

Université de Montréal

**Génération de lignées de poissons zébrés exprimant le
gène muté *TARDBP***

par

Alexandra Lissouba

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
en pathologie et biologie cellulaire
option système nerveux

Décembre, 2011

© Alexandra Lissouba, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Génération de lignées de poissons zébrés exprimant le gène muté *TARDBP*

Présenté par :
Alexandra Lissouba

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Louis Saint-Amant, président-rapporteur

Pierre Drapeau, directeur de recherche

Gilles Hickson, membre du jury

Résumé

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative due à une dégénérescence des motoneurones. Plus de 40 mutations du gène *TARDBP* ont été identifiées chez des patients SLA. Les défauts biochimiques de ces mutations étant encore inconnus, les modèles animaux sont présentement la seule mesure possible d'un phénotype. Pour étudier les conséquences physiopathologiques d'une de ces mutations, nous avons développé deux lignées transgéniques de poisson zébré, exprimant le gène humain *TARDBP* soit de type sauvage, soit avec la mutation G348C liée à la SLA, sous le contrôle d'un promoteur de choc thermique. Ces lignées ont été étudiées sur trois générations, après avoir établi un protocole de choc thermique induisant une expression ubiquitaire du transgène. Les embryons transgéniques de la génération F2 de la lignée exprimant la mutation développent un phénotype moteur suite à un choc thermique de 38.5°C pendant 30 minutes lorsque les embryons sont à 18 heures post-fertilisation. 60% des embryons ont une réponse anormale au toucher. De plus, une réduction de 28% de la longueur de pré-branchement des axones des motoneurones est observée. Ces résultats indiquent que notre lignée exprimant la protéine mutante TDP-43 est un modèle génétique de la SLA prometteur, qui ouvre des perspectives pour la compréhension de la physiopathologie de la maladie et la découverte de molécules thérapeutiques.

Mots-clés : Sclérose latérale amyotrophique, SLA, *TARDBP*, TDP-43, Poisson zébré, motoneurone

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease due to motoneurons degeneration. More than 40 mutations of the gene *TARDBP*, coding for the protein TDP-43 have been found in ALS patients. As the biochemical defects of these mutations are not known, *in vivo* models are currently the only windows onto the pathology. To study the pathophysiological consequences of one of these mutations, we have generated two stable zebrafish transgenic lines, expressing the human gene *TARDBP*, either the wild-type version, or the G348C mutated version linked to ALS, under the control of a heat shock promotor. These lines were studied for three generation, after establishing a heat shock protocol sufficient to induce a ubiquitous expression of the transgene. The transgenic embryos of the F2 generation of the line expressing the mutant protein develop a motor phenotype after a 38.5°C heat shock for 30 minutes when the embryos are 18 hours post-fertilization. 60% of these embryos have an abnormal touch escaped evoked response, and a 28% reduction of the pre-branching axonal length of the motoneurons axons. These results indicate that our line expressing the mutant TDP-43 protein is a promising genetic model of ALS, opening perspectives for the pathophysiological understanding of the disease, and the discovery of new therapeutics.

Keywords : Amyotrophic lateral sclerosis, ALS, TARDBP, TDP-43, Zebrafish, Motoneuron

Table des matières

| | |
|--|----|
| 1. Introduction..... | 1 |
| 1.1 Sclérose latérale amyotrophique..... | 2 |
| 1.1.1. Définition..... | 2 |
| 1.1.2 Historique..... | 2 |
| 1.1.3 Épidémiologie..... | 3 |
| 1.1.4 Histoire naturelle de la maladie et traitements..... | 4 |
| 1.1.5 Étiologie..... | 5 |
| 1.2 <i>TARDBP</i> | 8 |
| 1.2.1 Structure du gène <i>TARDBP</i> | 8 |
| 1.2.2 Protéine TDP-43..... | 8 |
| 1.2.4 TDP-43 dans la SLA..... | 14 |
| 1.2.5 Modèles animaux..... | 15 |
| 1.3 Poisson zébré..... | 20 |
| 1.3.1 Utilisation en recherche..... | 20 |
| 1.3.2 Système neuromusculaire et comportement moteur des embryons..... | 22 |
| 1.3.3 Transgénèse transitoire et stable..... | 25 |
| 1.4 Objectifs..... | 27 |
| 2. Résultats..... | 29 |
| 2.1 Génération des lignées transgéniques..... | 30 |
| 2.1.1 Constructions génétiques et microinjections..... | 30 |
| 2.1.2 Sélection des poissons fondateurs F0..... | 31 |
| 2.1.3 Lignée mutante <i>TARDBP^{G348C}</i> | 32 |
| 2.1.4 Lignée de type sauvage <i>TARDBP^{WT}</i> | 33 |
| 2.2 Génération F1..... | 35 |
| 2.2.1 Premiers protocoles de choc thermique..... | 35 |
| 2.2.2 Sélection des poissons F1..... | 39 |
| 2.3 Génération F2..... | 40 |

| | |
|--|----|
| 2.3.1 Sélection des poissons F2 <i>TARDBP</i> ^{G348C} | 40 |
| 2.3.2 Lignée F2 <i>TARDBP</i> ^{WT} | 41 |
| 2.4 Génération F3 | 43 |
| 2.4.1 Lignée mutante <i>TARDBP</i> ^{G348C} | 43 |
| 2.4.2 Lignée contrôle <i>TARDBP</i> ^{WT} | 44 |
| 2.5 Analyse du phénotype des embryons de la génération F2 | 44 |
| 2.5.1 Phénotype comportemental | 44 |
| 2.5.2 Phénotype cellulaire | 48 |
| 3. Discussion | 50 |
| 3.1 Constructions génétiques | 51 |
| 3.2 Lignées transgéniques | 54 |
| 3.3 Phénotype de la génération F2 | 58 |
| 3.4 Caractérisations futures des lignées | 60 |
| 3.5 Pertinence pour la SLA et utilisations futures des lignées | 63 |
| 4. Conclusion | 66 |
| 5. Matériel et méthodes | 67 |
| 5.1 Maintien des poissons zébrés | 68 |
| 5.2 Constructions génétiques et transgène | 68 |
| 5.4 Sélection des poissons fondateurs et progéniture | 69 |
| 5.4.1 Sélection des poissons fondateurs | 69 |
| 5.4.2 Séparation des progénitures | 69 |
| 5.4.3 Procédure de choc thermique | 69 |
| 5.5 Immunofluorescence et microscopie confocale | 70 |
| 5.6 Immunobuvardage | 71 |
| 5.7 RT-PCR | 72 |
| 5.8 Réflexe de fuite en réponse au toucher | 72 |
| 5.9 Analyse statistique | 73 |
| 6. Bibliographie | 74 |
| Annexe | i |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1. Pourcentage d'embryons transgéniques obtenu pour la lignée <i>TARDBP^{G348C}</i> F0 | 33 |
| Tableau 2. Pourcentages d'embryons transgéniques obtenus pour la lignée <i>TARDBP^{WT}</i> F0 | 35 |
| Tableau 3. Pourcentages d'embryons transgéniques obtenus pour les lignées <i>TARDBP^{G348C}</i> F1 et F2 ainsi que <i>TARDBP^{WT}</i> F1 et F2 | 40 |
| Tableau 4. Pourcentages d'embryons transgéniques obtenus pour la lignée <i>TARDBP^{G348C}</i> F3 | 43 |

Annexe

| | |
|---|---|
| Table 5. Données de la Figure 8B | i |
| Table 6. Statistiques de la Figure 9B | i |

Liste des figures

| | |
|--|-----------|
| Figure 1. Structure de la protéine TDP-43 | 9 |
| Figure 2. Schéma récapitulatif des fonctions de TDP-43..... | 13 |
| Figure 3. Coupe transversale d'embryon de poisson zébré à 19 hpf..... | 23 |
| Figure 4. Constructions génétiques et expression constitutive de eGFP..... | 31 |
| Figure 5. Expression du transgène pour les générations F1 <i>TARDBP^{WT}</i> et <i>TARDBP^{G348C}</i> | 38 |
| Figure 6. Expression du transgène pour les générations F2 <i>TARDBP^{WT}</i> et <i>TARDBP^{G348C}</i> | 42 |
| Figure 7. Expression du transgène dans le temps, suite à un choc thermique des embryons de la lignée F2 <i>TARDBP^{G348C}</i> | 45 |
| Figure 8. Comportement de nage des embryons de la génération F2 avec et sans choc thermique..... | 47 |
| Figure 9. Morphologie des axones des motoneurones de la génération F2 avec et sans choc thermique. | 49 |
| Figure 10. Représentation schématique du phénotype obtenu en fonction de la surexpression des protéines TDP-43 mutantes et de type sauvage..... | 56 |

Liste des abréviations

| | |
|------------|--|
| ♀ | Femelle |
| ♂ | Mâle |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc | ADN cyclique |
| AMO | Antisense morpholino oligonucleotide |
| ARNm | Acide ribonucléique |
| C9ORF72 | Chromosome 9 open reading frame 72 |
| CaMKII | Ca ²⁺ /calmodulin-dependent kinase II |
| CaP | Caudal primary |
| cmIc2 | Cardiac myosin light chain 2 |
| Cu | Cuivre |
| DFT | Démence fronto-temporale |
| eGFP | Enhanced green fluorescent protein |
| <i>FUS</i> | Fused in sarcoma – gène humain |
| FUS | Fused in sarcoma – protéine humaine |
| GFP | Green fluorescent protein |
| hnRNP | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein |
| hpf | Heures post-fertilisation |
| hsp70 | Heat shock promoter 70 |
| IR | Inverted repeats |
| kDa | Kilo Dalton |
| LTR | Long terminal repeats |
| miARN | micro ARN |
| MiP | Middle primary |
| mPrP | Mouse prion promoter |
| NES | Nuclear export signal |
| NLS | Nuclear localisation signal |
| RoP | Rostral primary |
| RPM | Roulements par minutes |

| | |
|---------------|--|
| RRM | RNA recognition motif |
| SLA | Sclérose latérale amyotrophique |
| SLAf | SLA familiale |
| SLAs | SLA sporadique |
| SMN2 | Survival of motoneuron 2 |
| SOD1 | Superoxide dismutase 1 |
| SV2 | Synaptic vesicle glycoprotein 2 |
| <i>TARDBP</i> | Transactive response DNA-binding protein - gène humain |
| <i>Tardbp</i> | Orthologue vertébré du gène <i>TARDBP</i> |
| <i>tbph</i> | Orthologue de la drosophile du gène <i>TARDBP</i> |
| tbph | Orthologue drosophile de la protéine humaine TDP-43 |
| tdp-1 | Orthologue du <i>C. elegans</i> de la protéine TDP-43 |
| TDP-43 | TAR DNA binding protein - protéine humaine |
| Tdp-43 | Orthologue vertébré de la protéine humaine TDP-43 |
| Tet | Tetracycline |
| Tg | Transgénique |
| TRE | Tetracycline regulatory element |
| UBQLN2 | Ubiquilin 2 |
| UTR | Untranslated region |
| WT | Wild type |
| Zn | Zinc |
| γ | Gamma |

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mon superviseur, Dr Pierre Drapeau, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci pour la confiance que tu as mise en moi, me permettant non seulement de travailler sur un projet passionnant, mais aussi de présenter nos résultats jusqu'à l'autre bout du monde. J'espère avoir été à la hauteur. Merci aussi au Dr Edor Kabashi pour m'avoir encadrée et formée pendant ma maîtrise, ce projet n'aurait pas pu se faire sans toi. Je te souhaite une très bonne continuation dans ton laboratoire, et bonne chance avec la France et les français ! Tous les membres du laboratoire, travaillant ou non sur la SLA, m'ont aidée, accompagnée et soutenue pendant ces deux années de maîtrise. Guy Laliberté, Marina Drits et Rachel Millette reçoivent ma reconnaissance infinie pour m'avoir appris tout ce que je sais sur l'entretien des poissons, et sans qui, en réalité, je n'aurais jamais réussi à mener correctement ce projet. Nathalie Champagne, Meijiang Liao et Claudia Maños, merci pour avoir généré les lignées, et pour continuer à patiemment m'expliquer ce mystère qu'est pour moi la biologie moléculaire. Merci aussi à Edna Brustein pour son aide avec la microscopie confocale et pour ses encouragements sur le projet. Les étudiants et post-doc du laboratoire ne sont pas en reste, Gary, Valérie, Sarah, Laura, Sébastien, Kessen et Sébastien, ça a été un plaisir de faire cette maîtrise en votre compagnie, merci pour les distractions et les discussions !

Je tiens aussi à remercier avec beaucoup de gratitude le laboratoire du Dr Louis Saint-Amant. Louis, je te suis redevable pour les discussions que j'ai eues avec toi tout au long de ce projet, lors des soirées et fin de semaines passées au labo, et en tant que membre de mon comité de maîtrise. J'espère pouvoir assimiler ne serait-ce qu'une partie de ta rigueur. Merci aussi au Dr Julien Ghislain, aussi membre de mon comité de maîtrise, avec qui ça a toujours été un plaisir de discuter et pour ses conseils pour mon projet.

Enfin, merci à ma famille et à mes amis, pour m'avoir soutenue et avoir toujours été présent pour moi, même lorsque je ne l'étais pas toujours pour eux. Maman, sans ton soutien inconditionnel, je n'aurais jamais pu y arriver, je ne te dis pas assez merci. Et pour répondre à votre question à tous, oui, les poissons vont bien.

1. Introduction

1.1 Sclérose latérale amyotrophique

1.1.1. Définition

La sclérose latérale amyotrophique (SLA), aussi appelée maladie de Charcot en France ou maladie de Lou Gehrig en Amérique du Nord, est une maladie neurodégénérative due à une dégénérescence sélective des motoneurones centraux et périphériques sans atteinte des fonctions sensorielles ou autonomes. Chez une minorité de patients, cette pathologie est aussi accompagnée d'une atteinte cognitive. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent en général vers 50-60 ans et mènent à une paralysie progressive générale. La mort survient dans les 2 à 5 ans après le diagnostic par insuffisance respiratoire. Aucun traitement curatif n'est présentement disponible [1].

1.1.2 Historique

La deuxième partie du 19^{ème} siècle voit se développer une nouvelle approche clinico-pathologique pour décrire et classifier les maladies. Plusieurs médecins européens commencent à étudier des maladies affectant le système moteur, liant les signes cliniques aux découvertes effectuées lors de l'autopsie. Cette nouvelle approche va révolutionner la nosologie (critères de classification des maladies), et est encore utilisée aujourd'hui pour classifier les maladies. L'un des défis rencontrés était de réussir à séparer les maladies dues à une déficience du système musculaire, de celles dues à une déficience du système nerveux moteur. Plusieurs maladies maintenant incluses dans le terme général de maladies des motoneurones ont été décrites pour la première fois pendant cette période, comme l'atrophie musculaire progressive [2], ou encore la maladie de Charcot-Marie-Tooth [3, 4]. Ces différentes pathologies résultent d'une atteinte soit des motoneurones centraux, soit des motoneurones périphériques, et dans le cas de Charcot-Marie-Tooth, on note une composante sensorielle.

C'est en 1869 que Jean-Marie Charcot publie ses observations de cas montrant une atteinte simultanée des motoneurones centraux et périphériques, sans atteinte sensorielle [5]. En 1874, Charcot complète ses observations et nomme pour la première fois cette pathologie la

sclérose latérale amyotrophique, donnant une description détaillée de l'histoire naturelle de la maladie, qui est encore aujourd'hui d'actualité [6]. En 1941, la mort due à la SLA de Henri Louis Gehrig, dit Lou Gehrig, un joueur de baseball des Yankees de New York marque suffisamment la population nord-américaine pour donner son surnom à la maladie. La SLA est maintenant couramment appelée maladie de Lou Gehrig en Amérique du Nord. De 1869 à 1993, c'est la seule nouveauté que connue cette maladie.

En 1993, la découverte de mutations dans le gène codant pour l'enzyme Cu/Zn superoxyde dismutase 1 (SOD1) est un point tournant dans la recherche sur la SLA [7] et permet un début de compréhension de la pathogénèse et de la physiopathologie de la maladie, entre autre grâce à l'établissement des premiers modèles animaux de la SLA. Cette découverte mène au seul traitement efficace à ce jour, le riluzole [8]. La découverte dans les dernières années d'autres gènes impliqués dans la maladie, en particulier les gènes TAR DNA binding protein (*TARDBP*) [9-15] et Fused in sarcoma (*FUS*) [16, 17] et plus récemment les gènes Ubiquilin 2 (*UBQLN2*) [18] et Chromosome 9 open reading frame 72 (*C9ORF72*) [19, 20] permet d'avancer nos connaissances de la pathologie moléculaire de la SLA, à condition d'arriver à comprendre la fonction et les défauts causés pas les mutations de ces gènes dans la maladie.

1.1.3 Épidémiologie

Les similarités entre les différentes maladies des motoneurones rend difficile un diagnostic clair de la SLA et donc l'acquisition de données épidémiologiques. En 1994, les critères de diagnostic El Escorial pour la SLA ont été développés par la fédération mondiale de neurologie [21]. Ces critères ont été révisés en 1998 pour souligner l'importance des tests en laboratoire et ont été re-nommés les critères Airlie House [22]. En 2008, de nouvelles révisions ont été ajoutées pour prendre en compte l'utilisation de la neurophysiologie dans la catégorisation du diagnostic et ces nouveaux critères nommés Awaji-Shima [23] ont permis d'augmenter la sensibilité de diagnostic sans augmenter le nombre de faux-positifs [24]. Malgré tout cela, le diagnostic lui-même est réalisé par

exclusion, 9 à 15 mois en moyenne après les premiers symptômes et est confirmé de façon post-mortem uniquement [25].

Des données récentes indiquent que l'incidence de la SLA dans les pays occidentaux est en moyenne de 1,5 à 2,5 cas pour 100 000 personnes par année dans les pays Européens et aux États-Unis et le risque de développer la maladie de 1:400 [26, 27]. Cependant, l'ethnicité semble avoir une influence sur l'incidence, les pays asiatiques, africains et hispaniques ayant une incidence inférieure [28]. Au Canada, peu de données sont disponibles à l'échelle du pays. Cependant, des études en Nouvelle-Écosse, Ontario, Terre-Neuve et Labrador indiquent une incidence de 2 cas pour 100 000 personne par année en moyenne, et ce depuis 30 ans dans le cas de la Nouvelle-Écosse. De plus, la prévalence serait d'environ 5 à 7 cas pour 100 000 [29]. Les hommes semblent être plus touchés que les femmes, le ratio homme/femme étant de 1,3 environ [26, 27].

1.1.4 Histoire naturelle de la maladie et traitements

L'âge moyen de d'apparition des premiers symptômes de la SLA typique est autour de 55-65 ans et bien que la progression de la maladie varie en fonction des patients et de leur étiologie, 60% des patients décèdent dans les 3 ans après l'apparition des premiers symptômes et seulement 10% des patients restant survivent plus que huit ans. La majorité des patients décèdent dans les 2 à 5 ans après le diagnostic, en général d'une insuffisance respiratoire [1, 30].

La maladie est en général caractérisée par le lieu d'apparition des premiers symptômes. Dans 65% des cas, les membres distants sont les premiers touchés et la maladie est dite de forme spinale. Dans 30% des cas, les premières manifestations sont dans la région buccale, consistant en un défaut d'élocution (dysarthria) ainsi que d'un défaut de déglutition (dysphalie), les muscles de la langue étant les premiers affectés. Pour les 5% de cas restant, les premiers symptômes sont d'ordre respiratoires, causant dès le début de la maladie des difficultés à respirer (dyspnée), en particulier en position allongée (orthopnée) [27, 31]. La forme spinale a le meilleur pronostic, suivi de la forme bulbaire puis

respiratoire [32]. Le déroulement de la maladie dépend du site d'apparition des premiers symptômes, les motoneurones étant affectés de façon séquentielle [33]. Les symptômes, en général asymétriques, soulignent la perte des motoneurones centraux et périphériques en se manifestant sous la forme de crampes, une faiblesse et une atrophie musculaire, des dénervations et parfois des fasciculations, en particulier dans les cas bulbaires (symptômes des motoneurones périphériques), ainsi qu'une spasticité et hyperréflexie (symptômes des motoneurones centraux). La progression des symptômes est inéluctable, provoquant une paralysie progressive générale. La condition des patients devient critique suite à la dénervation des muscles respiratoires, entraînant une insuffisance respiratoire [1]. Les fonctions cérébrales sont généralement conservées chez les patients souffrant de la SLA. Cependant, environ 15% des patients souffrent aussi de démence fronto-temporale [34]. Les nerfs oculomoteur commun et abducens, responsables en partie des mouvements extraoculaires, ainsi que le nerf pudendal, responsable du contrôle des régions génitales masculines et féminines, sont généralement épargnés dans les cas de SLA, permettant aux patients d'utiliser les mouvements de leurs yeux pour communiquer, et de garder le contrôle de leur vessie et de leurs intestins [35, 36]. Presque 20 ans après la découverte du premier gène impliqué dans la SLA [7], et plus de 30 essais cliniques de phase II et III [37], le riluzole [8] reste le seul médicament ayant un effet modeste sur l'espérance de vie des patients. Cet effet reste très modeste, de 2 à 4 mois en moyenne [38, 39]. Les soins consistent principalement à traiter les symptômes causés par la dégénérescence des motoneurones, à améliorer la prise en charge des fonctions respiratoires et nutritionnelles des patients [31, 40]. L'effet modeste du riluzole souligne l'importance de découvrir des médicaments plus efficaces.

