in *C. elegans*. *Hum Mol Genet*.
30. Zhang T, Mullane PC, Periz G, Wang J (2011) TDP-43 neurotoxicity and protein aggregation modulated by heat shock factor and insulin/IGF-1 signaling. *Hum Mol Genet*.
31. Swarup V, Phaneuf D, Bareil C, Robertson J, Rouleau GA, et al. (2011) Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain*.
32. Li Y, Ray P, Rao EJ, Shi C, Guo W, et al. (2010) A *Drosophila* model for TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3169-3174.
33. Murakami T, Yang SP, Xie L, Kawano T, Fu D, et al. (2011) ALS mutations in FUS causes neuronal dysfunction and death in *C. elegans* by a dominant gain-of-function mechanism. *Hum Mol Genet*.
34. McDonald PW, Hardie SL, Jessen TN, Carvelli L, Matthies DS, et al. (2007) Vigorous motor activity in *Caenorhabditis elegans* requires efficient clearance of dopamine mediated by synaptic localization of the dopamine transporter DAT-1. *J Neurosci* 27: 14216-14227.
35. Catoire H, Pasco MY, Abu-Baker A, Holbert S, Tourette C, et al. (2008) Sirtuin Inhibition Protects from the Polyalanine Muscular Dystrophy Protein PABPN1. *Hum Mol Genet*.

36. Wang J, Farr GW, Hall DH, Li F, Furtak K, et al. (2009) An ALS-linked mutant SOD1 produces a locomotor defect associated with aggregation and synaptic dysfunction when expressed in neurons of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 5: e1000350.
37. Caramia MD, Palmieri MG, Desiato MT, Iani C, Scalise A, et al. (2000) Pharmacologic reversal of cortical hyperexcitability in patients with ALS. *Neurology* 54: 58-64.
38. Vucic S, Nicholson GA, Kiernan MC (2008) Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131: 1540-1550.
39. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, et al. (2011) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377: 942-955.
40. Pasinelli P, Brown RH (2006) Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 7: 710-723.
41. Dion PA, Daoud H, Rouleau GA (2009) Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms. *Nat Rev Genet* 10: 769-782.
42. Ju S, Tardiff DF, Han H, Divya K, Zhong Q, et al. (2011) A yeast model of FUS/TLS-dependent cytotoxicity. *PLoS Biol* 9: e1001052.
43. Lanson NA, Jr., Maltare A, King H, Smith R, Kim JH, et al. (2011) A *Drosophila* model of FUS-related neurodegeneration reveals genetic interaction between FUS and TDP-43. *Hum Mol Genet* 20: 2510-2523.
44. Kabashi E, Bercier V, Lissouba A, Liao M, Brustein E, et al. (2011) FUS and TARDBP but not SOD1 interact in genetic models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. . *PLoS Genet* in press.
45. Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, Dion PA, Bercier V, et al. (2009) Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Hum Mol Genet* 19: 671-683.
46. Wang JW, Brent JR, Tomlinson A, Shneider NA, McCabe BD (2011) The ALS-associated proteins FUS and TDP-43 function together to affect *Drosophila* locomotion and life span. *J Clin Invest*.
47. Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*: 1-11.
48. Duerr JS (2006) Immunohistochemistry. *WormBook*: 1-61.