1.1.5 Étiologie

Environ 90% des cas de SLA semblent être de nature sporadique (SLAs – SLA sporadique), tandis que les 10% de cas restant ont une composante héréditaire (SLAf – SLA familiale). Cependant, il n'y a pas de différence dans la présentation des symptômes,

ni dans l'histoire naturelle de la maladie entre les deux formes de SLA [41]. De plus, le riluzole exerce un effet bénéfique chez les patients présentant l'une ou l'autre des formes [39].

Les causes de la SLAs sont variées et le plus souvent inconnues, un ensemble de facteurs génétiques et environnementaux se combinant pour augmenter le risque de développer la maladie [42]. Plusieurs études ont été réalisées pour étudier l'influence que différents facteurs environnementaux et génétiques peuvent avoir. S'il est maintenant accepté que les individus âgés entre 55 et 65 ans, ceux de sexe masculin ainsi que probablement les fumeurs sont le plus à risque, l'influence d'autres facteurs comme le stress physique, d'autres facteurs tels que l'exposition aux pesticides ou l'exercice d'une activité physique intense sur le long terme reste incertaine, une grande partie des études réalisées souffrant d'un échantillonnage trop faible, d'une méthodologie discutable et d'un manque de reproductibilité [43].

En plus des facteurs génétiques non mendéliens [44], plusieurs gènes ont été liés à la SLAs. Parmi eux, les gènes *SOD1* [45], neurofilament heavy polypeptide [46], angiogenin [47, 48], vascular endothelial growth factor [49], *TARDBP* [11-13], *FUS* [50], *UBQLN2* [18] et *C9ORF72* [51], dont les mutations pourraient représenter jusqu'à 20-25% des cas de SLAs [44, 52].

Il est intéressant de noter que tous les gènes mutés dans les cas de SLAs sont aussi retrouvés mutés dans des cas de SLAf [44]. De nombreux gènes ont été liés à la SLAf et parmi les 15 présentement identifiés, *SOD1* [7], *TARDBP* [11-13], angiogenin [47, 48], valosin-containing protein [53], *FUS* [16, 17] et *C9ORF72* [19, 20] sont responsables de cas classiques de SLA avec une transmission mendélienne traditionnelle.

Le premier gène identifié en 1993 est *SOD1* [7], qui code pour l'enzyme Cu/Zn superoxyde dismutase 1. Plus de 166 mutations ont été identifiées et sont responsables de 10 à 20% des cas de SLAf. Les mutations sont variées et se retrouvent sur toute la séquence de la protéine, pouvant affecter la structure, l'activité enzymatique et la stabilité de la forme

native de SOD1. Les formes mutées de SOD1 causent une toxicité spécifique aux motoneurones, bien que SOD1 soit présente de façon ubiquitaire dans l'organisme. Huit mécanismes différents de toxicité amenant à la dégénérescence des motoneurones ont été identifiés, opérant à travers des voies incluant les métabolismes de l'ADN et de l'ARN, les mitochondries, les neurofilaments et le transport axonal et différentes organelles cellulaires [54]. Cette hétérogénéité des mécanismes de toxicité de SOD1 mutée souligne les difficultés auxquels se heurtent les scientifiques essayant de comprendre la pathogénèse de la SLA et de trouver un traitement pour la maladie.

La découverte de la présence de TDP-43, la protéine codée par le gène *TARDBP*, dans les inclusions cytoplasmiques retrouvées dans les neurones des patients de SLA [9, 10] a permis de lier le gène *TARDBP* à la maladie. Depuis, 44 mutations de *TARDBP* (<http://www.molgen.ua.ac.be/FTDMutations> et [55]) ont été découvertes, comptant pour 4%-6% des cas de SLA et environ 1%-2% des cas de SLAs [56, 57]. Cette découverte a permis l'identification du gène *FUS*, codant pour la protéine FUS, et dont des mutations ont aussi été liées à la SLA [16, 17]. TDP-43 et FUS sont deux protéines à la structure et aux fonctions similaires, impliquées entre autre dans le métabolisme de l'ARN et la réponse au stress [58]. Des formes mutantes de ces gènes ont été liées non seulement aux formes de SLA classiques, mais aussi à la SLA avec une composante de démence fronto-temporale, ainsi qu'à la démence fronto-temporale seule ou liée au Parkinson [59-61]. Cependant, les effets de ces mutations sur la fonction de ces gènes et donc leur rôle dans la SLA restent encore inconnus. L'intérêt du laboratoire Drapeau dans ces deux gènes est motivé par le développement de modèles *in vivo*, ainsi que l'implication de ces deux gènes dans d'autres maladies. Mon projet de maîtrise se concentrait sur *TARDBP*, afin de mieux comprendre son fonctionnement et son potentiel comme cible thérapeutique.

1.2 *TARDBP*

1.2.1 Structure du gène *TARDBP*

Le gène *TARDBP* (NM_007375), constitué de six exons, est localisé au niveau du locus 1p36.22 [62]. Les exons 2 à 6 codent pour la protéine TDP-43 et le gène *TARDBP* est conservé des invertébrés aux mammifères [63].

1.2.2 Protéine TDP-43

1.2.2.1 Structure de la protéine

La protéine TDP-43, constituée de 414 acides aminés et ayant un poids moléculaire de 43 kDa, est présente de façon ubiquitaire dans l'organisme, sous forme d'homodimère [64]. Comme d'autres membres de la famille des ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP), elle possède deux domaines de reconnaissance à l'ARN nommés RNA Recognition Motif 1 et 2 (RRM1 et RRM2), ainsi qu'un domaine riche en glycine situé en C-terminus. Un signal de localisation nucléaire bipartite (Nuclear localisation signal – NLS) situé dans le N-terminus ainsi qu'un signal d'exportation nucléaire riche en leucine (Nuclear export signal – NES) situé dans le RRM2, lui permettent de voyager entre le noyau et le cytoplasme [65, 66] (**Figure 1**).

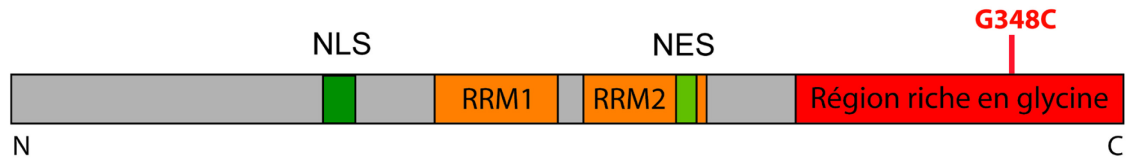


Figure 1. Structure de la protéine TDP-43. La protéine TDP-43 possède deux motifs de reconnaissance à l'ARN, RRM1 et RRM2, ainsi qu'une région riche en glycine située en région C-terminale et où se trouve la majorité des mutations liées à la SLA. Un signal de localisation nucléaire (NLS) est situé en région N-terminale et un signal d'exportation nucléaire (NES) est situé dans le RRM2. RRM : RNA recognition motif ; SLA : sclérose latérale amyotrophique ; NLS : nuclear localisation signal ; NES : nuclear export signal.

Le RRM1 est requis non seulement pour la liaison à l'ARN mais aussi à l'ADN [63, 65, 67], tandis que le RRM2 semble lui être principalement impliqué dans le remodelage de la chromatine et la dimérisation de TDP-43 [67, 68]. La région N-terminale n'est pas encore complètement caractérisée, mais aurait un rôle fonctionnel dans l'exclusion des exons [69]. Le domaine riche en glycine joue un rôle dans différents aspects de l'épissage, tandis que la région C-terminale en général est responsable des interactions protéine-protéine, incluant les interactions avec d'autres hnRNPs [63]. Le C-terminus de TDP-43 contient plusieurs sites de phosphorylation [70], et la séparation sur gel SDS-PAGE de TDP-43 donne lieu à un doublet de 43 kDa et 45 kDa, consistant avec un état phosphorylé [9, 10]. Deux sites de reconnaissance de clivage par la Caspase-3 sont localisés au niveau des acides aminés 86-89 et 216-219, donnant lieu respectivement à des fragments de 37 kDa et 25 kDa. Ces fragments peuvent aussi être obtenus par une digestion à la RNase [69, 71]. La structure de TDP-43 nous donne donc un aperçu des rôles variés que cette protéine peut jouer dans différentes fonctions cellulaires.

1.2.2.2 Fonctions de la protéine TDP-43

Fonctions physiologiques de TDP-43

Pour déterminer les fonctions physiologiques de TDP-43, plusieurs modèles cellulaires et animaux n'exprimant pas ou peu la protéine ont été générés.

Des cellules ayant une réduction dans l'expression de TDP-43 voient le niveau de plusieurs facteurs de proliférations altérés, en particulier ceux associés à la protéine rétinoblastome qui est essentielle dans le contrôle du cycle cellulaire, de la différenciation cellulaire, ainsi que dans la maintenance et l'intégrité du génome. Ce changement est accompagné par une morphologie nucléaire altérée et par l'augmentation du nombre de cellules mourant par apoptose [72]. Chez le *C. elegans*, le knockout de *tdp-1*, l'orthologue de *TARDBP*, ne cause aucun défaut de développement [73, 74]. Cependant, chez la drosophile, la perte de *tbph*, l'orthologue de *TARDBP* est létale [75] ou semi-létale [76-79]. Les individus survivants montrent une perte axonale suivie de la mort des motoneurones [78], ainsi qu'une locomotion anormale et des défauts au niveau des jonctions neuromusculaires, accompagnés d'une réduction de leur durée de vie [76, 77]. Chez l'embryon de poisson zébré, le knockdown de l'orthologue de la protéine TDP-43 cause aussi un défaut de locomotion accompagné d'une arborisation surnuméraire et prémature des axones des motoneurones [80]. Plusieurs souris *null* pour *Tardbp* ont été générées. Les souris *Tardbp*^{-/-} meurent tôt lors de l'embryogénèse [81-83], tandis que les souris *Tardbp*^{+/-} survivent et se développent normalement, malgré l'apparition d'une faiblesse musculaire liée à l'âge. Cette différence marquante entre les souris *Tardbp*^{-/-} et *Tardbp*^{+/-} est probablement liée au fait que TDP-43 autorégule son expression, permettant aux souris *Tardbp*^{+/-} d'avoir un niveau d'expression de Tdp-43 normal [84].

Ces expériences montrent que TDP-43 joue un rôle important dans le développement embryonnaire et la durée de vie des organismes, ainsi que dans la régulation des terminaux synaptiques et dans la locomotion. Une étude protéomique a montré que TDP-43 fait parti de deux réseaux dans la cellule : un premier réseau lié aux hnRNPs,

composé de protéines nucléaires régulant l'épissage et le métabolisme de l'ARN ; et un deuxième réseau cytoplasmique régulant la traduction de l'ARNm, lié aux facteurs de transcriptions, d'élongations et aux sous-unités ribosomales [85].

Rôle nucléaire de TDP-43 : régulation des gènes et du métabolisme de l'ARN

Dans le noyau, TDP-43 est localisée au niveau de structures appelée les TDP Bodies, qui ainsi que dans les fibres de périchromatine [86], plaçant TDP-43 là où ont lieu la transcription et l'épissage, ainsi qu'au sein d'un réseau régulant le triage et l'adressage des différents facteurs nucléaires.

C'est d'abord comme facteur de transcription que TDP-43 a été découvert en 1995. Ou et collègues ont montrés que la protéine se lie à une séquence riche en motifs pyrimidiques de l'ADN de la Transactive response via ses domaines RRM, réprimant l'expression de la répétition terminale longue (LTR – long terminal repeat) du virus immunodéficient humain 1 [87]. C'est de ce premier rôle que lui vient son nom, Transactive response (TAR) DNA-binding protein – *TARDBP* et TDP. TDP-43 réprime aussi l'expression du gène de la protéine de sperme acrosomique SP-10 dans les tissus somatiques, et cette régulation nécessite non seulement la présence du RRM1, mais aussi celle du C-terminus [88]. En plus de son rôle comme facteur de transcription, TDP-43 régule l'épissage de plusieurs ARN tels que ceux de la Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) [89], de l'apolipoprotéine A-II [90], de la kinase cycline dépendante 6 [72] et de Survival of Motor Neuron 2 (SMN2) [91]. TDP-43 peut aussi réguler l'épissage de concert avec d'autres protéines. Ainsi, TDP-43 interagit directement avec la protéine SMN qui est impliquée dans l'assemblage du *spliceosome*, le site où à lieu le phénomène d'épissage [91]. TDP-43 participe aussi à un complexe de hnRNPs dont les fonctions incluent l'inhibition de l'épissage d'exons. Cette association passe par la hnRNP A2 qui se lie au C-terminus de TDP-43 [92]. La protéine FUS, impliquée dans la SLA, se lie aussi directement à TDP-43 via le C-terminus, et ensemble ils co-régulent l'ARNm du gène histone deacetylase 6 [93]. Enfin, TDP-43 est impliquée dans la biogénèse des microARN

(miARN) [94, 95]. Une déplétion de TDP-43 dans le noyau entraîne une diminution spécifique de let-7b, une famille de miARN importante pour la différenciation cellulaire [95]. De plus, TDP-43 est associée au complexe DRISHA, qui est impliqué dans la biogénèse des miARN primaires [94]. TDP-43 agit donc dans la régulation de l'épissage de plusieurs gènes et a un rôle direct ainsi qu'indirect sur la biogénèse de l'ARN. Cependant, le rôle de TDP-43 dans le métabolisme de l'ARN ne se limite pas au noyau et se poursuit dans le cytoplasme.

Fonctions cytoplasmiques de TDP-43 : métabolisme de l'ARN et stress cellulaire

La localisation de TDP-43 dans la cellule est régulée par ses domaines de NLS et NES. Effectivement, si le NLS de TDP-43 est défectif, une accumulation cytoplasmique de TDP-43 est obtenue. Inversement, si le NES est non fonctionnel, il y a une augmentation de TDP-43 nucléaire [96]. Cependant, l'état transcriptionnel de la cellule peut aussi avoir une influence sur le transport nucléaire. Ainsi, l'inhibition de la transcription par un inhibiteur de l'ARN polymérase II résulte en une accumulation cytoplasmique de TDP-43, indiquant qu'une synthèse continue d'ARNm est nécessaire pour son transport [68]. De plus, l'altération du RRM1, empêche la liaison à l'ARN et à l'ADN et résulte en une distribution cellulaire incorrecte de TDP-43 [68]. Ces résultats suggèrent un rôle dans le transport de l'ARNm. Effectivement, TDP-43 se lie à l'ARNm de la protéine neurofilament light et régule sa translocation dans le cytoplasme ainsi que sa traduction [66]. Dans le cytoplasme, TDP-43 est retrouvée dans des granules cytoplasmiques d'ARN telles que les granules de transport de l'ARNm, les granules de stress et les Processing Bodies, qui sont responsables du stockage des ARNm inactifs et de leur transport au niveau des sites de traduction [97]. En plus de son rôle dans le transport des ARNm, TDP-43 participe aussi à leur stabilisation. Par exemple, TDP-43 interagit avec l'ARNm de NFL, ce qui le stabilise et prévient sa dégradation [98]. Cette liaison se fait par le RRM1 [99]. De plus, en situation de stress, TDP-43 s'associe à des marqueurs de transport de l'ARNm ainsi qu'au niveau des granules

de stress et ces changements sont accompagnés d'une redistribution de la protéine du noyau vers le cytoplasme ainsi que d'une augmentation de l'expression de TDP-43 [100-102].

Ces données indiquent donc un rôle complexe de TDP-43 dans toutes les étapes du métabolisme de l'ARN ainsi que dans la réponse au stress cellulaire. Il n'est donc pas étonnant que des mutations de TDP-43 mènent à des maladies humaines. Cependant, il reste encore à découvrir comment des mutations dans cette protéine exprimée de manière ubiquitaire entraînent un phénotype spécifique des motoneurons dans le cas de la SLA (Figure 2).

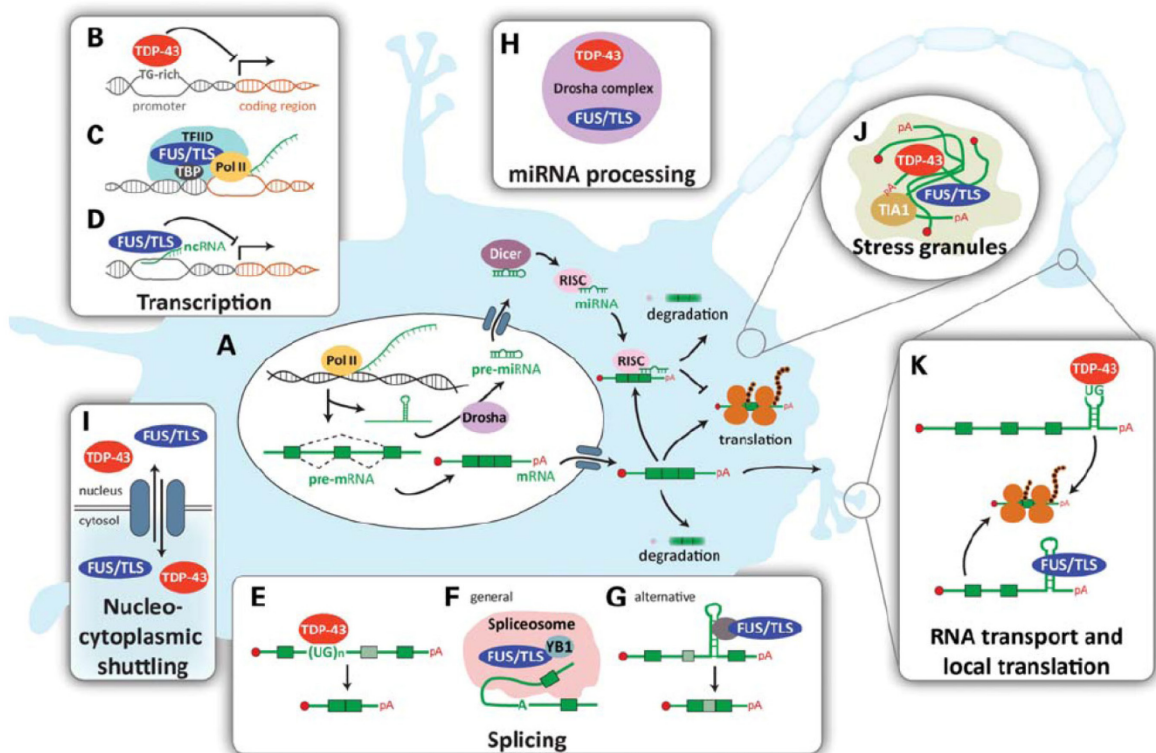


Figure 2. Schéma récapitulatif des fonctions de TDP-43. Adapté de Ilieva et al., 2009 [54].

1.2.4 TDP-43 dans la SLA

Le lien entre la SLA et TDP-43 a été fait en 1996, lors de l'identification de TDP-43 comme étant l'une des principales composantes présente dans les inclusions positives pour l'ubiquitine retrouvées chez des personnes atteintes de SLA ou de démence fronto-temporale (DFT) [9, 10].

Ces inclusions sont présentes non seulement au niveau de la moelle épinière, mais aussi dans le cerveau des patients, dans le néocortex frontal et temporal, les noyaux gris centraux et les structures limbiques [9, 10, 14, 15, 103-105]. Elles sont retrouvées principalement dans le cytoplasme et les neurites dysmorphiques des neurones et des cellules de la glie [9, 10, 105-108] et sont accompagnées d'une perte nucléaire de TDP-43 [10, 14, 106, 109] arrivant tôt dans la pathologie [104]. Dans ces inclusions, TDP-43 est hyperphosphorylée et ubiquitinée [9, 10, 110] et peut aussi être trouvée sous les formes clivées C-terminale de 25 kDa et 35 kDa [9, 10]. Cependant, ces fragments C-terminaux se retrouvent principalement dans le cortex et peu sont présents dans la moelle épinière [109, 111]. Ces inclusions ne contiennent pas de fibrilles et ne sont pas amyloïdes [112] et sont souvent référées comme étant ubiquitine-positives tau-négatives et α -synucléine-négatives. Cette "pathologie de TDP-43", comme elle est souvent nommée, est retrouvée dans tous les cas de SLA, sauf ceux survenant dus à des mutations de *SOD1* [107, 113] ou des mutations de *FUS* [16, 17, 61]. Il est intéressant de noter que cette pathologie de TDP-43 n'est pas spécifique à la SLA. Elle est retrouvée dans 80% à 94% des cas de DFT [9, 10, 114] presque à l'identique, mis à part l'absence d'inclusions dans la moelle épinière. Des marquages similaires sont retrouvés dans d'autres maladies, entre autre dans environ 40% des cas de la maladie d'Alzheimer [115-117], principalement dans le système limbique des patients. Ces marquages se retrouvent aussi par exemple dans d'autres types de démences [115, 117, 118], dans environ 20% des cas de la maladie de Parkinson [115, 118] et dans les cas de la maladie de Huntington [119]. Cependant, il faut noter que cette pathologie est aussi présente dans le cerveau de 29% de sujets sains âgés de plus de 65 ans, principalement dans le système limbique [120]. La question de savoir si ce marquage anormal de TDP-43 est

une cause ou une conséquence de ces maladies neurodégénératives, ou bien un processus de protection cellulaire reste à être élucidée. Cependant, malgré la présence de cette pathologie dans un grand nombre de maladies neurodégénératives, les mutations de TDP-43 causent majoritairement la SLA et rarement la DFT.

Suite à la première identification de ces inclusions positives pour TDP-43, des analyses mutationnelles du gène *TARDBP* ont été réalisées, amenant à la découverte des premières mutations de ce gène chez des patients atteints de SLA [11-15]. Les patients ayant des mutations de *TARDBP* ont une présentation classique de la SLA, parfois accompagnée de DFT, avec un marquage anormal de TDP-43 (‘‘pathologie de TDP-43’’) [60, 121]. À ce jour, 44 mutations hétérozygotes dominantes ont été découvertes. Ces mutations sont principalement localisées au niveau de la région C-terminus de la protéine, codée par l’exon 6, et sont toutes des mutations faux-sens sauf une, Y374X [57]. On peut supposer que les différentes mutations peuvent causer une toxicité pour des raisons différentes : par exemple, la mutation D169G, qui est la seule mutation causative de la SLA à ne pas être située dans le C-terminus, peut interférer avec les fonctions de liaison à l’ADN et à l’ARN, due à sa position dans le RRM1. Plusieurs mutations peuvent augmenter la propension de TDP-43 à être phosphorylée, en particulier celles introduisant des résidus thréonine ou sérine, comme A315T ou N267S. La mutation qui nous a intéressés dans ce projet de maîtrise, G348C, pourrait quant à elle accroître la tendance de TDP-43 à s’agréger, dû à l’introduction d’un résidu cystéine promouvant les ponts intermoléculaires [12].

En absence de mesure biochimique spécifique pour la protéine TDP-43 mutante, plusieurs modèles animaux ont été créés, dont le modèle poisson zébré en premier [80] pour étudier le mécanisme d’action de certaines de ces mutations, ainsi que pour étudier la pathogénicité de la protéine TDP-43 de type sauvage.

1.2.5 Modèles animaux

Lors de l’écriture de ce mémoire, 8 modèles murins de *TARDBP* sont publiés, sept sur la souris et un sur le rat. Différents promoteurs ont été utilisés, amenant à des variations

dans l'expression des transgènes pouvant être responsables de certaines des différences observées dans les différents modèles.

Le promoteur prion murin (*mPrP*) promeut un haut niveau d'expression dans le système nerveux, entre autre pendant la phase développementale. Trois laboratoires l'ont utilisé, générant des souris transgéniques ayant en général un phénotype sévère arrivant très tôt après la naissance. Un premier groupe a généré des souris surexprimant le transgène *TARDBP*^{A315T} à un niveau trois fois celui de *Tardbp* endogène. Les souris transgéniques ont un défaut de locomotion accompagné de dégénération axonale et de dénervation des motoneurones, et meurent avant l'âge de cinq mois. Une lignée *TARDBP*^{WT} n'a pas été générée [122]. Les deux autres groupes ont développé des lignées *TARDBP*^{WT} et ces souris développent un phénotype de façon dose-dépendante [123, 124]. Des souris hémizygote pour *TARDBP*^{WT}, surexprimant le transgène environ deux fois par rapport à *Tardbp*, ne développent pas de phénotype, tandis que les homozygotes *TARDBP*^{WT} (surexpression d'environ 2,5 fois par rapport à l'endogène) développent un phénotype sévère débutant à 14 jours et meurent en un à deux mois. Ces souris présentent une dégénération axonale avec un défaut locomoteur [124]. La différence de phénotype entre les souris hémizygote et homozygotes souligne le fait que la toxicité de la protéine de type sauvage est dose-dépendante et qu'il y a probablement un seuil de toxicité [124]. Stallings et collègue se sont heurtés au même problème, leurs souris transgéniques *TARDBP*^{WT}, *TARDBP*^{A315T} et *TARDBP*^{M337V} ayant un trop haut niveau d'expression meurent trop tôt pour pouvoir être étudiées. Une lignée *TARDBP*^{A315T} ayant un niveau d'expression intermédiaire (4 fois le niveau endogène environ) développe un phénotype moteur avec dénervation axonale et les souris transgéniques meurent en 75 jours. Cependant, la lignée *TARDBP*^{WT} ayant un niveau d'expression plus faible ne développe pas de phénotype moteur [123]. Le promoteur *mPrP* étant très actif lors du développement, ces résultats indiquent une toxicité développementale de TDP-43, qu'elle soit de type sauvage ou mutante, lorsque surexprimée.

Les autres modèles murins utilisent soit des promoteurs exprimés principalement de façon post-natale (*Thy-1.2* ou *CaMKII*), soit un système inductible utilisant la tétracycline (*TRE* – Tetracycline response element). Le promoteur *Thy-1.2* permet d'avoir une expression uniquement neuronale du transgène. Les souris transgéniques *TARDBP^{WT}* ayant ce promoteur développent un phénotype moteur avec neurodégénération axonale et une survie réduite [125, 126]. Ce résultat est encore une fois dose-dépendant et n'apparaît pas si la surexpression du transgène est inférieure à trois fois le niveau de l'endogène [125]. Le promoteur *CaMKII* (Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II) permet une expression du transgène uniquement dans l'encéphale antérieur, mais pas dans le tronc cérébral ou au niveau de la moelle épinière. Des souris surexprimant soit le gène souris *TARDBP^{WT}* soit le gène humain *TARDBP^{WT}* développent un phénotype moteur avec neurodégénération, mais aussi des défauts cognitifs [127, 128]. Il est intéressant de noter que les souris *TARDBP^{ΔNLS}*, dont le NLS est non-fonctionnel ont un phénotype plus sévère que les souris *TARDBP^{WT}* [128]. Zhou et collègue ont généré des rats transgéniques en utilisant le promoteur du gène *TARDBP* humain. Les rats *TARDBP^{WT}* sont normaux, tandis que ceux exprimant la mutation *TARDBP^{M337V}* développent un phénotype sévère tôt dans le développement. Ces résultats indiquent que, à même niveau d'expression, la protéine de type sauvage est moins toxique qu'une version mutante. Ils ont ensuite généré des rats transgéniques en utilisant le promoteur inductible à la tétracycline (*TRE*). Lorsque le promoteur est activé après la naissance, les rats développent un phénotype moteur progressif avec neurodégénération qui est dose-dépendant [129].

Ces résultats indiquent que la toxicité due à *TARDBP* est dose-dépendante, avec un seuil probablement situé autour de trois fois le niveau endogène du gène. La protéine de type sauvage est toxique au-dessus d'un seuil, mais les versions mutantes ont une toxicité plus forte. Il est intéressant de noter que parmi ces différents modèles de la maladie, bien que des inclusions cytoplasmiques soient présentes dans presque tous les cas, elles ne sont jamais [122, 126] ou rarement [123-125] positives pour TDP-43, contrairement à ce qui est rencontré chez les patients humains [9, 10]. Le fragment C-terminus clivé de TDP-43 est

observé dans tous les cas sauf un [126], qui pourtant développe un phénotype, et trois modèles ne présentent pas de perte nucléaire de TDP-43 [123, 124, 126]. Enfin, trois modèles utilisant des promoteurs différents montrent une atteinte sélective des motoneurones spinaux et des neurones de la couche corticale V où se situent les motoneurones corticaux [122, 125, 129].

Récemment, un nouveau modèle de souris a été publié, utilisant les fragments génomiques du gène humain *TARDBP* de type sauvage ou arborant les mutations G348C ou A315T, et lié au promoteur du gène humain *TARDBP*. Ces souris transgéniques expriment les transgènes de façon ubiquitaire, et le niveau d'expression est environ trois fois le niveau endogène. Les souris *TARDBP*^{G348C} et *TARDBP*^{A315T} développent une pathologie progressive qui est âge-dépendante, avec des défauts moteurs et cognitifs. Des inclusions cytoplasmiques positives pour l'ubiquitine et pour TDP-43 sont présentes, ainsi que les fragments clivés C-terminaux de TDP-43. Les souris *TARDBP*^{WT} ont aussi un phénotype, mais moins prononcé que pour les souris *TARDBP*^{G348C} et *TARDBP*^{A315T}. Cependant, il n'y a pas de neurodégénération observée, probablement dû au fait que le promoteur utilisé contient la région autorégulatrice située en 3' UTR, qui permet à TDP-43 de réguler sa propre expression et permet de garder les niveaux d'expressions à un niveau bas [130].

La difficulté qu'ont présentement les groupes de recherche à créer des modèles transgéniques murins de *TARDBP* a motivé l'émergence de modèles génétiques générés avec des non-mammifères. Ces modèles de *C. elegans*, drosophile ou poisson zébré permettent d'étudier la pathogénicité du gène *TARDBP*, sans nécessairement chercher à reproduire exactement la SLA.

Trois modèles *C. elegans* ont été publiés pour le moment, exprimant le transgène de façon pan-neuronale. Les nématodes exprimant le transgène *TARDBP*^{WT} présentent un phénotype moteur modéré, caractérisé par de mouvements non-coordonnés, une accumulation nucléaire de TDP-43 et des défauts au niveau des jonctions neuromusculaires [73, 74, 131]. Les mutants *TARDBP*^{G290A}, *TARDBP*^{A315T} et *TARDBP*^{M337V} présentent un phénotype plus

sévère avec des défauts axonaux, une neurodégénération des neurones et une réduction de la durée de vie. Il est intéressant de noter que si l'hyperphosphorylation des transgènes est bloquée, il y a une amélioration du phénotype, indiquant le rôle toxique de cette modification [74].

Plusieurs modèles de drosophiles transgéniques pour *TARDBP* ont été publiés, exprimant les transgènes dans différents sous-types de populations cellulaires. L'expression de *TARDBP^{WT}* dans les motoneurones cause un défaut de locomotion amenant à une paralysie et une réduction de l'arborisation axonale des motoneurones [77, 78, 132]. Cependant, l'expression de *TARDBP^{Q331K}* dans les motoneurones conduit à un phénotype plus sévère lorsqu'exprimé à un même niveau d'expression [132]. Lorsque *tbph*, l'orthologue de *TARDBP* chez la drosophile, ou *TARDBP^{WT}* sont surexprimés dans les neurones sensoriels, on observe une augmentation de l'arborisation dendritique. Cependant, l'expression des mutants *TARDBP^{Q331K}* ou *TARDBP^{M337V}* conduit à une diminution de l'arborisation dendritique [79]. Lorsque *TARDBP^{WT}* est exprimé au niveau des yeux, une dégénération dose-dépendante est observée [78, 132-134]. Ce phénotype est plus sévère lorsque *TARDBP^{M337V}* est exprimé [134]. Cependant, lors de l'utilisation d'un promoteur pan-neuronal, l'expression de *TARDBP^{WT}* donne lieu à un phénotype plus sévère que ceux obtenus pour les mutants *TARDBP^{A315T}*, *TARDBP^{G348C}*, *TARDBP^{A382T}*, *TARDBP^{G287S}* et *TARDBP^{N390D}*, probablement du à un niveau d'expression trop élevé [135]. Enfin, Miguel et collègues ont trouvé que l'expression de *TARDBP^{WT}* dans les neurones, les cellules de la glie ou les cellules musculaires est létale au stade larval. L'expression du transgène à l'âge adulte donne un phénotype plus progressif, amenant à la mort des individus en 16 jours, alors que l'expression d'une version de *TARDBP* où le NLS ou bien le NES sont non-fonctionnels permet une survie plus longue [133].

En contraste avec les modèles invertébrés, le poisson zébré est un vertébré avec donc un plus grand potentiel pour reproduire le phénotype de la SLA. Les seuls modèles *TARDBP* de poisson zébré publiés utilisent la technique de transgéniques transitoires qui consiste à injecter de l'ARNm au stade 1 à 8 cellules. L'ARNm se dégrade en environ cinq jours, ne

permettant pas de voir un effet chez les individus adultes. Cependant, les embryons de poissons zébrés ont, à deux jours, un comportement moteur stéréotypé et bien caractérisé. Des modifications à ce comportement sont donc facilement observables. L'injection de l'ARNm de *TARDBP^{WT}* entraîne une réduction de la longueur des axones des motoneurones ainsi qu'une arborisation aberrante et surnuméraire de façon dose dépendante [136]. Cependant, cet effet n'a pas été obtenu par Kabashi et collègues, dû à une concentration plus faible d'ARNm [80]. Toutefois, cette concentration d'ARNm utilisée est suffisamment élevée pour compenser pour la perte de fonction du gène *Tardbp* dans ce même modèle [80]. L'injection d'ARNm de *TARDBP^{A315T}* ou *TARDBP^{G348C}* provoque un phénotype plus sévère, avec encore une fois une réduction de la longueur des axones des motoneurones et une arborisation surnuméraire [80, 136]. Cependant, bien que l'expression de *TARDBP^{A382T}* provoque une réduction de la longueur des axones des motoneurones, il n'y a pas d'arborisation surnuméraire [80], confirmant que les différentes mutations n'ont pas nécessairement le même mécanisme de toxicité.

La difficulté à obtenir des lignées transgéniques murines *TARDBP*, et les résultats parfois contradictoires obtenus avec les modèles invertébrés laissent à penser que le poisson zébré, un vertébré pour lequel les chercheurs possèdent de nombreux outils génétiques, peut être un modèle permettant d'étudier le gène *TARDBP* de façon plus poussée. Pour cela, nous avons décidé de créer des lignées transgéniques stables de poissons zébrés, qui permettraient de contrôler les expériences dans le temps.

1.3 Poisson zébré

1.3.1 Utilisation en recherche

Les invertébrés comme le *C. elegans* et la drosophile, ont deux grands avantages en biologie : l'accessibilité à un nombre élevé d'individus en un court laps de temps, et la disponibilité d'un grand nombre d'outils génétiques. De plus, il a été montré que les mécanismes cellulaires découverts chez ces modèles sont conservés jusque chez l'Homme,

justifiant leur usage en recherche biomédicale. Malgré cela, l'absence d'organes similaires aux humains, telle qu'une moëlle épinière, et un nombre réduit de tissus différenciés limitent l'aspect translationnel de certaines des découvertes faites chez ces animaux [137, 138]. La souris et le rat, des mammifères, ont l'avantage d'être plus proches de l'homme et donc d'avoir une plus grande similarité dans leurs processus biologiques. Cependant, les manipulations génétiques y sont complexes et onéreuses, tant en temps qu'en argent, et les résultats peuvent souvent laisser à désirer, comme le montre les différents essais pour obtenir des souris transgéniques *TARDBP* [139].

Le poisson zébré (*Danio rerio*), a été décrit pour la première fois en 1822 par le Dr Francis Buchanan-Hamilton dans son livre "*An account of the fishes found in the river Ganges and its branches*" [140]. Ce poisson de l'infra-classe des téléostéens présente de nombreux avantages pour la recherche biomédicale, grâce à une gamme toujours croissante d'outils génétiques, permettant des approches de génétique directe [141] et inverse [142]. La puissance de ces outils repose en partie sur le fait que les poissons zébrés adultes, ayant une taille de 3 centimètres environ, peuvent être maintenus en grand nombre dans un espace réduit à peu de frais, et qu'une femelle peut engendrer chaque semaine de 50 à 100 œufs en une seule ponte, chaque œuf mesurant environ 1 millimètre, donnant lieu à un grand nombre d'individu synchronisé dans leur développement. Les œufs se développent *ex utero* rapidement, et les embryons transparents éclosent en moins de 72 heures. Le développement de marqueurs fluorescents permettant d'identifier *in vivo* des sous-populations cellulaires rendent aisé l'observation physiologique et comportementale des embryons [143, 144], permettant d'obtenir une corrélation entre l'anatomie et les comportements [145]. Ces avantages, similaires à ceux des invertébrés, sont complétés par le fait que les structures et les organes des poissons zébrés sont similaires à ceux des mammifères, quoique parfois plus simplifiés. De plus, les processus biologiques ainsi que les voies génétiques en place sont similaires à ceux développés par les mammifères [146]. Cependant, contrairement aux mammifères, les embryons exprimant des mutations létales

peuvent être étudiés sans crainte de défaut d'implantation utérine ou de survie post-éclosion, et ce pendant plusieurs jours.

Le poisson zébré est utilisé en recherche dès les années 1960-1970, entre autre en biologie développementale et cognitive [147], ou encore comme modèle d'étude par des astronautes soviétiques en mission spatiale [148]. Cependant, c'est le développement de nombreux outils génétiques et moléculaires dans les années 1980 qui permet au poisson zébré d'être reconnu comme étant un outil de recherche pertinent et efficace. Le développement de méthodes de clonage [149], de mutagénèse [150], de transgénèse [151] et de cartographie génétique [152] marquent le début de l'ère du poisson zébré comme modèle génétique d'avant-garde. Son utilisation s'est popularisée dans plusieurs domaines de recherche biomédicale tels que la recherche sur le cancer [153], sur le développement du cœur et les maladies cardiaques [154], sur l'immunité et les maladies infectieuses [155], sur le système visuel et ses maladies [156], en biologie développementale [157], sur les maladies psychiatriques [158] et enfin en neurobiologie et sur les maladies neurodégénératives [159].

Un des intérêts du poisson zébré dans les maladies telles que la SLA, qui a une forte composante motrice, est le fait que le système neuromusculaire du poisson zébré est similaire à celui des mammifères, bien que plus simplifié [160-162]. L'embryon de poisson zébré développe un circuit moteur fonctionnel tôt dans le développement, et le comportement moteur a été étudié de manière extensive et est extrêmement stéréotypé [163]. Ceci nous permet de voir l'influence que peut avoir une protéine transgénique potentiellement toxique, sur le système neuromusculaire d'embryons de poisson zébré, en laps de temps très court, soit en moins de 72 heures et souvent en seulement 24 heures.

1.3.2 Système neuromusculaire et comportement moteur des embryons

La moelle épinière, comme le tronc du poisson zébré, est séparée en une trentaine de segments nommés somites [162, 164]. Chaque somite contient un ensemble similaire de neurones, comprenant des neurones sensoriels, des interneurones et des motoneurones [165, 166]. Les motoneurones spinaux apparaissent en deux vagues, donnant lieu d'abord aux

motoneurones primaires, puis aux motoneurones secondaires. Chaque hémisegment somitique contient trois motoneurones primaires, qui naissent vers 9-10 heures post-fertilisation (hpf) [167]. La position du corps cellulaire dans l'axe rostro-caudal de chacun de ces neurones est typique et a servi à les nommer : le motoneurone situé le plus rostralement est nommé RoP pour rostral primary motoneuron (motoneurone rostral primaire) ; le motoneurone situé le plus caudalement est nommé CaP pour caudal primary motoneuron (motoneurone caudal primaire) ; et le motoneurone situé entre les deux premiers est nommé MiP pour Middle Primary motoneuron (motoneurone milieu primaire) [167]. De plus, chacun de ces motoneurones est responsable de l'innervation de structures musculaires spécifiques : le motoneurone RoP innervant le myotome intermédiaire ; le motoneurone MiP innervant le myotome dorsomédial et le motoneurone CaP innervant le myotome ventromédial [167, 168] (**Figure 3**).

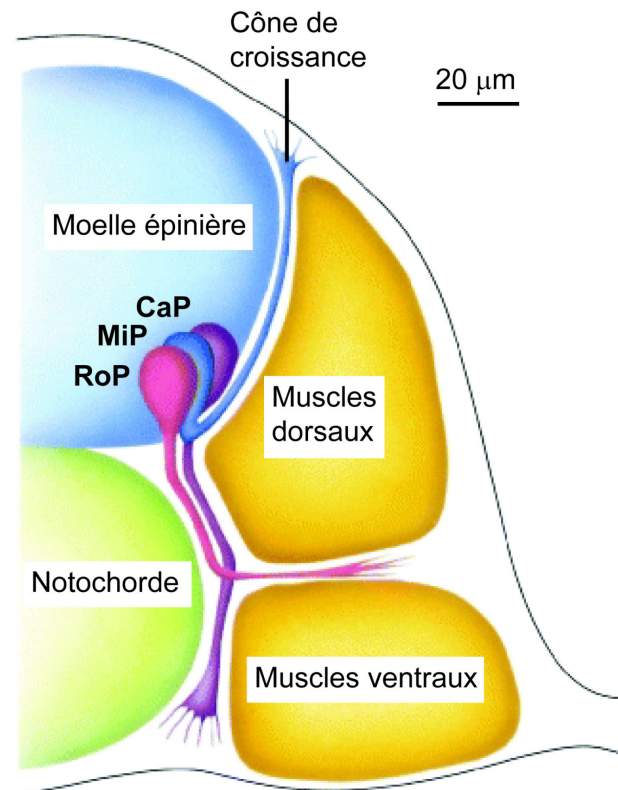


Figure 3. Coupe transversale d'embryon de poisson zébré à 19 hpf. Ce schéma montre les axones des motoneurones primaires se dirigeant vers leurs cibles respectives. Le motoneuron CaP est en violet, MiP est en bleu et RoP en rose. L'orientation est dorsale vers le haut. Échelle : 20 µm CaP : caudal primary ; MiP : middle primary ; RoP : rostral primary. (Adapté de Lodish et al., 2000; Copyright 2000 by W.H. Freeman and Company).

Les motoneurones primaires commencent leur différenciation vers 15 hpf et leurs axones rejoignent leurs cibles vers 17 hpf [168]. Les motoneurones secondaires naissent vers 14-15 hpf et commencent à étendre leurs axones vers 26 hpf [168, 169]. Environ 30 motoneurones secondaires sont présents dans chaque hémisegment, et ont un corps cellulaire plus petit et une arborisation axonale moins dense que les motoneurones primaires. Les axones des motoneurones primaires et secondaires fasciculent pour former les nerfs moteurs ventraux [168, 169]. Les premiers comportements moteurs sont observés dès que les axones de motoneurones primaires rejoignent leurs cibles et commencent à former des synapses avec les muscles, formant des jonctions neuro-musculaires dès 17 hpf [170]. Ces synapses sont cholinergiques et utilisent donc l'acétylcholine comme neurotransmetteur [171].