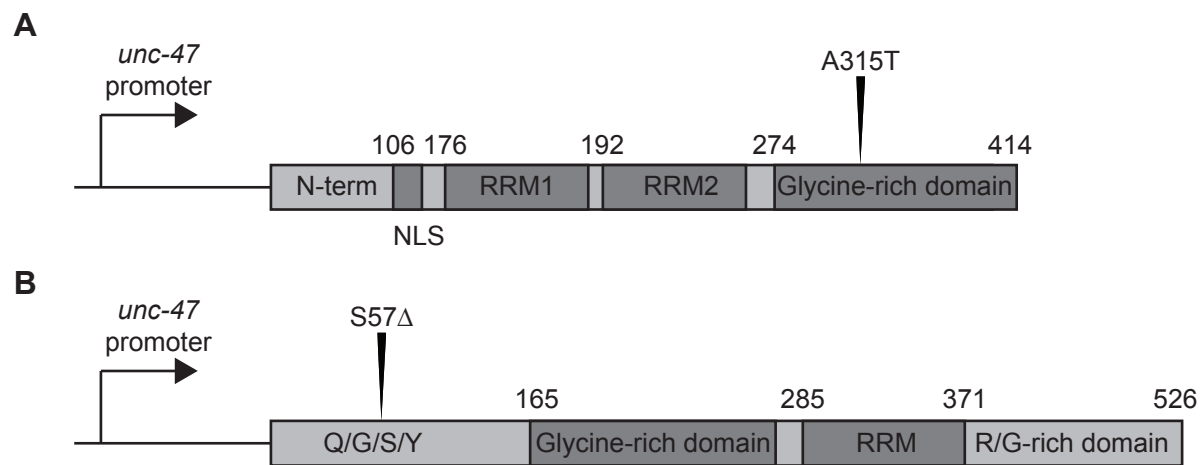


Figure 1

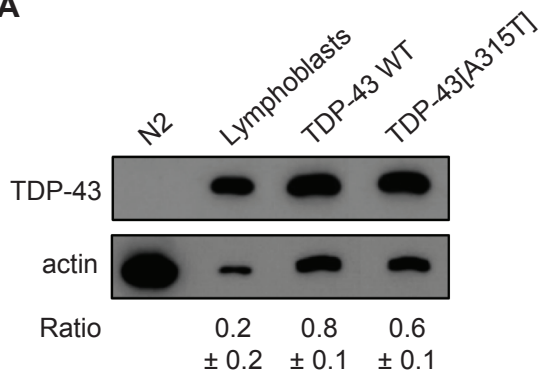
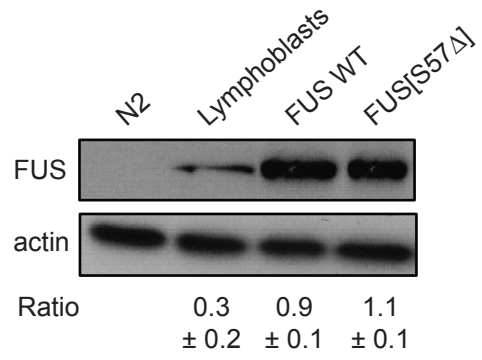
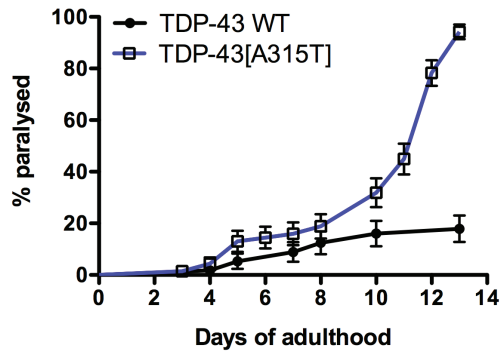
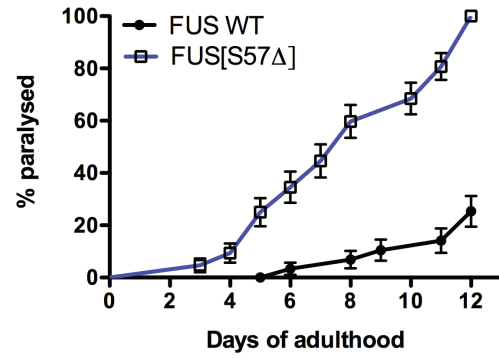
A**B**

Figure 2

A



B



C

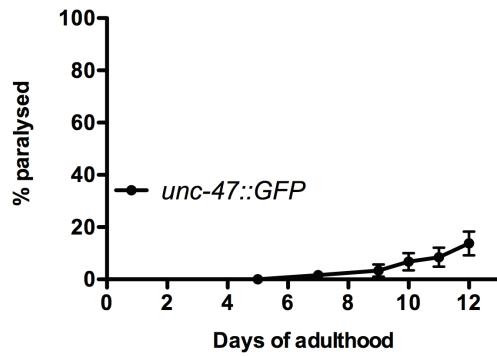


Figure 3

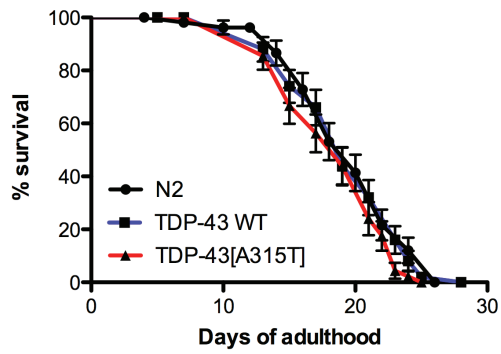
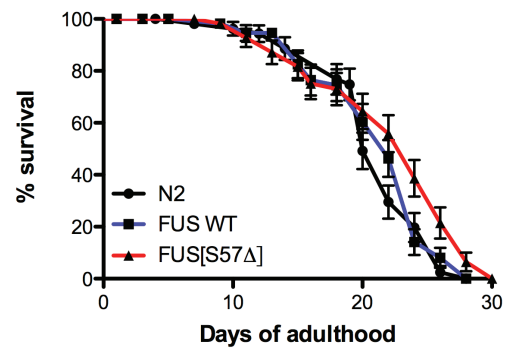
A**B**

Figure 4

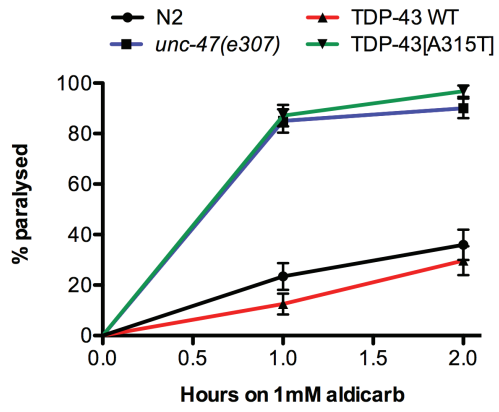
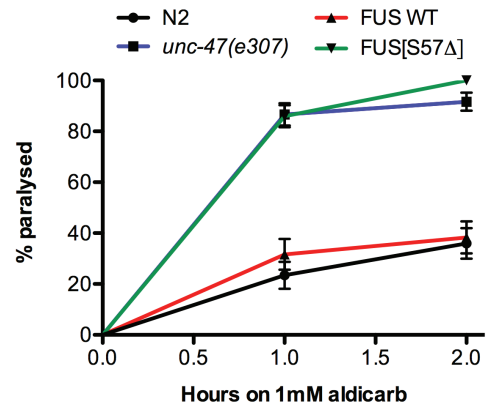
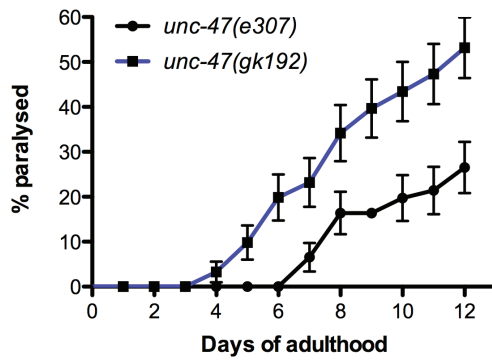
A**B****C**