Entre 17 hpf et 27 hpf, trois comportements moteurs distincts apparaissent. Le premier consiste en une activité contractile spontanée, le deuxième à l'apparition de contractions en réponse à des stimuli tactiles et enfin le troisième en un comportement de nage, qui peut être activé par stimuli tactiles. L'activité spontanée commence à 17 hpf et consiste en des contractions du tronc et de la queue se propageant de manière rostro-caudale, en alternance d'un côté à l'autre de l'embryon. La fréquence maximale des contractions spontanées est de 1 Hz et est obtenue vers 19 hpf, avant de diminuer jusqu'à 0,1 Hz à 24 hpf, et résultant en l'éclosion de l'embryon vers 52 hpf [172]. La réponse au toucher se développe vers 21 hpf, et consiste alors en 1 à 3 contractions, la première toujours controlatérale au stimulus tactile, et les suivantes en alternance [172]. Enfin, vers 27-28 hpf, les épisodes de nage apparaissent, caractérisés par des contractions de haute fréquence et de basse amplitude, résultant en un déplacement vers l'avant de l'embryon déchorioné de plusieurs centimètres [172]. La fréquence de nage est d'environ 8 Hz à 28 hpf et augmente avec le développement de l'embryon jusqu'à des fréquences comprises entre 30 Hz et 70 Hz chez des embryons de 52-55 hpf [173]. L'utilisation de vidéographie à haute résolution temporelle pour observer le comportement moteur des embryons de 48 hpf à 55 hpf permet une analyse rapide et globale de l'activité motrice. L'activité étant très stéréotypée, le

moindre changement est théoriquement facilement observable et quantifiable, et peut être utilisé pour étudier des gènes liés à des maladies causant des défauts moteurs.

Le poisson zébré, comme le *C. elegans* ou la drosophile, est un modèle génétique, et non pas nécessairement un modèle de maladie, contrairement à la souris. L'objectif n'est donc pas de reproduire exactement tous les aspects d'une maladie, mais d'étudier les différents facteurs pouvant avoir un rôle dans sa physiopathologie. L'introduction d'un gène humain muté dans le génome du poisson zébré permet d'étudier comment la mutation peut causer la toxicité observée chez les humains quelles que soient les voies impliquées, et de tester s'il est possible de bloquer ou même de réverser la pathologie. Ce dernier aspect, qui concerne le criblage chimique de petites molécules *in vivo*, est une des avancées les plus intéressantes qu'a connu la recherche utilisant le poisson zébré dans les dernières années [174]. Cependant, l'utilisation de lignées transgéniques stables, plutôt que de transgéniques transitoires est recommandée pour optimiser au maximum le criblage, car ceci permet la production d'un plus grand nombre d'embryons exprimant le gène d'intérêt.

1.3.3 Transgénèse transitoire et stable

Avant d'établir des lignées de poissons zébrés transgéniques stables, il convient de vérifier que la protéine humaine que l'on souhaite étudier est fonctionnelle chez le poisson zébré. La technique de microinjection [151] est la plus utilisée pour introduire des constructions génétiques dans l'embryon de poisson zébré. Elle consiste à injecter les constructions génétiques dans le cytoplasme d'embryons au stade 1 à 8 cellules, avant que le cytoplasme de ces cellules ne referme à la 4^{ème} division cellulaire, en utilisant une aiguille et un microinjecteur. Pour vérifier que la protéine humaine est bien fonctionnelle, on utilise les techniques de génétiques directes et inverses, créant des transgéniques transitoires.

Les oligonucléotides morpholinos antisense (AMO – antisense morpholino oligonucleotide) sont des séquences synthétiques d'environ 25 paires de bases qui s'hybrident spécifiquement à la séquence d'un ARNm, causant une diminution de

l'expression de la protéine (*knockdown*) d'un gène d'intérêt [142]. Lorsqu'utilisé contre un gène du poisson zébré codant pour un orthologue humain d'intérêt, cette méthode de génétique directe permet de créer un phénotype de perte de fonction. La prochaine étape consiste à co-injecter l'ARNm de l'orthologue humain, qui n'est pas ciblé par l'AMO, chez le même embryon, pour observer si la protéine humaine est capable de sauver le phénotype obtenu par injection de l'AMO seul. Si c'est le cas, cela signifie que l'orthologue humain est fonctionnel chez le poisson zébré. L'étape suivante dans le cas de gènes dont les mutations sont responsables de pathologies humaines, est de co-injecter l'ARNm humain mutant de la protéine, au lieu de l'ARNm de type sauvage. Si les mutations ne sont pas capables de sauver le phénotype obtenu par l'AMO seul, cela indique que la mutation entraîne une perte de fonction de la protéine. Il est aussi possible de sur-exprimer l'ARNm humain de type sauvage ou muté, sans co-injecter l'AMO. Ceci permet de vérifier si les mutations peuvent avoir un gain de fonction toxique.

Cette technique a été utilisée dans le laboratoire Drapeau pour valider les mutations de gènes impliqués dans plusieurs maladies humaines [175], et en particulier pour valider trois mutations du gène *TARDBP* liées à la SLA, montrant que ces mutations causent un gain et une perte de fonction [80], et plus récemment pour valider des mutations du gène *FUS* liées à la SLA [176].

Si l'utilisation de transgéniques transitoires permet la validation des mutations, elle n'est cependant pas aussi pratique pour des études plus poussées du phénotype. En effet, il y a un risque d'avoir une expression ectopique de la protéine transgénique, dû à l'injection de l'ARNm dans le cytoplasme, rendant le phénotype observé un artefact de l'injection. L'ARNm lui-même est dégradé en quelques jours, ne permettant une observation du phénotype que durant le début du développement du poisson. De plus, un grand nombre d'embryons doivent être injectés quotidiennement, par un ou plusieurs injecteurs, causant un risque de variation des niveaux d'expression du transgène d'un groupe et d'un embryon à l'autre, due à la variation expérimentale de l'injecteur. Le développement de lignées transgéniques stables est donc une priorité, d'autant plus intéressant dans le cas d'une

maladie comme la SLA, dont les premiers signes arrivent à l'âge adulte. La transgénèse stable demande l'insertion du transgène dans le génome de l'hôte, et chez le poisson zébré, ceci est en général obtenu grâce au système de transposon *Tol2* [177].

Les transposons sont des fragments d'ADN qui peuvent se déplacer d'un locus à l'autre dans un même génome, ou dans un génome différent. Ces fragments d'ADN consistent en une séquence codant pour une transposase, flanquée de part et d'autre par des séquences inversées répétées (IR – *inverted repeats*). Les IR sont nécessaires pour la ré-insertion de la séquence dans le génome, et l'enzyme transposase est responsable de catalyser sa propre transposition. La transposase a aussi la faculté d'agir en *trans* et donc d'agir sur toutes séquences qui se trouvent être flanquées par les IR [178].

Le transposon *Tol2* a été identifié chez le Medaka en 1995 [179], et il peut non seulement s'insérer dans le génome d'un hôte de la même espèce [180], mais aussi dans le génome d'autres vertébrés, incluant le poisson zébré [181]. Chez le poisson zébré, l'efficacité de transmission du transgène à la première génération est d'environ 50% [177]. Plusieurs promoteurs ont été développés pour contrôler l'expression du gène d'intérêt, tant spatialement (promoteur cardiaque *cmlc2*, promoteur *Hb9* qui est exprimé spécifiquement dans les motoneurons et dans certains interneurons) que temporellement, grâce à des promoteurs inductifs (promoteur *hsp70*, inductif par différents stress dont le choc thermique).

1.4 Objectifs

Suite aux travaux réalisés dans notre laboratoire, permettant la validation *in vivo* de mutations liées à la SLA du gène *TARDBP* en utilisant des embryons transgéniques transitoires, et au vu des difficultés rencontrées pour développer des modèles murins transgéniques de ces mutations, nous avons décidé de générer des lignées transgéniques stables de poisson zébré exprimant le gène humain *TARDBP* de type sauvage ou muté. Ces lignées permettront sur le long terme une meilleure compréhension de la pathogénèse de la

SLA et seront utilisées pour un criblage chimique de petites molécules *in vivo*, dans l'optique de découvrir des composés modificateurs du phénotype induit par le transgène, permettant d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques.

Les objectifs de ce projet de maîtrise étaient donc :

- 1) De développer des lignées transgéniques stables de poisson zébré exprimant le gène *TARDBP* humain de type sauvage ou mutant
- 2) De reproduire à l'aide de cette lignée les résultats obtenus en utilisant les transgéniques transitoires

2. Résultats

2.1 Génération des lignées transgéniques

2.1.1 Constructions génétiques et microinjections

Deux lignées transgéniques ont été générées au laboratoire avant le début de mon projet, en utilisant le système de transposon bicistronique *Tol2*. La première lignée, *TARDBP^{WT}*, exprime le gène humain *TARDBP* de type sauvage, tandis que la deuxième lignée, *TARDBP^{G348C}*, exprime la version mutée G348C de ce gène, retrouvée chez certains patients souffrant de SLA. Dans les deux cas, 5 marqueurs peptidiques myc ont été rajoutés à l'extrémité C-terminale des protéines transgéniques pour être utilisés en immunohistochimie et immunobuvardage. L'expression des transgènes a été mise sous le contrôle du promoteur inductible de choc thermique *hsp70*, permettant de contrôler le moment du développement pendant lequel le transgène est exprimé. Chaque construction contient un deuxième gène servant de gène rapporteur, permettant d'identifier rapidement les embryons transgéniques. Le gène rapporteur *eGFP* lié au promoteur cardiaque *cmlc2* (cardiac myosin light chain 2), entraîne une expression constitutive de eGFP dans le cœur des poissons transgéniques, observable par stéréomicroscope à épifluorescence dès la 27^{ème} heure de développement des embryons (**Figure 4**).

Les constructions pDest-Tol2CG2-hsp70-TDP43-Myc (*TARDBP^{WT}*) et pDest-Tol2CG2-hsp70-TDP43-G348C-Myc (*TARDBP^{G348C}*) ont été co-injectées avec l'ARNm de la transposase Tol2 dans des embryons fertilisés, alors qu'ils étaient au stade 1 à 2 cellules. Environ 300 embryons ont été injectés avec chaque construction.

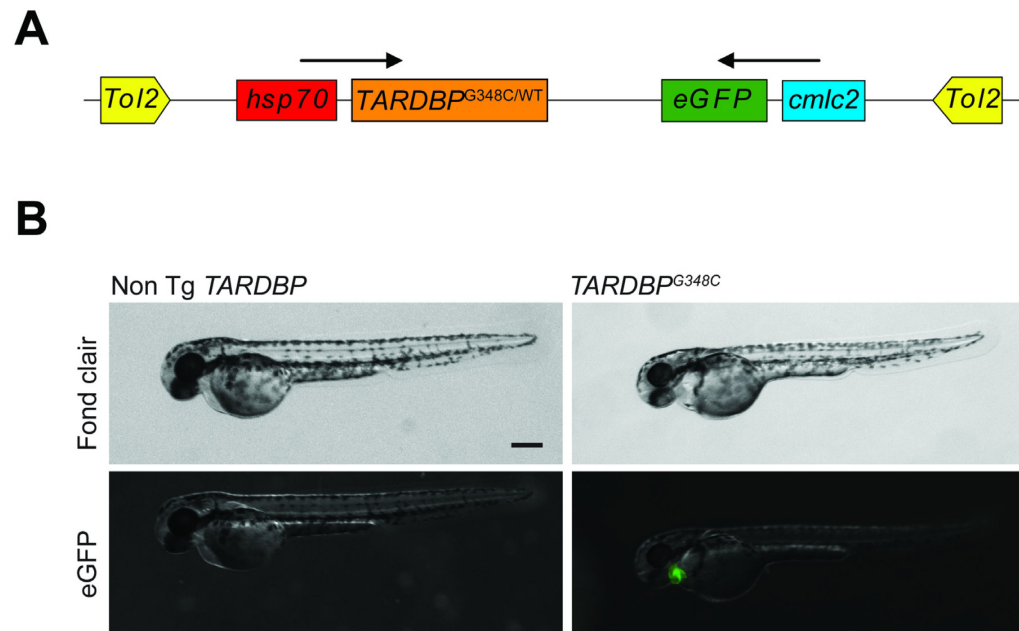


Figure 4. Constructions génétiques et expression constitutive de eGFP. (A) Construction *Tol2* co-injectée avec la transposase *Tol2*. Les gènes humains *TARDBP* de type sauvage (*TARDBP^{WT}*) ou avec la mutation G348C (*TARDBP^{G348C}*) sont liés au promoteur inductible *hsp70*. Le gène rapporteur *eGFP* est sous le contrôle du promoteur cardiaque *cmlc2*. (B) L'expression constitutive de eGFP au niveau du cœur indique la présence du transgène chez l'embryon. Échelle : 250 μ m. Tg : transgénique ; *hsp70* : heat shock promoter 70 ; WT : wild-type ; *cmlc2* : cardiac myosin light chain 2.

2.1.2 Sélection des poissons fondateurs F0

Suite aux microinjections, les embryons de 30 heures post-fertilisation (hpf) et plus ont été observés sous stéréomicroscope à épifluorescence pour détecter une fluorescence au niveau du cœur. Le gène rapporteur *eGFP* étant présent sur le même plasmide que le gène d'intérêt, la présence de fluorescence cardiaque est indicative de l'intégration des transgènes rapporteurs et par conséquent de transgènes *TARDBP* dans certaines cellules cardiaques de façon mosaïque. Ces embryons sont sélectionnés pour l'élevage, car une

mosaïcité forte dans le cœur implique une mosaïcité dans les cellules germinales, qui sera nécessaire pour générer des générations futures ayant au moins une insertion stable dans toutes les cellules somatiques. Les embryons exprimant la protéine fluorescente eGFP au niveau du cœur ont donc été sélectionnés pour former la génération F0 et élevés jusqu'à leur maturation sexuelle, survenant après environ 3-4 mois après leur naissance, soit au moment où commence mon projet.

Pour les deux lignées générées, le taux d'embryons injectés présentant un marquage fluorescent cardiaque robuste spécifique était inférieur à 40% sur les 300 embryons injectés, ne permettant la sélection que d'une centaine d'embryons par lignée. Ceux sélectionnés ont été élevés pendant 4 mois, et les poissons ayant survécu jusqu'à l'âge adulte ont été gardés dans des aquariums individuels pour pouvoir observer le taux de transmission du transgène à la génération-fille F1 pour chaque poisson.

2.1.3 Lignée mutante *TARDBP*^{G348C}

Sur la centaine d'embryons sélectionnés injectés avec le transgène *TARDBP*^{G348C}, 32 seulement ont survécu jusqu'à l'âge adulte. Cependant, toutes les cellules de ces poissons n'ont pas nécessairement intégré le transgène, ces poissons F0 sont donc mosaïques et les cellules de la lignée germinale n'expriment pas nécessairement le transgène, malgré la fluorescence cardiaque observée lors de leur développement. En conséquence, la transmission du transgène à la génération F1 ne suit pas les proportions mendéliennes. Chaque poisson adulte F0 a été croisé avec au moins trois poissons de type sauvage de sexe opposé (croisements dits de type *outcross*), pour observer la transmission du transgène à leur progéniture. Le nombre d'embryons survivants les 24 premières heures était noté, avec le pourcentage d'embryons transgéniques le cas échéant. Chaque poisson a été croisé ainsi jusqu'à obtenir une population d'en moyenne 300 à 500 embryons par poisson adulte, pour pouvoir déterminer si le transgène était transmis à la génération F1. Ceci représente environ une dizaine de croisements par poissons adultes réalisés sur une période de 4 mois.

Sur les 32 poissons adultes testés, seulement 7 ont démontré une transmission du transgène à leur progéniture, soit seulement 25% des poissons survivants. Ces 7 poissons, une femelle et six mâles, ont été identifiés comme ayant intégré le transgène dans au moins une partie de leurs cellules germinales. Cependant, les pourcentages de transmission du transgène étaient très faibles (**Tableau 1**) : la seule femelle avait un pourcentage de transmission de 0,89% (soit 3 embryons transgéniques sur 336). Les pourcentages d'embryons transgéniques pour les différents mâles étaient entre 0,78% à 29,42% (**Tableau 1**). Dus aux pourcentages obtenus, seuls les deux poissons mâles F et G ont été utilisés pour donner lieu à la génération F1 de la lignée $TARDBP^{G348C}$ et les progénitures de ces deux mâles (environ 500 embryons) ont été élevées ensemble.

Tableau 1. Pourcentage d'embryons transgéniques obtenu pour la lignée $TARDBP^{G348C}$ F0

Pourcentages de transmission du transgène de la génération F0 aux embryons F1 pour les 7 poissons fondateurs F0 $TARDBP^{G348C}$. Le nombre total d'embryon observé est indiqué entre parenthèses. Ces croisements ont été réalisés sur une période de 5 mois. ♀ indique un poisson femelle ; ♂ indique un poisson mâle.

| | $TARDBP^{G348C}$ F0 outross | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|--------------|
| | A ♀ | B ♂ | C ♂ | D ♂ | E ♂ | F ♂ | G ♂ |
| % d'embryons transgéniques | 0,89 (336) | 0,78 (510) | 0,87 (229) | 1,27 (237) | 2,77 (361) | 17,95 (468) | 29,42 (1346) |

2.1.4 Lignée de type sauvage $TARDBP^{WT}$

Seulement 30 poissons ont survécu jusqu'à l'âge adulte sur la centaine d'embryons sélectionnés pour la lignée $TARDBP^{WT}$. La même stratégie a été utilisée que pour la lignée $TARDBP^{G348C}$, permettant de sélectionner 13 poissons adultes transmettant le transgène à la

génération-fille F1, soit 43,5% des poissons survivants. Le ratio mâle/femelle est cette fois plus équilibré, avec 7 mâles pour 6 femelles. Les pourcentages restent cependant faibles, les pourcentages de transmission du transgène des 6 femelles F0 allant de 0,44% à 3.65% (**Tableau 2**) et ceux des poissons mâles de 0,79% à 23.19% (**Tableau 2**) Ces pourcentages ont encore une fois été obtenu sur environ une dizaine de croisements par poissons adultes répartis sur 5 mois.

Pour augmenter le nombre d'embryons transgéniques obtenus pour élever la génération F1, il a été décidé de réaliser des croisements entre mâles et femelles transgéniques (croisements dits de type *incross*). Comme indiqué dans le **Tableau 2**, la femelle D et le mâle K ont été croisés ensemble, donnant lieu à un pourcentage de transmission du transgène de 25% et la femelle C a été croisée avec le mâle M, donnant lieu à presque 40% d'embryons transgéniques. Les pourcentages obtenus pour ces *incross* sont plus élevés que ceux attendus, soulignant encore une fois l'absence de transmission mendélienne. Les progénitures de ces deux croisements $TARDBP^{WT}$ (environ 500 à 800 embryons) ont été élevées ensemble.

Tableau 2. Pourcentages d'embryons transgéniques obtenus pour la lignée *TARDBP^{WT}* F0

Les pourcentages de transmission du transgène de la génération F0 aux embryons F1 pour les 13 poissons fondateurs F0 *TARDBP^{WT}*. Le nombre total d'embryon observé est indiqué entre parenthèses. ♀ indique un poisson femelle ; ♂ indique un poisson mâle ; ‘x’ indique un croisement de type *incross*.

| <i>TARDBP^{WT}</i> F0 outcross | | | | | | |
|--|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|
| | A ♀ | B ♀ | C ♀ | D ♀ | E ♀ | F ♀ |
| % d'embryons transgéniques | 0,44 (225) | 0,81 (369) | 1,23 (81) | 1,30 (154) | 1,59 (377) | 3,65 (137) |

| <i>TARDBP^{WT}</i> F0 incross (suite) | | | | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| | G ♂ | H ♂ | I ♂ | J ♂ | K ♂ | L ♂ | M ♂ |
| % d'embryons transgéniques | 0,79 (126) | 2,23 (224) | 3,75 (240) | 4,38 (616) | 9,86 (213) | 10,38 (106) | 23,19 (69) |

| <i>TARDBP^{WT}</i> F0 incross | |
|---------------------------------------|-----------|
| D ♀ x K ♂ | C ♀ x M ♂ |
| | |

2.2 Génération F1

2.2.1 Premiers protocoles de choc thermique

Lorsque les poissons des générations F1 sont arrivés à l'âge adulte, la même procédure réalisée pour la génération F0 a été entreprise. Pour cette génération cependant, les croisements *outcross* donnaient environ 50% de progéniture transgénique, et les *incross* donnaient autour de 75% de progéniture transgénique, sur un total de plus de 1000 embryons (**Tableau 3**). Ces pourcentages de transmission du transgène à leur progéniture indiquent que le transgène a bien été inséré de manière stable dans le génome des poissons, qui sont présentement hétérozygotes. Les proportions mendéliennes obtenues correspondent soit à la présence d'une seule insertion du transgène dans le génome des

poissons, soit à l'insertion de plusieurs copies du transgène, toutes rapprochées autour d'un même locus.