Figure 5

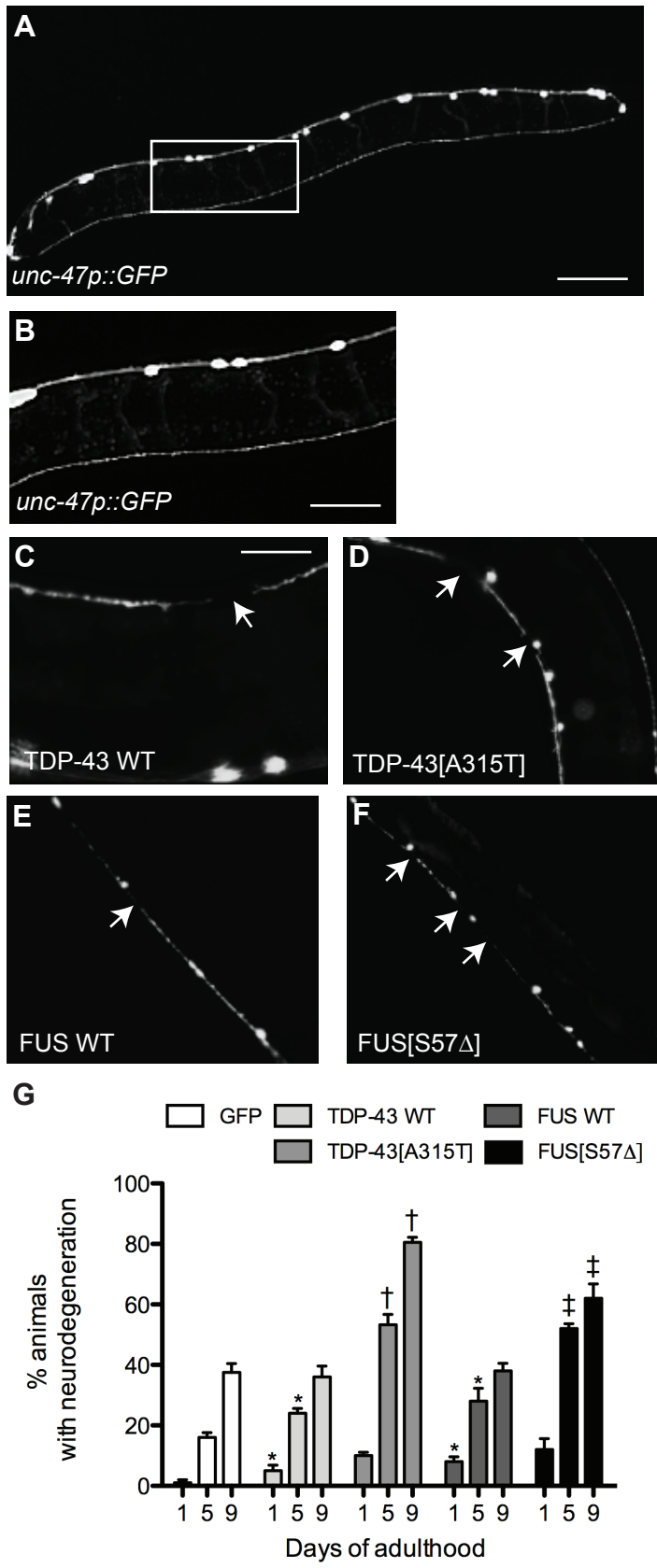
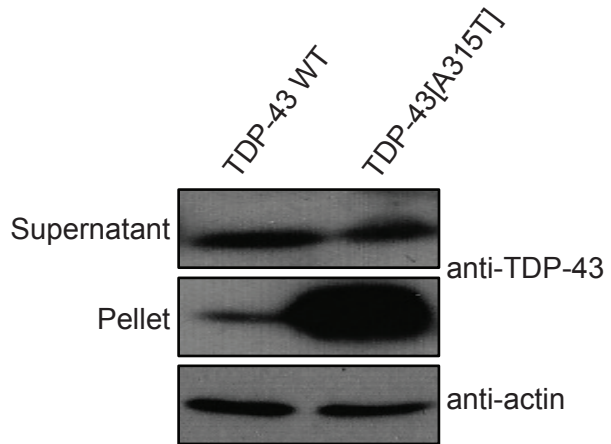