Le transgène étant intégré de manière stable dans le génome des poissons F1, nous avons pu commencer à tester des protocoles de choc thermique sur leur progéniture. Quatre facteurs ont d'abord été considérés : 1) la température du choc ; 2) la durée du choc ; 3) l'âge des embryons et 4) le nombre de chocs thermiques. Ces premiers tests avaient pour but d'étudier les variations de ces trois facteurs, pour déterminer les extrêmes à éviter, c'est à dire les conditions n'amenant soit à aucun phénotype dans les deux lignées, soit à un phénotype toxique non spécifique (mort précoce des embryons) dans les deux lignées. Les contrôles utilisés étaient la fratrie non transgénique (absence de cœur vert) de ces lignées, ainsi que des poissons transgéniques des deux lignées ne subissant pas de choc thermique.

Due à la variabilité de la réponse des embryons aux différents choc thermiques, nous avons dû tester toutes les conditions à plusieurs reprises sur des embryons provenant de poissons F1 différents, tant de la lignée *TARDBP^{G348C}* que *TARDBP^{WT}*, représentant un travail de 9 mois. Les températures qui ont été retenues comme pouvant donner lieu à un phénotype intéressant à étudier (38°C à 39°C), ainsi que les durées du choc (30 minutes à 60 minutes) ont été établies. Les différents tests obtenus pour l'âge des embryons et le nombre de choc nécessaires ont donné lieu à des résultats variables en fonction de la température et de la durée du choc, ainsi qu'en fonction des embryons eux-mêmes. La combinaison de ces facteurs retenue pour la génération F1 était un premier choc thermique à 38,5°C de 30 minutes lorsque l'embryon est à 30%-50% épibolie (5-6 hpf), suivit par un second choc thermique à 38,5°C de 45 minutes lorsque l'embryon est âgé de 24 hpf. Ce protocole permettait de déclencher la transcription du transgène à un niveau similaire pour les deux lignées (**Figure 5A**), corrélée à une expression équivalente des protéines transgéniques pour les lignées *TARDBP^{G348C}* et *TARDBP^{WT}* comme montré par Immunobuvardage (**Figure 5B**) et immunomarquage (**Figure 5C**) anti-myc. Cependant, seule la protéine TDP-43 mutante est retrouvée clivée en un fragment de 25 kDa suite au choc thermique (**Figure 5B**). En termes de comportement moteur, les embryons de la lignée *TARDBP^{WT}* n'étaient

pas affectés par ce protocole, tandis que ceux de la lignée *TARDBP*^{G348C} développaient une nage anormale accompagnée de mortalité (données non montrées).

Cependant, la variabilité dans la réponse au choc thermique, tant entre embryons d'une même portée qu'entre embryons provenant de poissons différents était importante, indiquant qu'une sélection des poissons F1 utilisés pour élever la génération F2 était nécessaire.

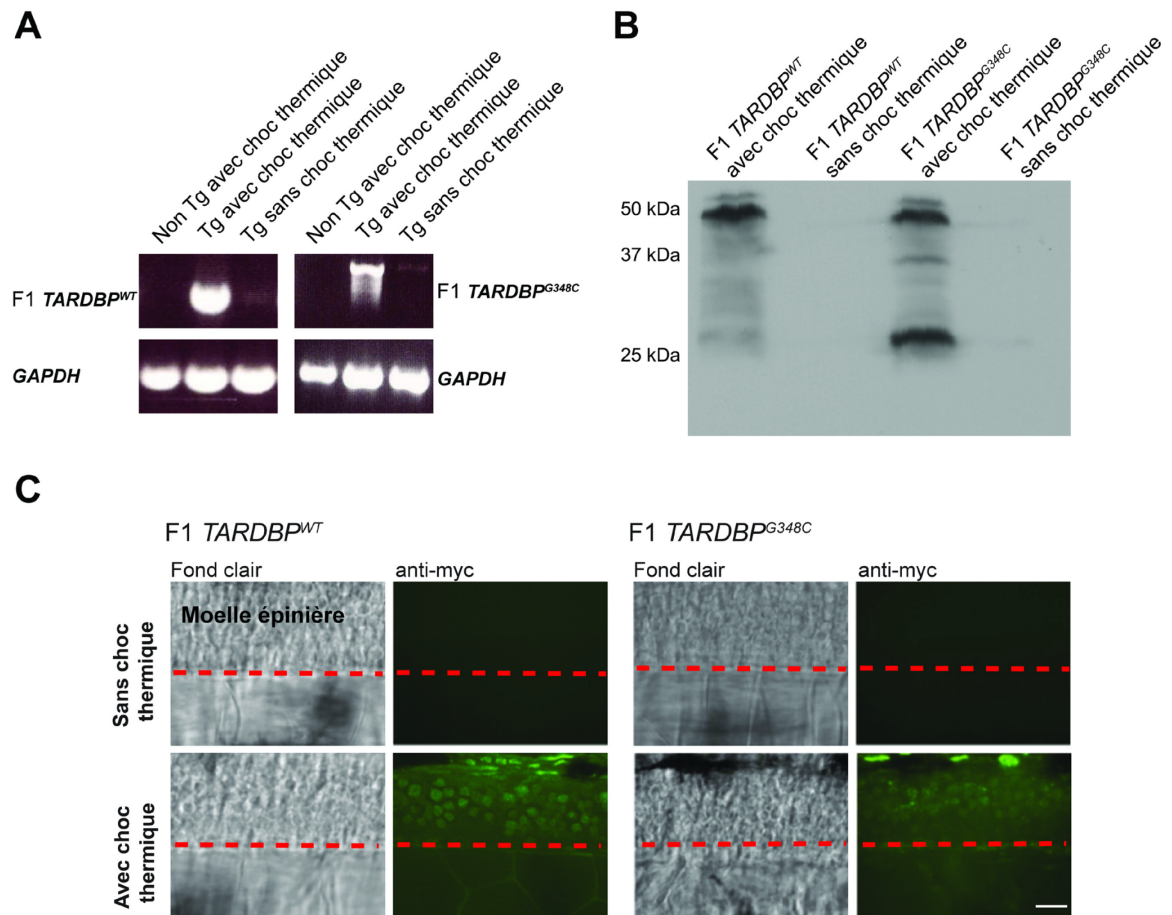


Figure 5. Expression du transgène pour les générations F1 *TARDBP*^{WT} et *TARDBP*^{G348C}. (A) RT-PCR montrant que le promoteur *hsp70* n'est pas induit en conditions normales. Suite à un choc thermique, des niveaux similaires d'ARNm sont produits pour les deux lignées *TARDBP*^{WT} et *TARDBP*^{G348C}. (B) Immunobuvardage anti-myc montrant que suite à un choc thermique, les deux lignées expriment la protéine TDP-43 de type sauvage ou mutée à des niveaux similaires lors de la génération F1. Un fragment clivé de 25 kDa n'est observé que dans la lignée *TARDBP*^{G348C}. (C) L'expression des transgènes est aussi confirmée par immunomarquage anti-myc sur embryons *whole-mount*, montrant que dans les deux lignées à la génération F1, un choc thermique déclenche l'expression ubiquitaire des transgènes, en particulier dans la moelle épinière. Échelle : 40 μ m. La ligne pointillée représente la position approximative de la partie la plus ventrale de la moelle épinière. Tg : transgénique.

2.2.2 Sélection des poissons F1

Lignée mutante *TARDBP*^{G348C}

Après avoir étudié chaque poisson adulte F1 individuel, et en fonction de leur réponse au choc thermique, nous avons choisi un poisson pour continuer la lignée et avons décidé de le croiser avec un poisson de la lignée transgénique *Hb9::GFP*, qui marque les motoneurons (et une partie des interneurons) avec une GFP membranaire, dans l'optique de pouvoir observer *in vivo* le développement des motoneurons. Ce croisement a donné un pourcentage d'embryons F2 transgéniques de 49,30% sur un total de plus de 1000 embryons (**Tableau 3**).

Lignée contrôle *TARDBP*^{WT}

Il a été décidé que la génération F2 de la lignée *TARDBP*^{WT} serait obtenue en croisant plusieurs poissons de la lignée entre eux, résultant donc d'un *incross* de plusieurs poissons entre eux. Le pourcentage d'embryons transgéniques obtenus était de 75,43% sur plus de 1000 embryons (**Tableau 3**).

Tableau 3. Pourcentages d'embryons transgéniques obtenus pour les lignées $TARDBP^{G348C}$ F1 et F2 ainsi que $TARDBP^{WT}$ F1 et F2

Les pourcentages de transmission du transgène de la génération F1 aux embryons F2 ainsi que de la génération F2 aux embryons F3 pour les lignées $TARDBP^{G348C}$ et $TARDBP^{WT}$. Le nombre total d'embryon observé est indiqué entre parenthèses indique un poisson femelle ; ♂ indique un poisson mâle ; ‘x’ indique un croisement de type *incross*.

| | $TARDBP^{G348C}$ F1 | | $TARDBP^{WT}$ F1 | | |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------|--------------------|------------------|----------------------|
| | Outcross A ♂ | Incross B ♀ x C ♂ | Incross Mélange | | |
| % d'embryons transgéniques | 49,30 (1138) | 77,50 (1773) | 75,43 (1282) | | |
| | $TARDBP^{G348C}$ F2 | | | $TARDBP^{WT}$ F2 | |
| | A ♂ | Outcross B ♂ | C ♂ | Outcross A ♀ | Incross A ♀ x B ♂ |
| % d'embryons transgéniques | 51,16 (2326) | 51,99 (1889) | 54,07 (1474) | 47,52 (949) | 71,16 (371) |

2.3 Génération F2

2.3.1 Sélection des poissons F2 $TARDBP^{G348C}$

Pour sélectionner les poissons de la génération F2 qui seront utilisés pour étudier le phénotype et lancer la génération F3, nous avons réalisé une série de 10 différents chocs thermiques sur les embryons de plusieurs poissons différents. Le choc thermique qui a été sélectionné consiste en un seul choc de 30 minutes à 38,5°C, sur des embryons de 18 hpf. Ce stade du développement a été choisi, car c'est le moment où les jonctions neuromusculaires deviennent actives. Les trois poissons sélectionnés sont ceux pour qui ce choc thermique donnait principalement des embryons ayant un phénotype moteur sans défauts morphologiques macroscopiques évidents. Ces trois poissons ont été utilisés pour

une première étude du phénotype (décrite plus loin) et pour élever la génération F3 (environ 500 à 800 embryons chaque). Chaque poisson individuel a été croisé avec des poissons de type sauvage et leur progéniture a été élevée séparément pour donner lieu à trois lignées différentes $TARDBP^{G348C}$ pour la F3 (**Tableau 3**).

2.3.2 Lignée F2 $TARDBP^{WT}$

Malgré des taux de transmission du transgène mendéliens (**Tableau 3**), la fluorescence cardiaque des embryons de la génération F2 $TARDBP^{WT}$ était très inférieure à celle de la lignée $TARDBP^{G348C}$, et cette intensité moindre était corrélée à une réduction de la quantité de protéine transgénique exprimée après le choc thermique, comme montré par Immunobuvardage (**Figure 6A**) et immunomarquage (**Figure 6B**). Le niveau d'expression du transgène étant inférieur comparé à la lignée $TARDBP^{G348C}$, nous avons lancé une génération F3 en faisant un *incross* des deux poissons ayant une intensité de fluorescence plus élevée que la moyenne (**Tableau 3**). De plus, nous sommes aussi retournés à la génération F1 et avons choisi deux couples de poissons $TARDBP^{WT}$ pour générer deux nouvelles générations F2 par *incross*, en espérant retrouver un niveau d'expression du transgène similaire à la lignée $TARDBP^{G348C}$.

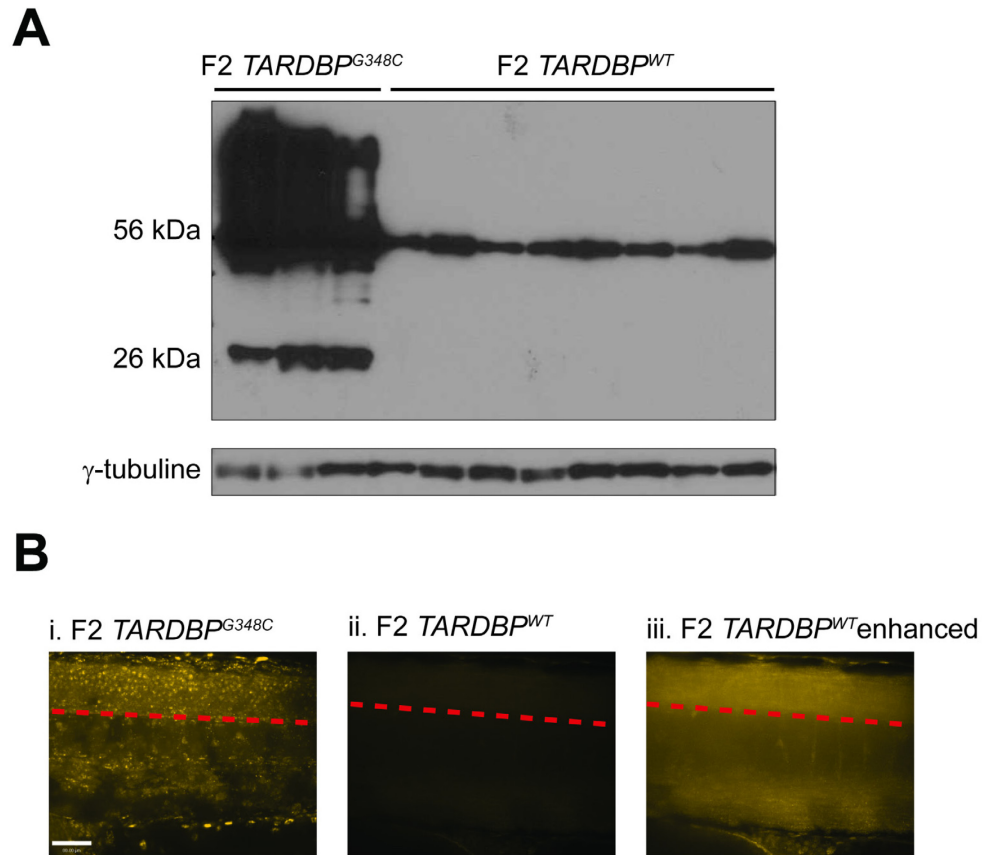


Figure 6. Expression du transgène pour les générations F2 *TARDBP*^{WT} et *TARDBP*^{G348C}. (A) Immunobuvardage anti-myc montrant l'expression du transgène à 48 hpf chez les embryons de trois poissons F2 *TARDBP*^{G348C} et 8 poissons F2 *TARDBP*^{WT} suivant un choc thermique. La membrane a été surexposée pour pouvoir avoir un marquage clair pour la lignée *TARDBP*^{WT}. (B) Immunomarquage anti-myc sur des embryons *whole-mount* de la lignée F2 *TARDBP*^{G348C} (Bi) et F2 *TARDBP*^{WT} (Bii), en utilisant le même contraste. La même image que pour (Bii) est montrée en (Biii), avec le contraste poussé au maximum (*enhanced*) pour montrer un marquage du transgène. Échelle : 80 μ m. La ligne pointillée représente la partie la plus ventrale de la moelle épinière.

2.4 Génération F3

2.4.1 Lignée mutante *TARDBP*^{G348C}

Le pourcentage de transmission du transgène des poissons individuels des trois lignées F3 *TARDBP*^{G348C} a été étudié sur 300 à 500 embryons par poissons adultes, obtenus en une dizaine de croisements (**Tableau 4**). Contrairement à ce qui a été obtenu pour les précédentes générations, le taux de transmission du transgène ne suivait pas les proportions mendéliennes pour la majorité des poissons, indiquant la présence de plusieurs copies du transgène en co-ségrégation au sein d'un même locus. Des recombinaisons génétiques au niveau des gamètes ont permis de séparer certaines de ces copies, donnant des pourcentages de transmission du transgène plus élevés que 50% (**Tableau 4**). Certains poissons donnent cependant lieu à un taux de transmission du transgène d'environ 50%, accompagné par une fluorescence cardiaque plus faible que pour les générations précédentes et les embryons des autres poissons F3. Il est possible que cela soit dû à la présence d'une seule copie du transgène. Si c'est le cas, les descendants de ces poissons auront très peu de variation du phénotype et permettront une transmission stable du transgène. Nous en sommes présentement à sélectionner ces poissons.

Tableau 4. Pourcentages d'embryons transgéniques obtenus pour la lignée *TARDBP*^{G348C} F3

Exemples de pourcentages de transmission du transgène de la génération F3 aux embryons F4 pour 6 poissons *TARDBP*^{G348C}. Le nombre total d'embryon observé est indiqué entre parenthèses. ♀ indique un poisson femelle ; ♂ indique un poisson mâle.

| | <i>TARDBP</i> ^{G348C} F3 outcross | | | | | |
|-----------------------------------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | A ♂ | B ♀ | C ♂ | D ♂ | E ♀ | F ♀ |
| % d'embryons transgéniques | 49,19 (309) | 49,54 (438) | 55,91 (440) | 56,04 (364) | 60,66 (610) | 66,93 (505) |

2.4.2 Lignée contrôle *TARDBP*^{WT}

Les poissons de la lignée *incross TARDBP*^{WT} élevés vont être étudiés individuellement pour essayer de retrouver une expression du transgène similaire à celle de la lignée *TARDBP*^{G348C}.

2.5 Analyse du phénotype des embryons de la génération F2

2.5.1 Phénotype comportemental

En utilisant le protocole de choc thermique développé pour les embryons de la génération F2, à savoir un seul choc à 38,5°C de 30 minutes lorsque les embryons ont 18 hpf, nous avons analysé le comportement moteur des embryons entre 48 et 50 hpf. La protéine mutante TDP-43 est détectée en grande quantité dès les 2 heures suivant le choc thermique, incluant la présence d'un fragment clivé de 25 kDa. L'expression de la protéine continue à augmenter dans le temps, en particulier la quantité de fragments de ~25 kDa et de ~37 kDa (**Figure 7**).

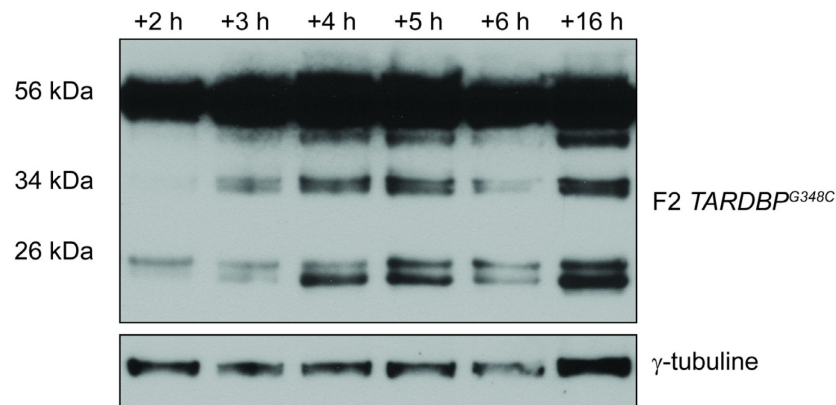


Figure 7. Expression du transgène à différents intervalles de temps, suite à un choc thermique des embryons de la lignée F2 *TARDBP*^{G348C}. Suite au choc thermique, 10 embryons ont été pris pour chaque point dans le temps, à 2 heures, 3 heures, 4 heures, 5 heures, 6 heures et 16 heures après le choc pour voir l'expression du transgène par immunobuvardage, avec un marquage anti-myc. Les points sont donnés en heures après le choc thermique.

Les embryons de la lignée *TARDBP*^{G348C} ayant subi un choc thermique montrent un comportement de nage altéré lorsque touchés au niveau de la queue avec une paire de forceps à 48 hpf (**Figure 8Ai**). Les embryons réagissent au stimulus, mais les contractions élicitées ne sont pas suffisamment fortes pour pouvoir les propulser. Ce comportement n'est pas observé pour les embryons non transgéniques de la fratrie qui ont subi le même choc thermique (**Figure 8Aii**), ni pour les embryons transgéniques *TARDBP*^{G348C} n'ayant pas subi le choc thermique (**Figure 8Aiii**). Il n'est pas non plus obtenu chez les embryons *TARDBP*^{WT} ayant subi le choc thermique (**Figure 8Aiv**), mais le niveau d'expression du transgène étant faible dans cette lignée pour la génération F2, il n'est pas possible de savoir si c'est à cause de l'effet non toxique de la protéine transgénique de type sauvage TDP-43. Les embryons transgéniques *TARDBP*^{G348C} n'ayant pas eu de choc thermique ont une réponse de nage plus vigoureuse que les embryons non-transgéniques ayant eu un choc

thermique (**Figure 8Aiii**), dû au fait que le choc thermique induit un retard d'environ 1 à 2 heures dans le développement des embryons. Le comportement obtenu par les embryons transgéniques *TARDBP*^{G348C} ayant subi le choc thermique et n'ayant pas de défauts morphologiques est défini comme étant le phénotype comportemental et touche environ 60% de ces embryons tandis que 22% des embryons sont morts avant 48 hpf, et 25% sont morphologiquement anormaux, et seulement 3% ont un comportement de nage normal (**Figure 8Bi**). Les embryons des autres conditions ne montrent aucun défaut majeur de nage (**Figure 8Bii-iv**).