Figure 6

A



B

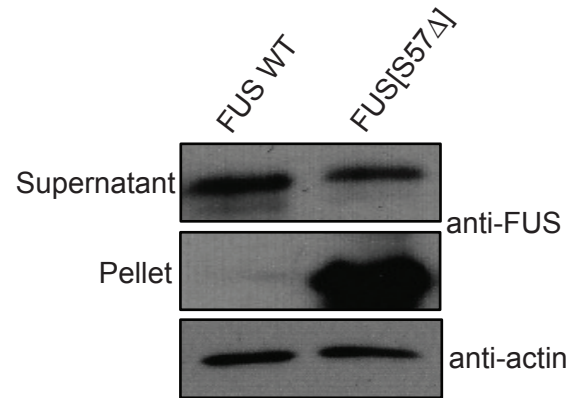


Figure 7

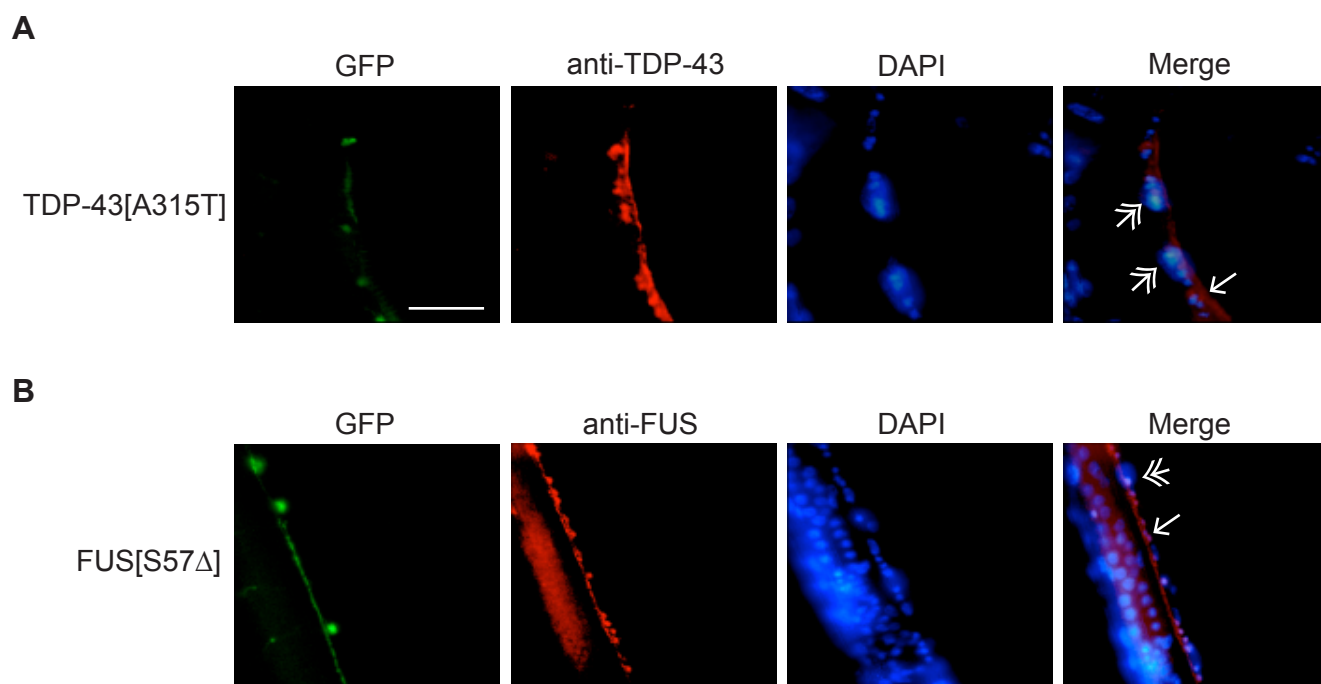


Figure 8

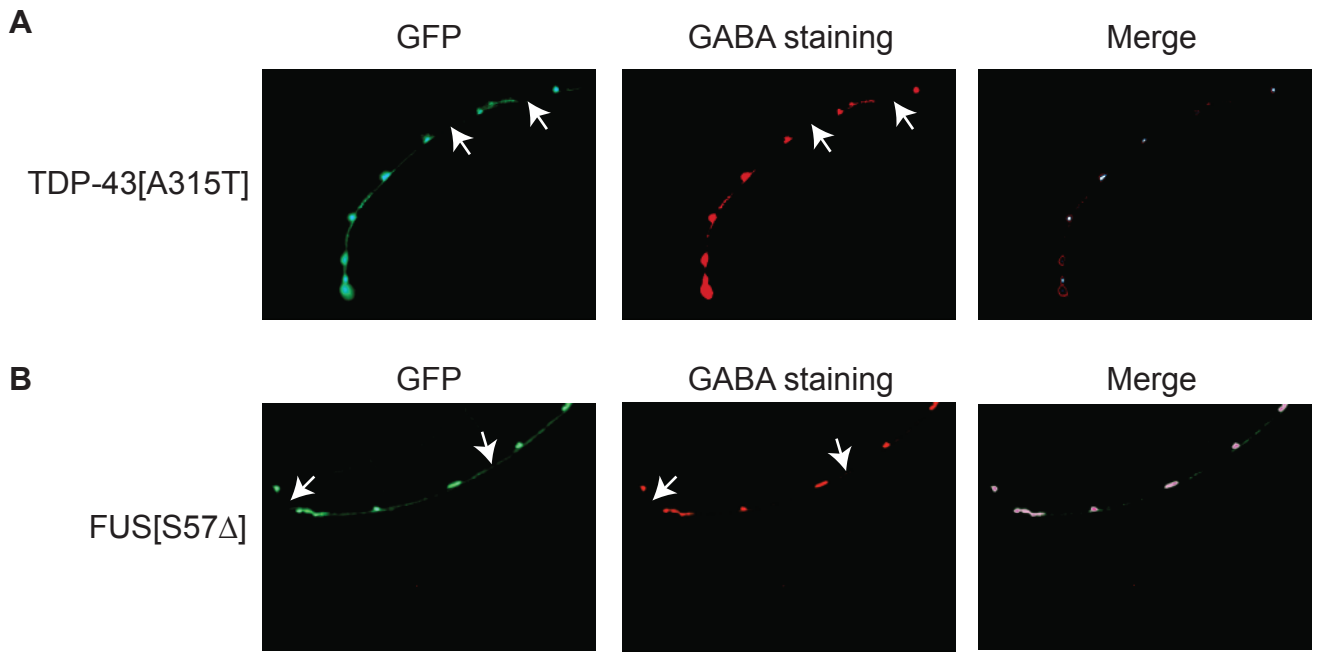


Figure 9

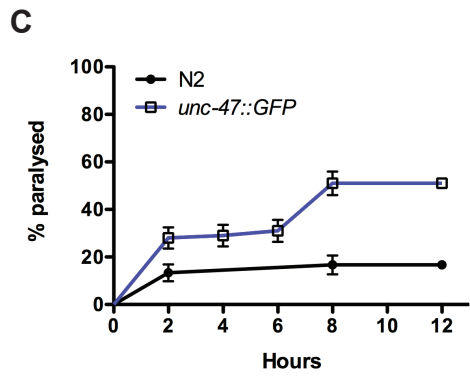
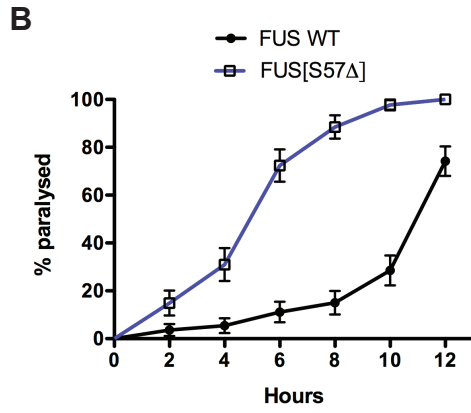
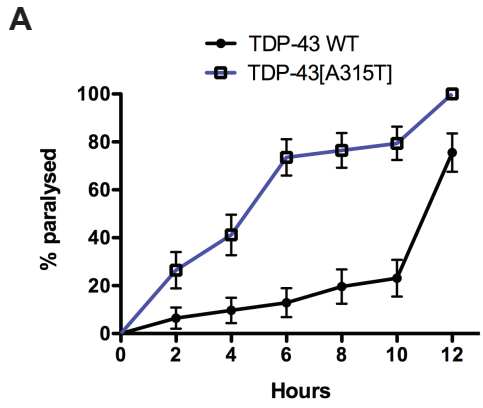