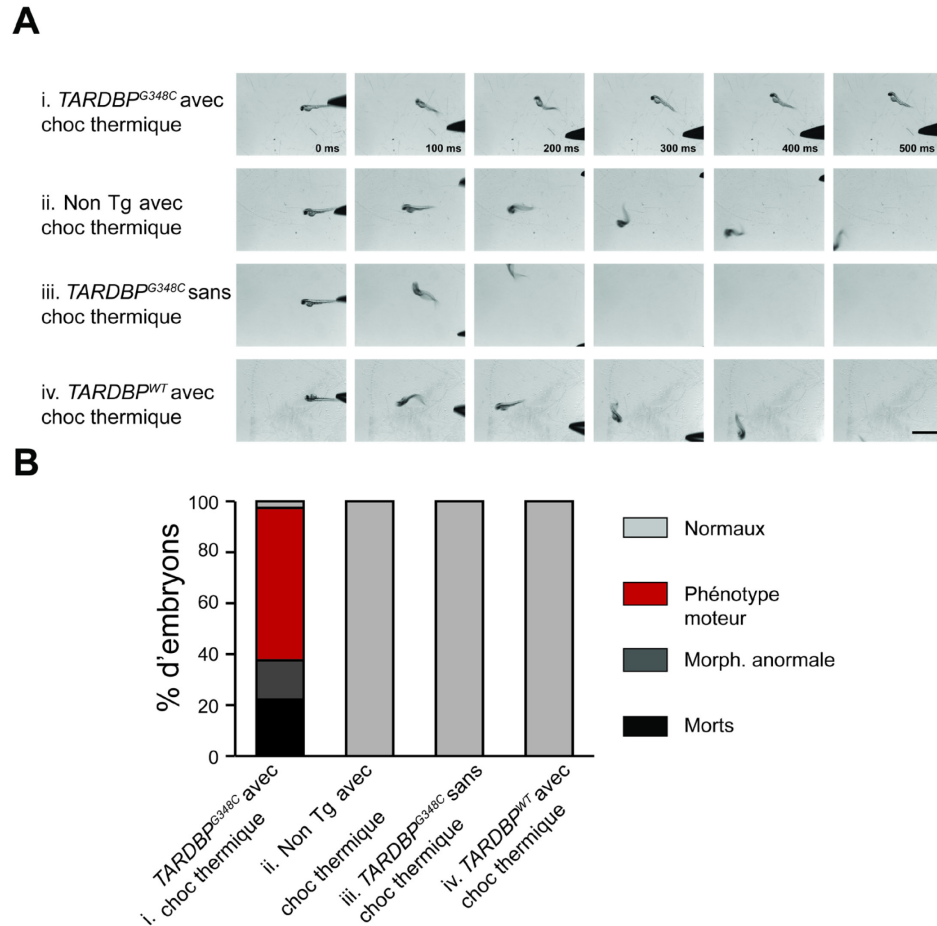


Figure 8. Comportement de nage des embryons de la génération F2 avec et sans choc thermique. (A) Suite au choc thermique, les embryons transgéniques F2 de la lignée *TARDBP*^{G348C} (Ai et Bi) ont une réponse déficiente de nage en réponse au toucher. Ils répondent au stimulus par des contractions trop faible pour les propulser efficacement. Au contraire, les embryons non transgéniques ayant subit un choc thermique (Aii et Bii), les embryons transgéniques *TARDBP*^{G348C} n'ayant pas subits de choc thermique (Aiii et Biii) et les embryons transgéniques *TARDBP*^{WT} ayant subit un choc thermique (Aiv et Biv) ont un comportement de nage normal. (B) Quantification du pourcentage d'embryons ayant un phénotype moteur dans les différentes conditions. Voir **Annexe 1** pour les données. Échelle : 3 mm. Tg : transgénique ; Morph. : morphologie.

2.5.2 Phénotype cellulaire

Étant donné le phénotype comportemental obtenu, nous avons étudié les motoneurones. Le marquage anti-SV2 (synaptic vesicle glycoprotein 2) marque les vésicules synaptiques, permettant de voir le corps cellulaire et les axones des motoneurones primaires et secondaires, ainsi que de certains interneurones.

Les motoneurones des embryons transgéniques *TARDBP*^{G348C} ayant subi un choc thermique présentent une arborisation axonale anormale. Les branchements sont surnuméraires, amenant à des branchements prématures (**Figure 9Ai et 9Bi**), comparé aux embryons non transgéniques ayant subi un choc (**Figure 9Aii et 9Bii**) et aux embryons transgéniques *TARDBP*^{G348C} n'ayant pas subi de choc thermique (**Figure 9Aiii et 9Biii**). L'arborisation est aussi normale chez les embryons transgéniques *TARDBP*^{WT} ayant subi un choc thermique (**Figure 9Aiv et 9Biv**), mais encore une fois les niveaux d'expressions du transgène étant trop bas, il n'est pas possible de tirer de conclusion. Cette morphologie anormale des axones des motoneurones est définie comme étant le phénotype cellulaire. Pour quantifier le degré d'arborisation des axones, nous avons mesuré la longueur axonale de pré-branchement, c'est-à-dire la longueur des axones composant le nerf moteur de la moelle épinière jusqu'au premier branchement principal, le tout normalisé par la hauteur dorso-ventrale de l'embryon, pour prendre en compte le retard développemental qui peut arriver suite à un choc thermique pour les poissons transgéniques et non transgéniques. Les embryons transgéniques *TARDBP*^{G348C} ayant subi un choc thermique montrent une réduction d'environ 28% de la longueur de branchement pré-axonale significative par rapport aux autres conditions (**Figure 9B**).

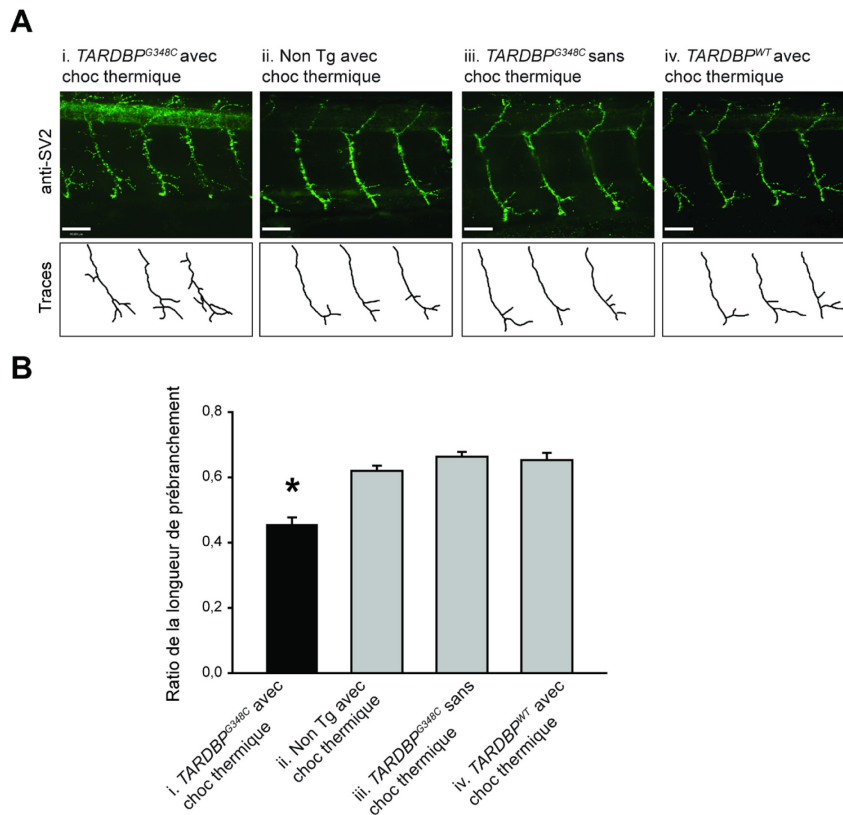


Figure 9. Morphologie des axones des motoneurones de la génération F2 avec et sans choc thermique. (A) L'immunomarquage anti-SV2 sur des embryons *whole-mount* montre qu'après un choc thermique, les embryons de la lignée F2 *TARDBP*^{G348C} (Ai et Bi) ont des axones de motoneurones anormaux, avec une arborisation surnuméraire amenant à un branchement prémature. Ce phénotype n'est pas observé chez les embryons non transgéniques ayant subi un choc thermique (Aii et Bii), les embryons transgéniques *TARDBP*^{G348C} n'ayant pas subi de choc thermique (Aiii et Biii) et les embryons transgéniques *TARDBP*^{WT} ayant subi un choc thermique (Aiv et Biv). Le panneau inférieur représente les tracés des axones des motoneurones réalisés avec NeuronJ [182]. (B) Quantification du phénotype cellulaire observé en utilisant la longueur des axones avant le premier point principal de branchement, normalisé par la hauteur dorso-ventrale de l'embryon. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne et l'astérisque (*) représente un résultat significativement différent des 3 autres conditions avec $p < 0,05$.

3. Discussion

Nous avons développé deux lignées transgéniques stables, une exprimant le gène humain de type sauvage *TARDBP* (*TARDBP^{WT}*), et l'autre exprimant la variante mutée G348C (*TARDBP^{G348C}*), retrouvée dans certains cas de sclérose latérale amyotrophique (SLA). Le transgène a été mis sous le contrôle d'un promoteur inductif *hsp70* et le gène rapporteur *eGFP* était lié à un promoteur cardiaque. Les lignées ont été développées jusqu'à la génération adulte F3. L'expression du transgène dans la lignée *TARDBP^{WT}* est faible, et nécessite de retourner aux générations précédentes pour retrouver une expression plus élevée. La lignée *TARDBP^{G348C}* exprime le transgène à un haut niveau suivant l'induction du promoteur par choc thermique. L'étude du phénotype des embryons de la génération F2 montre que l'expression de la variante G348C de TDP-43 entraîne un phénotype comportemental caractérisé par un défaut de nage des embryons, ainsi qu'un phénotype cellulaire étudié au niveau des axones des motoneurones, qui présentent une arborisation surnuméraire amenant à des branchements prématures. Ces deux phénotypes sont similaires à ceux observés précédemment dans les embryons transgéniques transitoires (Kabashi 2010).

3.1 Constructions génétiques

Le système de transposon *Tol2* est couramment utilisé pour la création de lignées transgéniques de poisson zébré. En moyenne, une dizaine de copies du transgène s'insèrent dans le génome du poisson et la transmission du transgène à la génération-fille F1 est décrite comme étant de l'ordre de 50-70% [177, 183]. Dans le cas de nos lignées, le taux de transmission de la génération F0 à la génération-fille F1 était de 25% pour la lignée *TARDBP^{G348C}* et de 43,5% pour la lignée *TARDBP^{WT}*, soit des taux inférieurs à ceux obtenus dans la littérature. De plus, ce faible pourcentage est accompagné d'un haut taux de mortalité (70%) des poissons F0 avant l'âge adulte. Il est possible que les poissons décédés soient ceux pour lesquels l'intégrité de la région où le transgène s'est inséré était nécessaire à leur survie ; il se peut également que chez ces poissons, une activation spontanée du promoteur de choc thermique ait déclenché l'expression du transgène de façon permanente,

causant leur mort prématurée. Ceci pourrait aussi expliquer l'absence de cas où le promoteur est spontanément activé au cours des différentes générations.

En plus du gène *TARDBP* humain, la construction contenait le gène codant pour la protéine eGFP liée à un promoteur cardiaque, permettant une expression constitutive de eGFP dans le cœur des embryons transgéniques, facilitant la séparation des embryons transgéniques et non-transgéniques. Le promoteur *cmlc2* utilisé semble être très spécifique, l'expression ectopique de eGFP n'ayant jamais été observée. De plus, nos observations semblent indiquer que l'intensité de la fluorescence cardiaque est proportionnelle au nombre d'insertions présentes chez l'animal et à l'intensité de la transcription du transgène. Cette hypothèse nous permet de pouvoir séparer de manière simple et rapide les poissons semblant avoir une perte d'expression du transgène. Cependant, cette hypothèse doit encore être confirmée en comparant le nombre réel d'insertions des différents poissons utilisés à l'intensité de leur fluorescence cardiaque.

La génération de ces lignées transgéniques nécessitait un système d'expression inductible tel qu'offert par le promoteur de choc thermique *hsp70* afin d'éviter l'expression constitutive de TDP-43 toxique. En effet, plusieurs études montrent une létalité précoce des animaux surexprimant la version sauvage du gène humain *TARDBP* ou l'une des versions mutées identifiées chez des patients souffrant de la SLA [122-124, 129]. L'utilisation d'un système inductible nous permet donc d'éviter cette mortalité précoce et de pouvoir élever les différentes générations de transgéniques. De plus, il nous permet de décider à quel moment le transgène est exprimé, ainsi que, dans une moindre mesure, le niveau de son expression. Au moment de la génération des lignées, le promoteur *hsp70* était le système d'induction le plus fiable. Cependant, au cours du projet, deux problèmes principaux nous sont apparus. Le premier problème survient en rapport avec le lien existant entre le rôle de TDP-43 et la réponse au stress, médiée en partie par la régulation à la hausse de la protéine *hsp70*. Il a été montré que TDP-43 participe aux processus cellulaires survenant après un stress et est entre autres retrouvé au niveau des granules de stress situées dans le cytoplasme des cellules [100-102]. Cette délocalisation du noyau vers le cytoplasme

entraîne une possible réduction des fonctions normales de la protéine du poisson zébré Tdp-43. Nous nous retrouvons donc dans une situation où, pour surexprimer la protéine humaine TDP-43 dans nos lignées transgéniques, nous devons mettre les embryons en situation de stress, modifiant potentiellement l'état physiologique basal de la protéine Tdp-43 du poisson zébré. Cependant, ceci peut jouer en notre faveur, nous permettant d'observer les effets nucléaires du transgène mutant ou de type sauvage tout en ayant une interférence réduite avec la protéine du poisson zébré.

L'autre problème rencontré est intrinsèque au promoteur *hsp70* et concerne la variabilité de la réponse au stress observée suite à un choc thermique pour la génération F2. Cette variabilité est due en partie à la variation naturelle de la réponse au stress [184], mais aussi possiblement à une variabilité dans le nombre de copies du transgène. Un nombre plus important de copies entraînerait un niveau d'expression du transgène plus élevé pour un même choc thermique, et donc un phénotype aggravé. Il est primordial de s'assurer de la stabilité et de l'uniformité des générations futures, en déterminant le nombre de copies présent dans les différents poissons porteurs et en réduisant le nombre de copies à une seule.

D'autres systèmes de promoteurs inductibles auraient pu être utilisés, comme le système d'activation transcriptionnel contrôlé par la tétracycline, une méthode par laquelle la transcription d'un gène est activée (Tet on) ou réprimée (Tet off) par la présence de la tétracycline, ou d'un dérivé de cet antibiotique tel que la doxycycline [185, 186]. Ce système d'induction est théoriquement simple à utiliser, la drogue pouvant être mise dans l'eau dans laquelle les embryons sont élevés pour activer le promoteur. De plus, ce système est réversible : il suffit de transférer les embryons dans de l'eau ne contenant pas la drogue. Cependant, l'expression basale de ce promoteur est trop élevée pour notre application. Un autre système d'induction est basé sur l'activation du récepteur œstrogène T2 par le tamoxifen/4-hydroxytamoxifen, un médicament utilisé pour traiter le cancer du sein pourrait-être utilisé [187, 188]. Cependant, bien qu'attirantes en théorie, ces deux méthodes activent la transcription du transgène par voie chimique, ce qui peut potentiellement

interférer avec les molécules qui seront utilisées lors du criblage pharmacologique prévu pour trouver des composés permettant de sauver le phénotype. Par exemple, le tamoxifen lui-même est présentement en essai clinique phase II pour la SLA (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01257581> et [189]).

Malgré son nom, le promoteur de choc thermique *hsp70* s'active en présence d'autres stress que thermiques [190]. On pourrait donc prendre avantage de cette situation et essayer d'utiliser différents types de stress pour déclencher l'expression du transgène, tels que le stress oxydatif, osmotique, ou en utilisant des métaux lourds, et observer si différents stress amènent à un phénotype différent, tant au niveau qualitatif que quantitatif.

3.2 Lignées transgéniques

Deux lignées transgéniques ont été générées, l'une exprimant le gène humain *TARDBP* de type sauvage, et l'autre le même gène mais avec la mutation G348C liée à la SLA.

Plusieurs études ont rapporté une toxicité de la protéine humaine de type sauvage lorsque fortement surexprimée chez le *C. elegans* [73, 74, 131], la drosophile [77, 78, 132-135], le poisson zébré [136] ou la souris [123-126, 130], causant en général un phénotype toxique, mais moins sévère que celui induit par les mutations de *TARDBP*. De plus, la présence anormale de la protéine TDP-43 non mutée dans les inclusions ubiquitinées cytoplasmiques de la majorité des cas de SLA [9, 10, 14, 15, 103-107] renforce la nécessité d'avoir une lignée transgénique pour le gène de type sauvage. Cependant, lors de nos études sur les transgéniques transitoires, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les poissons de type sauvage non-injectés et ceux exprimant l'ARNm *TARDBP^{WT}*, pourtant exprimé à un niveau suffisant pour sauver le phénotype de perte de fonction [80].

Le phénotype observé chez ces modèles animaux est dose-dépendant et une surexpression moins élevée de *TARDBP^{WT}* entraîne un phénotype moins sévère qu'une expression élevée du transgène. De plus, Swarup et collègues ont montré qu'à niveau d'expression équivalent entre leurs lignées *TARDBP^{WT}* et *TARDBP^{G348C}* murines, le phénotype obtenu par la lignée

de type sauvage est moins sévère que celui obtenu par l'expression de TDP-43 mutant [130]. Une représentation schématique de cette relation est possible (**Figure 10**). Ainsi, l'obtention d'un phénotype équivalent entre les lignées *TARDBP^{WT}* et *TARDBP* mutant peut être obtenu soit en ayant un niveau de surexpression de la protéine de type sauvage plus élevé que celle de la protéine mutante (et dans ce cas là le phénotype reste spécifique), soit lorsque l'expression des deux lignées est à un niveau critiquelement élevé, causant un phénotype toxique qui est probablement non spécifique. Un des intérêts d'une lignée *TARDBP^{WT}* dans le cas où l'expression des transgènes n'est pas constitutive et doit être induite par l'expérimentateur comme dans notre protocole, est de s'assurer que le phénotype observé n'est pas dû à une surexpression démesurée des transgènes, causant un phénotype généralement toxique non spécifique. La lignée *TARDBP^{WT}* lorsque dosée correctement (avec une expression équivalente ou supérieure à celle de la lignée mutante) peut donc nous servir de témoin, pour s'assurer que la surexpression induite par nos protocoles de choc thermiques ne soit pas trop excessive. De plus, on peut imaginer une situation où l'on réussirait à avoir un phénotype dans la lignée mutante mais pas dans la lignée *TARDBP^{WT}*, permettant d'avoir une surexpression minimale du transgène tout en causant un phénotype spécifique, comme avec nos protocoles d'expression transitoire.

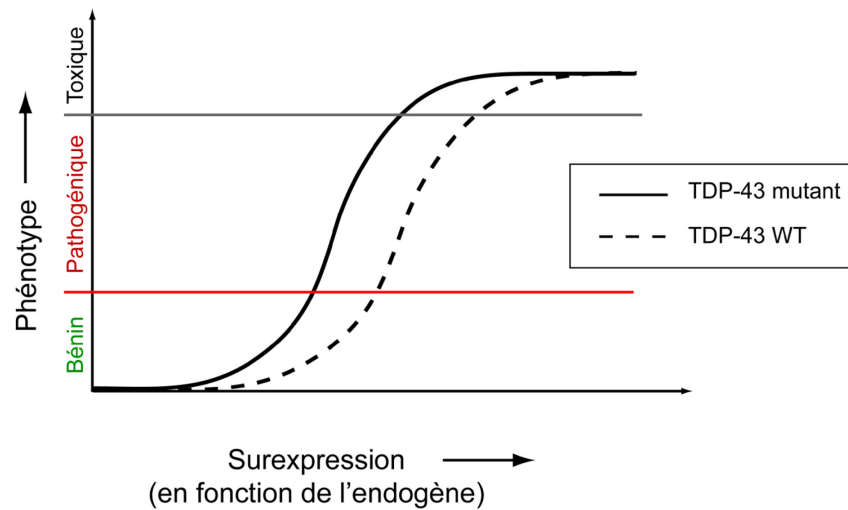


Figure 10. Représentation schématique du phénotype obtenu en fonction de la surexpression des protéines TDP-43 mutantes et de type sauvage. (Schéma adapté de Wegorzewska et Baloh, 2010 [191]).

Cependant, pour pouvoir jouer ce rôle de témoin, il faut que les deux lignées aient un niveau comparable d'expression du transgène, ce qui n'est plus notre cas dès la génération F2, tant au niveau de l'intensité de la fluorescence cardiaque qu'au niveau de l'expression protéique obtenue par Immunobuvardage. Cette "perte" du transgène reste encore à être expliquée, mais il est probable qu'elle vienne en partie du fait que des poissons porteurs de la lignée *TARDBP^{WT}* n'aient pas été sélectionnés en F1, comme nous l'avons fait avec la lignée *TARDBP^{G348C}*. Pour tenter de rétablir un niveau d'expression similaire dans les deux lignées, plusieurs stratégies ont été mises en place ces derniers mois. La première consistait à essayer d'augmenter le nombre de copies présents dans la génération F3 en réalisant un *incross* de deux poissons de la génération F2. Les poissons F3 de cette génération *TARDBP^{WT}* ainsi que ceux de la lignée *TARDBP^{G348C}* seront croisés individuellement avec des poissons de type sauvage et les embryons ainsi obtenus subiront un choc thermique en vu de comparer entre les deux lignées l'expression des protéines transgéniques par

Immunobuvardage. L'idée étant par la suite de sélectionner les poissons des deux lignées ayant un niveau d'expression similaire pour la suite du projet. Cependant, dans le cas où les niveaux d'expressions des poissons de la lignée *TARDBP^{WT}* restent faibles malgré le croisement *incross*, nous avons déjà mis en place une deuxième stratégie : nous sommes retournés aux poissons de la génération F1 et avons croisé deux couples de la lignée *TARDBP^{WT}* pour obtenir deux nouvelles générations F2 ayant potentiellement un niveau d'expression plus élevé que la génération F2 actuelle et auront des niveaux d'expression du transgène similaire à ceux de la lignée *TARDBP^{G348C}*. Enfin, dans le cas où cette deuxième stratégie ne fonctionne pas, nous retournerons à l'étape de microinjection et recommencerons la lignée du début.