Figure 10

Figure Legends

Figure 1. TDP-43 and FUS transgene constructs.

(A) Full-length wild type human TDP-43 and the clinical mutation A315T were cloned into a vector for expression in motor neurons by the *unc-47* promoter and injected into *C. elegans*.

(B) Full-length wild type human FUS and the clinical mutation S57 Δ were cloned into the *unc-47* expression vector and injected into *C. elegans*. RRM (RNA Recognition Motif), Q/G/S/Y (Glutamine-Glycine-Serine-Tyrosine-rich region), R/G (Arginine-Glycine-rich region), NLS (Nuclear localization signal).

Figure 2. Expression of human TDP-43 and FUS proteins in *C. elegans* transgenics.

(A) Total protein levels from non-transgenic worms, human lymphoblast cells and transgenic worms expressing wtTDP-43 or mTDP-43. Staining with a human TDP-43 antibody showed no signal for non-transgenic worms but a signal corresponding to full-length human TDP-43 at ~45 kDa in size was observed in extracts from human cells and the two transgenic TDP-43 worm strains. wtTDP-43 and mTDP-43 strains showed comparable protein expression levels.

(B) Total protein levels from non-transgenic worms, human lymphoblast cells and transgenic worms expressing wtFUS or mFUS. Using a human FUS antibody, no signal was detected in non-transgenic worms, but a signal corresponding to full-length human FUS at ~75 kDa in size was observed in extracts from lymphoblast cells and the transgenic FUS worm strains. wtFUS and mFUS worms showed identical levels of protein expression. For all experiments actin staining was used as a loading control and

expression ratios \pm SEM of TDP-43 or FUS to actin was determined from 3 independent experiments. Representative western blots are shown.

Figure 3. Mutant TDP-43 and FUS cause adult-onset, age-dependent paralysis in *C. elegans*.

Transgenics were monitored from the adult stage and scored daily for paralysis.

(A) mTDP-43 worms show a rate of progressive paralysis that is greater than transgenics expressing wtTDP-43 ($P < 0.001$).

(B) Transgenics expressing mFUS become paralysed significantly sooner than wtFUS control transgenics ($P < 0.001$).

(C) Transgenic worms expressing GFP in motor neurons show low levels of paralysis.

Figure 4. TDP-43 and FUS transgenes do not affect lifespan.

Beginning at Day 1 of adulthood we tested the lifespans of wild type non-transgenic N2 worms and transgenics expressing (A) wtTDP-43 and mTDP-43 as well as (B) animals expressing wtFUS and mFUS. Animals expressing TDP-43 or FUS transgenes had lifespans indistinguishable from N2 worms.

Figure 5. Mutant TDP-43 and FUS impair synaptic transmission.

(A) Cholinergic neuronal transmission was measured by determining the onset of paralysis induced by the cholinesterase inhibitor aldicarb. *unc-47(e307)* mutants and mTDP-43 transgenics were hypersensitive to aldicarb-induced paralysis compared to either wtTDP-43 transgenics or N2 worms ($P < 0.001$ for *unc-47* or mTDP-43 compared to N2 or wtTDP-43 worms). (B) mFUS transgenics and *unc-47(e307)* mutants were

more sensitive to aldicarb induced paralysis compared to either wtFUS transgenics or N2 controls ($P < 0.001$).

(C) *unc-47* mutants grown on regular worm plates showed age-dependent progressive paralysis.

Figure 6. Mutant TDP-43 causes motor neuron degeneration.

Shown are representative photos of living, adult *unc-47p::GFP*, *unc-47p::GFP;TDP-43*, and *unc-47p::GFP;FUS* transgenics.

(A) Image of an entire *unc-47p::GFP* worm showing the GABAergic motor neurons.

(B) High-magnification of the framed area from (A) showing wild type morphology of motor neurons.

High magnification of motor neurons labelled with *unc-47p::GFP* in (C) wtTDP-43, (D) mTDP-43, (E) wtFUS and (F) mFUS transgenics showing gaps along neuronal processes (arrows).

(G) Quantification of neurodegeneration in transgenic worms at days 1, 5 and 9 of adulthood. * wtTDP-43 and wtFUS have a higher rate of neurodegeneration compared to *unc-47p::GFP* controls ($P < 0.001$). †mTDP-43 transgenics have a higher rate of neurodegeneration at days 5 and 9 compared to wtTDP-43 transgenics ($P < 0.001$). ‡mFUS transgenics show an enhanced rate of neurodegeneration at days 5 and 9 of adulthood in compared to wtFUS transgenics ($P < 0.001$).

Figure 7. Mutant TDP-43 and FUS are highly insoluble.

Shown are representative images from western blotting of the soluble supernatant and insoluble pellet fractions of protein extracts from transgenic TDP-43 and FUS strains.

(A) Blotting against TDP-43 shows that a large proportion of the TDP-43 signal resides in the insoluble fraction for mTDP-43 worms, while the signal is largely soluble for the wtTDP-43 samples.

(B) Immunoblotting with a human FUS antibody revealed that mFUS proteins primarily resided in the insoluble fractions while wtFUS proteins were exclusively soluble. Immunoblotting for actin was used as the loading control.

Figure 8. Mutant TDP-43 and FUS aggregate in vivo.

(A) Representative image of a fixed *unc-47p::GFP;mTDP-43* worm stained with a human TDP-43 antibody. The green channel shows GFP labelled motor neurons. Antibody staining (red signal) revealed aggregation of TDP-43 signals in motor neurons. Staining of motor neuron nuclei with DAPI (blue signal) revealed that TDP-43 is both cytoplasmic (single arrowhead) and nuclear (double arrowhead).

(B) Staining of *unc-47p::GFP;mFUS* worms with a human FUS antibody (red signal) and DAPI (blue signal) revealed cytoplasmic (single arrowhead) and nuclear (double arrowhead) accumulations in motor neurons.

Figure 9. Decreased GABA staining in mutant TDP-43 and FUS worms.

(A) Fluorescent micrograph of a fixed *unc-47p::GFP;mTDP-43* worm stained with a GABA antibody revealed neurodegeneration in motor neurons that mirrors the loss of GFP signals.

(B) Staining of *unc-47p::GFP;mFUS* worms also showed loss of GABA signals similar to the loss of GFP in the motor neurons.

Figure 10. Accelerated paralysis phenotypes for TDP-43 and FUS transgenics in liquid culture.

(A) Paralysis phenotypes resolve over a number of hours for wtTDP-43 and mTDP-43 worms grown in liquid culture. mTDP-43 worms have a faster rate of paralysis compared to wtTDP-43 transgenics ($P < 0.001$).

(B) Transgenic mFUS worms show motility defects and become paralysed at a rate faster than wtFUS controls ($P < 0.001$).

(C) *unc-47p::GFP* transgenics have an increased rate of paralysis compared to non-transgenic N2 worms ($P < 0.001$).