Au sein des transgéniques *TARDBP^{G348C}*, une variabilité intra- et inter-lignée est observée par rapport à l'intensité de la fluorescence cardiaque et à la réponse au choc thermique. Ces variations proviennent probablement d'une différence dans le nombre de copies du transgène et/ou de l'influence de la région génique d'insertion du transgène. Dès la génération F1, le pourcentage d'embryons transgéniques obtenus pour chaque poisson adulte est d'environ 50%, soit un ratio mendélien pour une insertion unique. Cependant, des résultats préliminaires obtenus avec la génération F3, où un taux de transmission du transgène supérieur à 50% est observé pour certains poissons, semblent indiquer la présence de plusieurs copies en déséquilibre de liaison, c'est-à-dire regroupées dans une même région du génome. Plus les copies sont rapprochées entre elles, plus la possibilité de recombinaison est réduite, et les copies sont transmises ensemble à la génération suivante. C'est donc cette co-ségrégation des copies qui serait responsable du taux de 50% de progéniture transgénique avant la génération F3. Ces résultats soulignent l'importance d'identifier le nombre de copies présentes chez les poissons porteurs en utilisant les techniques de PCR quantitative ou de Southern blot.

Une autre décision prise pour la lignée *TARDBP^{G348C}* a été de croiser la génération F1 avec la lignée *Hb9::GFP* dont les motoneurones et une sous population d'interneurones expriment une GFP membranaire, permettant de suivre *in vivo* le développement des

motoneurones, en particulier de l'arborisation axonale. Bien qu'utile pour étudier le phénotype axonal *in vivo*, la décision de générer la génération F2 à partir de ces transgéniques s'est révélée ne pas être idéale. Si les poissons *Hb9::GFP* hétérozygotes ne posent normalement pas de problèmes, les poissons homozygotes de cette lignée dans un contexte sauvage sont toxiques pour les motoneurones [192]. Dans le cas de la génération F2 de la lignée *TARDBP^{G348C}*, les poissons étaient hétérozygotes pour le gène *Hb9::GFP*. Cependant, le risque que la présence de la GFP membranaire dans des motoneurones déjà fragilisés par la présence de la protéine TDP-43 humaine mutante n'aggrave le phénotype comparé aux embryons n'exprimant pas la GFP membranaire n'est pas à négliger. Pour éviter de rajouter une autre source de variation dans les résultats, nous avons uniquement choisi des poissons n'exprimant pas la GFP dans les motoneurones pour élever la génération F3.

3.3 Phénotype de la génération F2

Plusieurs lignées transgéniques de poissons zébrés utilisant le promoteur *hsp70* ont été publiées [193-195]. Dans la majorité des cas, le choc thermique ayant pour seul but de promouvoir la transcription d'une protéine fluorescente servant de marqueur, l'intensité de l'expression et donc du choc thermique importe peu et un simple choc de 45-60 minutes à 37°C est donc généralement suffisant [193, 194]. Cependant, dans notre cas, le phénotype observé dépend principalement du protocole de choc thermique utilisé. Plus le protocole est agressif, plus la transcription est forte et l'expression du transgène élevée, plus le phénotype *TARDBP^{G348C}* sera sévère et potentiellement létal plus que paralysant. Dès la génération F0, des tests de différents protocoles de choc thermique ont été essayés sur les embryons, pour trouver un protocole suffisamment puissant pour donner un phénotype spécifique au niveau des motoneurones, sans être trop agressif, pour éviter qu'une expression trop élevée du transgène n'amène à un phénotype non spécifique lié à une toxicité générale et entraînant une mort précoce des embryons. Une autre difficulté pour établir un protocole de choc thermique efficace réside dans la variabilité encore présente tant au niveau du nombre de copies que de leur lieu d'insertion, non seulement entre les

embryons obtenus à partir d'un même poisson porteur, qu'entre ces embryons et ceux obtenus et à partir de poissons porteurs différents. Cependant, ces variabilités se réduisent de génération en génération.

Les différents tests de choc thermique jouant tant sur la durée du choc que sur la température et l'âge des embryons et réalisés sur les embryons d'une dizaine de poissons adultes F2 *TARDBP*^{G348C}, ont permis d'identifier un protocole de choc thermique efficace qui conduit à un phénotype similaire pour trois différents poissons porteurs de la génération F2. Cependant, nous pouvons supposer que le gradient observé dans le phénotype est lié à la différence du nombre de copies du transgène entre les embryons d'une même portée. Ainsi, nous observons 40% des embryons pour qui le choc thermique est soit létal, soit résulte en une toxicité générale amenant à des anomalies morphologiques ainsi qu'à une mort précoce. Une faible minorité d'embryons de la lignée *TARDBP*^{G348C} semble ne pas être affectée par le choc thermique, tandis qu'environ 60% des embryons transgéniques ont un comportement moteur réduit, avec un phénotype axonal consistant en une arborisation surnuméraire qui est caractérisée en mesurant la longueur du segment axonal précédent le premier branchement principal. Ce phénotype moteur et cellulaire est similaire à celui observé en utilisant les transgéniques transitoires [80, 176]. Dans ce modèle, le pourcentage d'embryons ayant un phénotype est de 54%-57%, tandis que 24%-28% des embryons sont normaux et 15%-22% sont morphologiquement anormaux et/ou ont une mortalité précoce [80, 176]. Ces résultats chez les transgéniques transitoires s'expliquent par le fait que les injections d'ARNm sont variables, et n'affectent pas de la même façon tous les embryons. De plus, le seul fait d'injecter un colorant (*sham injections*) résulte en une mortalité de 10% [176]. Pour la lignée stable *TARDBP*^{G348C}, si l'on observe un taux plus ou moins similaire de 60% ayant un phénotype, virtuellement tous les autres embryons sont morphologiquement anormaux (~15%) et/ou morts (~22%). Cette apparente variabilité de la réponse à l'expression du transgène mutant dans la lignée stable semble indiquer un spectre phénotypique continu. Une autre explication serait que ces différences soient dues à un nombre variable de copies du transgène entre les embryons, amenant à un niveau d'expression différent de la protéine mutante entre ces catégories. Ainsi, les 37%

d'embryons morphologiquement anormaux/morts auraient un plus grand nombre de copies du transgène et donc des niveaux d'expression du transgène trop élevés (les 22% d'embryons morts plus encore que les 15% d'embryons morphologiquement anormaux), amenant à une létalité due à une toxicité non-spécifique générale du transgène. Les 60% d'embryons montrant un phénotype auraient un nombre de copies plus réduit, et donc un niveau d'expression du transgène moins élevé, entraînant un phénotype plus spécifique (**Figure 10**). La méthode utilisée pour étudier le phénotype moteur (présence ou absence de nage) ne permet pas d'étudier en détail les variations de phénotype dans ces 60% d'embryons, mais il est possible que des différences soient observées. Une nouvelle méthode développée au laboratoire et décrite dans la prochaine section nous permettra d'étudier ces fines variations du phénotype.

En accord avec cette explication, des données préliminaires obtenues sur la génération F3 *TARDBP^{G348C}* et non incluses dans ce mémoire, montrent un taux de transmission du transgène aux embryons pouvant aller jusqu'à 70%, indiquant la présence de plusieurs copies du transgène en déséquilibre de liaison. D'autres poissons ont un taux de transmission de 50%, et leur progéniture à une fluorescence cardiaque uniformément plus faible que pour la génération précédente, indiquant une perte de copies du transgène. Un choc thermique sur ces embryons entraîne une plus grande uniformité du phénotype, et une réduction drastique du nombre d'embryons morphologiquement anormaux et/ou morts. Ces derniers résultats optimistes laissent à penser que d'ici une à deux générations, la lignée *TARDBP^{G348C}* sera stable et uniforme et pourra être utilisée pour nos études futures.

3.4 Caractérisations futures des lignées

Avant de pouvoir passer aux étapes suivantes, il importe de regagner un niveau d'expression similaire entre les lignées *TARDBP^{WT}* et *TARDBP^{G348C}* et de caractériser plus en détail le phénotype en utilisant des poissons montrant un phénotype stable et uniforme.

Parmi les caractérisations qui doivent être faites, une des plus importantes pour le criblage pharmacologique consiste en une meilleure quantification du phénotype moteur.

Une méthode adaptée récemment au laboratoire permet d'obtenir de manière objective des paramètres du comportement natatoire des embryons, tels que la distance de nage, la durée de nage et la vitesse moyenne et maximale atteinte. Ainsi, on peut étudier comment l'expression de TDP-43 mutée modifie ces paramètres et s'ils peuvent être rétablis aux valeurs normales par un composé lors du criblage pharmacologique. Un des avantages indéniables que cette technique amène, comparée à l'étude binaire du phénotype réalisée dans ce mémoire (présence ou absence d'un comportement de nage "normale") est la caractérisation possible d'un phénotype intermédiaire, obtenu pour la lignée *TARDBP^{WT}* par exemple, ou bien par un sauvetage partiel du phénotype de la lignée *TARDBP^{G348C}* par un composé lors du criblage. De plus, une fois que les lignées seront stables, une étude du phénotype au niveau électrophysiologique pourra être réalisée pour étudier si le défaut menant au phénotype moteur se trouve au niveau musculaire, au niveau du motoneurone, ou bien de la jonction neuromusculaire. Une étude similaire des poissons transgéniques transitoires est présentement en cours de réalisation par Gary Armstrong, qui a montré la présence d'une déficience neuromusculaire due à une diminution de l'activité présynaptique [196], tel qu'observée chez la souris SOD1 de façon pré-clinique [197]. L'étude de ce phénotype peut être plus importante que celui de la mort cellulaire pour l'établissement de nouvelles thérapeutiques.

Le phénotype cellulaire des motoneurons nécessite aussi une caractérisation plus approfondie. Le marquage SV2 marque sans distinction les trois motoneurons primaires ainsi que les motoneurons secondaires, ne permettant pas d'individualiser l'axone d'un seul motoneurone, rendant l'identification des branches principales hasardeuse, en particulier dû au fait que l'axone du motoneurone RoP quitte le faisceau au niveau du myoseptum horizontal. La méthode qui permettra de résoudre ce problème et de répondre au plus grand nombre de questions consiste à utiliser la technique de transplantation [198]. En utilisant la lignée *Hb9::GFP* pour identifier les motoneurons donneurs, on peut transplanter des précurseurs des motoneurons des lignées *TARDBP* au stade blastula dans un embryon hôte de type sauvage. Seuls quelques neurones exprimeront la GFP, permettant d'imager l'arborisation complète de l'axone d'un seul motoneurone et d'identifier comment

l'expression de TDP-43 mutant modifie la morphologie générale. Un avantage supplémentaire de cette technique est qu'elle permet de répondre à la question concernant le caractère cellulaire autonome ou non du phénotype : comment se comportera un motoneurone exprimant la protéine mutée dans le contexte d'un embryon sain ? Inversement, comment se comportera un motoneurone sain dans le contexte d'un embryon exprimant la protéine mutante ? Ces questions ont été adressées chez des souris transgéniques exprimant la protéine SOD1 humaine mutante [54]. En utilisant des promoteurs permettant d'exprimer la protéine spécifiquement dans des sous-populations cellulaires, il a été démontré que la toxicité induite par les mutants SOD1 n'est pas autonome du point de vue de la cellule (*non cell-autonomous*). La participation de plusieurs types de cellules à la pathologie a été déterminée, la toxicité dans les motoneurons seuls étant responsable du moment de l'apparition des premiers symptômes et du déroulement du début de la maladie, tandis que l'expression de la protéine mutante dans les astrocytes ou les cellules microgliales accélère la progression de la maladie sans en changer le début. Il est intéressant de noter que l'expression de SOD1 mutant dans les cellules musculaires n'affecte ni le début, ni le déroulement de la maladie. Nos lignées de poissons zébrés pourraient permettre d'apporter le même type de réponse pour la pathologie de la SLA liée au gène *TARDBP*.

Enfin, d'autres caractérisations qui n'ont pas encore été abordées pourront être entreprises, entre autre étudier si d'autres types cellulaires sont affectés par l'expression des transgènes. Chez les patients SLA, les fonctions sensorielles et autonomes sont épargnées [1] ainsi que les fonctions cognitives chez la majorité des patients. Cependant, environ 15% des patients SLA souffrent aussi de démence fronto-temporale, présentant une atrophie du cortex préfrontal [34], et certaines mutations de *TARDBP* peuvent entraîner une démence fronto-temporale sans signes moteurs [199] ; il serait intéressant de savoir si ces caractéristiques sont reproduites dans nos lignées et si le phénotype que l'on obtient est réellement spécifiquement moteur. Une autre caractéristique de TDP-43 dans la SLA est la translocation de la protéine habituellement nucléaire, dans le cytoplasme des motoneurons et sa présence dans des inclusions cytoplasmiques [9, 10, 14, 15, 103-107]. Il sera

intéressant de regarder si la localisation sous-cellulaire de TDP-43 est aussi altérée dans nos lignées transgéniques. Finalement, TDP-43 étant impliqué dans la réponse au stress [100-102] et notre méthode d'activation de la transcription passant par un stress, il sera intéressant de regarder comment différents types de stress modifient la présentation du phénotype, ainsi que le comportement de TDP-43 dans les motoneurones : la protéine transgénique s'associe-t-elle aux granules de stress [102], la réponse au stress est-elle perturbée ? Une façon de répondre à cette dernière question est de déterminer la quantité des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS *Reactive oxygen species*), une méthode qui est établie pour le poisson zébré [200, 201].

3.5 Pertinence pour la SLA et utilisations futures des lignées

On peut se demander s'il est pertinent d'utiliser des embryons de poisson pour étudier une maladie humaine affectant des patients adultes. Les lignées que nous avons développées sont des modèles génétiques de la SLA. Nous ne visons pas à reproduire avec exactitude toutes les caractéristiques retrouvées chez les patients, bien que dans nos différents modèles de poisson zébré pour la SLA nous en observons quelques attributs, tel que la présence de fragments clivés de 25 et 37 kDa et une augmentation de branchements axonaux. Cette augmentation des branchements axonaux est aussi présente chez nos modèles de transgéniques transitoires, et est similaire au phénotype de *die-back* des motoneurones observé chez les souris SOD1 et qui arrive tôt dans la pathologie [197]. Dans les modèles transitoires, nous observons aussi la mort des motoneurones lorsque mis en présence de stress intensif comme le NMDA, un analogue du glutamate qui surexcite les circuits moteurs [196]. Nous souhaitons étudier les gènes impliqués dans la maladie et comprendre comment les mutations des gènes modifient leurs fonctions normales et mènent aux dysfonctionnements des motoneurones observés chez les patients souffrant de SLA. Les embryons de poissons zébrés, de par leur facilité de manipulation génétique, leur comportement moteur stéréotypé et le grand nombre d'individus disponibles en une seule ponte, nous offrent la possibilité de répondre à certaines questions que les modèles classiques effectués chez des mammifères ne peuvent adresser. Ces lignées ont été créées

avec deux buts principaux : approfondir les connaissances sur la pathogénèse de la SLA liée aux mutations de *TARDBP*, et utiliser la méthode de criblage pharmacologique pour trouver de nouvelles ouvertures thérapeutiques.

Dans une publication récente [176], nous avons montré *in vivo* la pathogénicité de mutations de *FUS* associées à la SLA, en utilisant des embryons transgéniques transitoires. Dans cette même publication, et toujours en utilisant des transgéniques transitoires, nous avons établi un premier lien génétique entre *TARDBP* et *FUS*, en déterminant que *FUS* agit en aval de TDP-43, tout en déterminant que *SOD1* opère dans une voie indépendante [176]. La relation d'amont et d'aval entre *TARDBP* et *FUS* a aussi été obtenue dans un modèle de drosophile [202]. Les lignées *TARDBP* ainsi que les lignées *FUS* que nous sommes présentement en train de développer au laboratoire vont servir de base pour étudier les interactions génétiques entre les divers gènes impliqués dans la SLA, tels que *FUS* [16, 17] *UBQLN2* [18], *C9ORF72* [19, 20], angiogenin [47, 48] ou valosin-containing protein [53]. Les défauts biochimiques des mutations de ces gènes ne sont pas connus, et les modèles *in vivo* sont pour le moment les seules mesures du phénotype. Utilisant nos lignées transgéniques comme background, l'orthologue poisson zébré de ces gènes sera réprimé par AMO, et l'ARNm de type sauvage ou muté de ces gènes sera surexprimé dans les embryons de nos lignées transgéniques. Le phénotype obtenu sera observé, et nous donnera une indication de l'interaction de ces gènes entre eux. L'étude de ces interactions génétiques permettra d'établir le réseau génétique impliqué dans la SLA et de comprendre comment des mutations dans ces différents gènes, certains impliqués dans des processus complètement différents les uns des autres, peuvent amener à la même maladie.

L'avantage principal de ces lignées transgéniques de poisson zébré repose sur la possibilité d'utiliser la méthode de criblage pharmacologique [174]. À cause de l'hétérogénéité des étiologies de la SLA et du fait que 90% des cas soient sporadiques, les recherches effectuées ces dernières années n'ont toujours pas permis de trouver un traitement plus efficace que le riluzole, dont la découverte remonte à 1996 [8] et qui ne prolonge la vie que de quelques mois. Plutôt que de se baser sur les informations apportées par les avancées en

physiopathologie de la SLA pour trouver un médicament qui pourrait convenir, nous proposons de tester le plus grand nombre possible de molécules pour voir lesquelles peuvent améliorer le phénotype de nos lignées. Les composés positifs pourront être étudiés plus en détails et en combinaison les uns avec les autres, pour tester si un de leur dérivé peut avoir un effet plus potent. En commençant avec des composés déjà approuvés par la FDA, les molécules potentielles pourront rapidement être testées en essais cliniques, accélérant la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Une dernière note peut être faite sur l'utilisation de ces lignées. Le fait que l'expression du transgène soit inductible pourrait nous permettre d'utiliser ces lignées pour essayer de modeler une pathologie de la SLA plus proche de celle développée chez l'homme. Nous pourrions par exemple développer un protocole où des chocs, thermiques ou autre, de force moindre seraient réalisés de manière hebdomadaire pendant toute la durée de vie du poisson. Ces chocs seraient suffisamment faibles pour ne pas entraîner un phénotype dû à une trop grande surexpression ponctuelle du transgène, mais causeraient malgré tout une accumulation progressive de la protéine mutante. Il est alors possible que passé un certain seuil, cette accumulation entraînerait une pathologie chez le poisson adulte, qui pourrait être similaire au développement de la SLA chez l'homme. Cette expérience, qui est intellectuellement très intéressante, demande un grand temps de préparation, en plus d'être de longue durée, un poisson zébré adulte pouvant être gardé en laboratoire deux ans. Entre temps, le phénotype obtenu chez les embryons peut continuer à être exploité.

4. Conclusion

Lors de cette maîtrise, deux lignées transgéniques de poisson zébré ont été développées, exprimant le gène humain *TARDBP* de type sauvage (*TARDBP^{WT}*) ou mutant (*TARDBP^{G348C}*) sous contrôle d'un promoteur de choc thermique. Une grande partie du travail réalisé consistait à établir la transmission du transgène d'une génération à l'autre et d'établir un protocole adéquat de choc thermique, permettant une expression stable et ubiquitaire du transgène. Lors de ces étapes, longues de plusieurs mois, l'expression du transgène de la lignée *TARDBP^{WT}* s'est perdue, et la prochaine étape du projet consiste à retrouver un niveau d'expression similaire à celui de la *TARDBP^{G348C}*. L'expression du transgène dans la lignée *TARDBP^{G348C}* avec le protocole de choc thermique établi entraîne un phénotype moteur, similaire à celui observé avec des modèles d'expression transitoire [80], avec 60% d'embryons transgéniques ayant un défaut de nage, et une réduction de 28% dans la longueur de pré-branchement des axones des motoneurones.

Cette maîtrise a permis d'établir les bases pour une étude génétique de la sclérose latérale amyotrophique en utilisant le poisson zébré. Ces lignées sont des outils qui pourront être utilisées non seulement pour obtenir une meilleure compréhension des défauts biochimiques des mutations du gène *TARDBP* et de la pathogénèse de la SLA, mais aussi pour étudier les réseaux génétiques de la SLA et trouver de nouvelles voies thérapeutiques en utilisant un système de criblage *in vivo* de petites molécules. Ces lignées ont donc un grand potentiel comme modèles génétiques *in vivo* de la SLA.

5. Matériel et méthodes

5.1 Maintien des poissons zébrés

Les poissons zébrés (*Danio rerio*) étaient maintenus à 28°C dans des aquariums d'eau douce filtrée, dans une salle ayant un cycle nuit-jour de 12 heures. La veille du jour où des embryons étaient nécessaires, les poissons adultes des lignées transgéniques *TARDBP^{WT}* et/ou *TARDBP^{G348C}* étaient mis dans des aquariums de reproduction avec des poissons de sexe opposé, soit de la même lignée transgénique (*incross*), soit de type sauvage (*outcross*), soit de la lignée *Hb9::GFP*, et gardés séparés jusqu'au lendemain matin. À l'allumage des lumières de la salle au matin, les séparateurs étaient enlevés et les poissons étaient laissés en contact jusqu'à la production d'œufs. Les embryons étaient alors récoltés et les poissons adultes séparés et remis dans leurs aquariums respectifs.

Les embryons récoltés étaient conservés à 28,5°C dans de l'eau du système contenant 0,02% de bleu de méthylène, jusqu'au premier choc thermique. Ils étaient ensuite gardés dans de l'eau sans bleu de méthylène. Les embryons gardés pour élevage des nouvelles générations étaient transférés dans des aquariums appropriés vers 5 à 7 jours post fertilisation et nourris selon les recommandations de *The Zebrafish Book* (Westerfield, 2000).

Toutes les manipulations ont été réalisées conformément aux normes du code de déontologie des études sur les animaux (CDEA) de l'Université de Montréal.

5.2 Constructions génétiques et transgénèse

Les plasmides pCS2-TDP43-Myc et pCS2-TDP43-G348C-Myc ont généreusement été fournis par Guy Rouleau (Université de Montréal), contenant respectivement le gène humain *TARDBP* de type sauvage et *TARDBP* arborant la mutation G348C liée à la SLA. Cinq séquences codant pour le marqueur peptidique myc ont été rajoutées à l'extrémité 3'. Le protocole fourni par le Tol2Kit (Kwan et al., 2007) a été utilisé pour former les vecteurs pDest-Tol2CG2-hsp70-TDP43-Myc et pDest-Tol2CG2-hsp70-TDP-43-G348C-Myc.

La solution d'injection pour les deux vecteurs pDest-Tol2CG2-hsp70-TDP43-Myc, et pDest-Tol2CG2-hsp70-TDP-43-G348C-Myc contenait 25 ng/ul d'ADN, 25 ng/ul de l'ARN de la transposase Tol2 et 0,05% de Fast Green (Sigma). La solution était placée par capillarité dans des aiguilles formées à partir de capillaires de borosilicate à épaisseur fine (Sutter Instrument, Novato, CA, États-Unis) et injectée dans les cellules en utilisant un injecteur à pression Picospritzer III (General Valve, Fairfield, NJ, États-Unis).

5.4 Sélection des poissons fondateurs et progéniture

5.4.1 Sélection des poissons fondateurs

Les embryons injectés avec les constructions génétiques pDest-Tol2CG2-hsp70-TDP43-Myc et pDest-Tol2CG2-hsp70-TDP43-G348C-Myc ont été examinés après 27 heures post-fertilisation (hpf) en utilisant le stéréomicroscope à épifluorescence Olympus SZX7. Seulement les embryons exprimant une fluorescence aisément observable de la protéine eGFP dans le cœur ont été sélectionnés et élevés comme poissons fondateurs F0.

5.4.2 Séparation des progénitures

Les embryons obtenus par le croisement des lignées *TARDBP^{WT}* ou *TARDBP^{G348C}* étaient examinés sous stéréomicroscope à épifluorescence Olympus SZX7 entre 27 et 48 hpf pour séparer les embryons transgéniques des non-transgéniques en fonction de l'expression de la protéine eGFP dans le cœur. Les pourcentages d'embryons transgéniques étaient enregistrés.

5.4.3 Procédure de choc thermique

Les embryons recevant un choc thermique étaient transférés dans des tubes de verre avec de l'eau du système. Les tubes étaient ensuite placés dans un incubateur humide préchauffé à la température désirée pendant toute la durée du choc thermique, avec une agitation de 60 RPM. Les embryons étaient ensuite remis à 28,5°C.

5.5 Immunofluorescence et microscopie confocale

Les marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur des embryons de 48 à 55 hpf. Les embryons, préalablement anesthésiés dans une solution de 0,02% tricaine ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 4% dilué dans du tampon phosphate saline (PBS – phosphate buffer salin), soit deux heures à température pièce, soit jusqu'au lendemain matin à 4°C. Les embryons fixés ont été lavés en échangeant la solution 3 fois avec du PBST (PBS avec 0,1% Tween-20), pendant 15 minutes 3 fois d'affilé. Ils ont ensuite été traités avec une solution de 1% Triton X-100 dans du PBS pendant 30 minutes. Subséquemment, les embryons ont été traités à la collagénase 1mg/ml pendant 20 minutes, et ont ensuite été lavés 10 minutes avec du PBST 3 fois. Les embryons sont ensuite mis dans une solution de blocage (25 ml PBS, 2% sérum de chèvre, 1% albumine de sérum bovin, 1% DMSO, 0,5% Triton X-100) 1 heure à température pièce. Les embryons sont ensuite incubés à 4°C pendant la nuit avec l'anticorps primaire (anti-myc lapin, concentration 1:1000, Developmental Studies Hybridoma Bank ; anti-SV2 souris, concentration 1:200, Molecular Probe) dilué dans la solution de blocage. Le lendemain, les embryons ont d'abord été lavés 3 fois pendant 15 minutes dans du PBS avant d'être incubés soit à 4°C pendant la nuit, soit 3 heures à température pièce, avec l'anticorps secondaire approprié (Alexa fluor 488, 1:1000, Invitrogen ; Alexa fluor 568, 1:1000, Invitrogen), dilué dans la solution de blocage. Les embryons sont ensuite rincés 3 fois pendant 30 minutes dans du PBS, puis durant la nuit. Le lendemain, les embryons sont incubés dans une solution de 70% glycérol dans du PBS pendant 1 heure avant d'être montés dans du glycérol 90% sur des lames de microscope, puis imagés par microscopie confocal *spinning disk* de Quorum Technologies, avec la roue CSU10B (Yokogawa), montée sur un microscope droit à fluorescence Olympus BX61W1, équipé avec une caméra Hamamatsu ORCA-ER. L'acquisition des images a été réalisée grâce au logiciel Volocity (Improvision).

Les projections axonales des motoneurones marquées par l'anticorps anti-SV2 ont été imagées au niveau des somites 15, 16, 17 (et parfois 18). Ainsi, 3 à 4 projections

axonales par embryons ont été analysées par Z-stacks. Le tracé semi-automatique de ces projections axonales a été réalisé grâce au plugin NeuronJ [182] dans le logiciel ImageJ (NIH). La longueur de pré-branchement des projections axonales a été mesurée par ce même procédé et normalisée en divisant par la longueur de l'axe dorso-ventral de l'embryon au niveau du 15^{ème} somite. La moyenne de la longueur de pré-branchement a été obtenue pour chaque condition en analysant environ 10 embryons.

5.6 Immunobuvardage

De 5 à 20 embryons par conditions étaient anesthésiés dans une solution de 0,02% tricaine avant d'être transférés dans des tubes eppendorf de 1,5 ml. La solution de tricaine était complètement enlevée, et 6 µl de tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4, 1% NP-40, 0% SDS, 2% inhibiteur de protéases, 1% sodium déoxycholate) par embryons était rajouté. En maintenant les tubes sur glace, les embryons ont ensuite été broyés pendant 5 minutes, puis mis à -80°C pendant 5 minutes. Le tube était ensuite centrifugé à 10 000 RPM pendant 10 minutes à 4°C, et le supernageant récolté. La concentration en protéine du surnageant a été mesurée par la méthode de Bradford (Bio-RAD Protein Assay, Bio-RAD Laboratories).

Les échantillons étaient dilués dans du tampon SDS 2X avec 1% de beta-mercaptoethanol, en fonction de la concentration obtenue par la méthode Bradford pour obtenir une quantité de protéines égale pour chaque échantillon (entre 2,5 µl et 10 µl) avant d'être dénaturés à 95°C pendant 5 minutes. Un volume égal de chaque échantillon était déposé sur gel acrylamide pour être séparé par SDS-PAGE. Les protéines étaient ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose par transfert électrophorétique et la membrane était ensuite utilisée pour un immuno-buvardage. La membrane était d'abord bloquée pendant une heure à température pièce dans du TBST avec 5% de lait. L'anticorps primaire (anti-myc lapin, concentration 1:5000, Developmental Studies Hybridoma Bank ; anti-γ-tubuline, concentration 1 5000, Sigma) était ensuite incubé dans 2,5% de solution TBST-lait pendant la nuit à 4°C ou 1 heure à 37°C. Trois lavements de 5 minutes chaque avec du

TBST sont réalisés avant d'incuber l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort, (concentration 1:1000, Jackson ImmunoResearch) pendant une heure à température pièce. Six lavements de 10 minutes chaque avec du TBST sont réalisés avant de révéler le gel en utilisant le Western Blotting Substrate (Lumi-light Western Blotting Substrate, Roche).

5.7 RT-PCR

L'ARN total des embryons a été extrait à 48 hpf en utilisant du Trizol (Invitrogen) par extraction au guanidium thiocyanate-phénol-chloroform. L'ADNc a été synthétisé avec le kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas). Après avoir dosé l'ADNc, il a été utilisé pour une réaction de RT-PCR avec le protocole fourni pour l'enzyme *Taq* DNA Polymerase (Denville Scientific Inc.) pour un volume final de 10 μ l. Le programme utilisé était : dénaturation à 94°C pendant 3 minutes; 20 cycles de 95°C, 30 secondes, 65°C 30 secondes et 72°C 2 minutes; 20 cycles de 95°C 40 secondes, 55°C 30 secondes et 72°C 2 minutes; 72°C 7 minutes; refroidissement à 8°C.

5.8 Réflexe de fuite en réponse au toucher

Le réflexe de fuite en réponse au toucher des embryons a été étudié entre 48 et 55 hpf. Les embryons étaient placés au centre d'une boîte à pétri de 60 mm de diamètre remplie d'eau du système. Les embryons ont été touchés légèrement au niveau de la queue en utilisant une paire de forceps. Les réponses élicitées ont été filmées en utilisant la caméra digitale Grasshopper 2 (Point Grey Research), montée sur un stéréomicroscope Olympus SZX7, et les vidéos ont été acquises avec le logiciel d'acquisition FlyCap2 (Point Grey Research). Les enregistrements étaient effectués entre 30 Hz et 60 Hz.

En utilisant le logiciel ImageJ (NIH), les vidéos ont été étudiées image par image pour déterminer le comportement de nage de façon rapide et binaire (présence ou absence de nage). Les vidéos ont été réalisées uniquement sur les embryons vivants ne présentant pas de défauts morphologiques.

5.9 Analyse statistique

Les données ont été analysées par ANOVA à une voie. Une valeur de $P < 0,05$ a été utilisée pour les différences significatives. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne. Les données numériques et statistiques sont fournies en **Annexe 1**.

6. Bibliographie

1. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2011 Mar 12;377(9769):942-55.
2. Aran F. Recherches sur une maladie non encore décrite du système musculaire (atrophie musculaire progressive). *Arch Gen Med*. 1850 1850;14(5-35):172-214.
3. Charcot J-M, Marie P. Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive souvent familiale débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev Med*. 1886;6:97-138.
4. Tooth H. The peroneal type of progressive muscular atrophy. HK Lewis, London. 1886.
5. Charcot J-M, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et de faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. *Arch Physiol Norm Pathol*. 1869.
6. Charcot J-M. De la sclérose latérale amyotrophique. *Prog Med*. 1874.
7. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993 Mar 4;362(6415):59-62.
8. Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet*. 1996 May 25;347(9013):1425-31.
9. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006 Dec 22;351(3):602-11.
10. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, NY)*. 2006 Oct 6;314(5796):130-3.
11. Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, Mayo K, Norton JB, Levitch D, et al. TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Annals of neurology*. 2008 Apr;63(4):535-8.

12. Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature genetics*. 2008 May;40(5):572-4.
13. Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, NY)*. 2008 Mar 21;319(5870):1668-72.
14. Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, Bird TD, Yuan W, Elman LB, et al. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet neurology*. 2008 May;7(5):409-16.
15. Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, Tagawa A, Kaneko H, Koyama A, et al. TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*. 2008 Apr;63(4):538-42.
16. Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science (New York, NY)*. 2009 Feb 27;323(5918):1208-11.
17. Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, NY)*. 2009 Feb 27;323(5918):1205-8.
18. Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*. 2011 Sep 8;477(7363):211-5.
19. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):245-56.
20. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):257-68.
21. Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *Journal of the neurological sciences*. 1994 Jul;124 Suppl:96-107.

22. Miller RG, Munsat TL, Swash M, Brooks BR. Consensus guidelines for the design and implementation of clinical trials in ALS. World Federation of Neurology committee on Research. *Journal of the neurological sciences*. 1999 Oct 31;169(1-2):2-12.
23. de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*. 2008 Mar;119(3):497-503.
24. Schrooten M, Smetcoren C, Robberecht W, Van Damme P. Benefit of the Awaji diagnostic algorithm for amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *Annals of neurology*. 2011 Jul;70(1):79-83.
25. Chio A. ISIS Survey: an international study on the diagnostic process and its implications in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology*. 1999 Nov;246 Suppl 3:III1-5.
26. Worms PM. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *Journal of the neurological sciences*. 2001 Oct 15;191(1-2):3-9.
27. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio A, Mitchell D, Swingler RJ, et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2010 Apr;81(4):385-90.
28. Zaldivar T, Gutierrez J, Lara G, Carbonara M, Logroscino G, Hardiman O. Reduced frequency of ALS in an ethnically mixed population: a population-based mortality study. *Neurology*. 2009 May 12;72(19):1640-5.
29. Wolfson C, Kilborn S, Oskoui M, Genge A. Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in Canada: a systematic review of the literature. *Neuroepidemiology*. 2009;33(2):79-88.
30. Beghi E, Mennini T, Bendotti C, Bigini P, Logroscino G, Chio A, et al. The heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a possible explanation of treatment failure. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(30):3185-200.
31. McDermott CJ, Shaw PJ. Diagnosis and management of motor neurone disease. *BMJ (Clinical research ed)*. 2008 Mar 22;336(7645):658-62.
32. Chio A, Calvo A, Moglia C, Mazzini L, Mora G, group Ps. Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2011 Jul;82(7):740-6.
33. Ravits JM, La Spada AR. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology*. 2009 Sep 8;73(10):805-11.

34. Phukan J, Elamin M, Bede P, Jordan N, Gallagher L, Byrne S, et al. The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2012 Jan;83(1):102-8.
35. Reiner A, Medina L, Figueredo-Cardenas G, Anfinson S. Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS. *Experimental neurology*. 1995 Feb;131(2):239-50.
36. Okamoto K, Hirai S, Amari M, Iizuka T, Watanabe M, Murakami N, et al. Oculomotor nuclear pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*. 1993;85(5):458-62.
37. Beghi E, Chio A, Couratier P, Esteban J, Hardiman O, Logroscino G, et al. The epidemiology and treatment of ALS: focus on the heterogeneity of the disease and critical appraisal of therapeutic trials. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*. 2011 Jan;12(1):1-10.
38. Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane database of systematic reviews (Online)*. 2007(1):CD001447.
39. Sojka P, Andersen PM, Forsgren L. Effects of riluzole on symptom progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 1997 Jan 18;349(9046):176-7.
40. Hardiman O, van den Berg LH, Kiernan MC. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews Neurology*. 2011 Nov;7(11):639-49.
41. Chio A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E, et al. Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*. 2009 Oct-Dec;10(5-6):310-23.
42. Schymick JC, Talbot K, Traynor BJ. Genetics of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Human molecular genetics*. 2007 Oct 15;16 Spec No. 2:R233-42.
43. Mitchell JD, Borasio GD. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2007 Jun 16;369(9578):2031-41.
44. Andersen PM, Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nature reviews Neurology*. 2011 Nov;7(11):603-15.

45. Cudkowicz ME, McKenna-Yasek D, Sapp PE, Chin W, Geller B, Hayden DL, et al. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*. 1997 Feb;41(2):210-21.
46. Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P, Chioza B, Andersson JL, Russ C, et al. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Human molecular genetics*. 1999 Feb;8(2):157-64.
47. van Es MA, Diekstra FP, Veldink JH, Baas F, Bourque PR, Schelhaas HJ, et al. A case of ALS-FTD in a large FALS pedigree with a K17I ANG mutation. *Neurology*. 2009 Jan 20;72(3):287-8.
48. Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, Ennis S, Cashman S, Donaghy C, et al. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nature genetics*. 2006 Apr;38(4):411-3.
49. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nature genetics*. 2003 Aug;34(4):383-94.
50. DeJesus-Hernandez M, Kocerha J, Finch N, Crook R, Baker M, Desaro P, et al. De novo truncating FUS gene mutation as a cause of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Human mutation*. 2010 May;31(5):E1377-89.
51. van Es MA, Veldink JH, Saris CG, Blauw HM, van Vught PW, Birve A, et al. Genome-wide association study identifies 19p13.3 (UNC13A) and 9p21.2 as susceptibility loci for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Nature genetics*. 2009 Oct;41(10):1083-7.
52. Beleza-Meireles A, Al-Chalabi A. Genetic studies of amyotrophic lateral sclerosis: controversies and perspectives. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*. 2009 Feb;10(1):1-14.
53. Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*. 2010 Dec 9;68(5):857-64.
54. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *The Journal of cell biology*. 2009 Dec 14;187(6):761-72.
55. Pinto S, Vlahovicek K, Buratti E. PRO-MINE: A bioinformatics repository and analytical tool for TARDBP mutations. *Human mutation*. Jan;32(1):E1948-58.

56. Kirby J, Goodall EF, Smith W, Highley JR, Masanzu R, Hartley JA, et al. Broad clinical phenotypes associated with TAR-DNA binding protein (TARDBP) mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics*. 2010 May;11(2):217-25.
57. Daoud H, Valdmanis PN, Kabashi E, Dion P, Dupre N, Camu W, et al. Contribution of TARDBP mutations to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of medical genetics*. 2009 Feb;46(2):112-4.
58. Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Human molecular genetics*.19(R1):15.
59. Quadri M, Cossu G, Saddi V, Simons EJ, Murgia D, Melis M, et al. Broadening the phenotype of TARDBP mutations: the TARDBP Ala382Thr mutation and Parkinson's disease in Sardinia. *Neurogenetics*. 2011 Aug;12(3):203-9.
60. Benajiba L, Le Ber I, Camuzat A, Lacoste M, Thomas-Anterion C, Couratier P, et al. TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Annals of neurology*. 2009 Apr;65(4):470-3.
61. Blair IP, Williams KL, Warraich ST, Durnall JC, Thoeng AD, Manavis J, et al. FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2010 Jun;81(6):639-45.
62. Wang HY, Wang IF, Bose J, Shen CK. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics*. 2004 Jan;83(1):130-9.
63. Ayala YM, Pantano S, D'Ambrogio A, Buratti E, Brindisi A, Marchetti C, et al. Human, Drosophila, and C.elegans TDP43: nucleic acid binding properties and splicing regulatory function. *Journal of molecular biology*. 2005 May 6;348(3):575-88.
64. Shiina Y, Arima K, Tabunoki H, Satoh J. TDP-43 dimerizes in human cells in culture. *Cellular and molecular neurobiology*. 2010 May;30(4):641-52.
65. Buratti E, Baralle FE. Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Sep 28;276(39):36337-43.
66. Strong MJ, Volkening K, Hammond R, Yang W, Strong W, Leystra-Lantz C, et al. TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Molecular and cellular neurosciences*. 2007 Jun;35(2):320-7.

67. Kuo PH, Doudeva LG, Wang YT, Shen CK, Yuan HS. Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic acids research*. 2009 Apr;37(6):1799-808.
68. Ayala YM, Zago P, D'Ambrogio A, Xu YF, Petrucelli L, Buratti E, et al. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *Journal of cell science*. 2008 Nov 15;121(Pt 22):3778-85.
69. Zhang YJ, Xu YF, Cook C, Gendron TF, Roettges P, Link CD, et al. Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 May 5;106(18):7607-12.
70. Kametani F, Nonaka T, Suzuki T, Arai T, Dohmae N, Akiyama H, et al. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009 May 1;382(2):405-9.
71. Nishimoto Y, Ito D, Yagi T, Nihei Y, Tsunoda Y, Suzuki N. Characterization of alternative isoforms and inclusion body of the TAR DNA-binding protein-43. *The Journal of biological chemistry*. 2010 Jan 1;285(1):608-19.
72. Ayala YM, Misteli T, Baralle FE. TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Mar 11;105(10):3785-9.
73. Ash PE, Zhang YJ, Roberts CM, Saldi T, Hutter H, Buratti E, et al. Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in *C. elegans*. *Human molecular genetics*. 2010 Aug 15;19(16):3206-18.
74. Liachko NF, Guthrie CR, Kraemer BC. Phosphorylation promotes neurotoxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of TDP-43 proteinopathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010 Dec 1;30(48):16208-19.
75. Fiesel FC, Voigt A, Weber SS, Van den Haute C, Waldenmaier A, Gorner K, et al. Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6. *The EMBO journal*. 2010 Jan 6;29(1):209-21.
76. Feiguin F, Godena VK, Romano G, D'Ambrogio A, Klima R, Baralle FE. Depletion of TDP-43 affects *Drosophila* motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior. *FEBS letters*. 2009 May 19;583(10):1586-92.
77. Hanson KA, Kim SH, Wassarman DA, Tibbetts RS. Ubiquitin modifies TDP-43 toxicity in a *Drosophila* model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *The Journal of biological chemistry*. 2010 Apr 9;285(15):11068-72.

78. Li Y, Ray P, Rao EJ, Shi C, Guo W, Chen X, et al. A *Drosophila* model for TDP-43 proteinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Feb 16;107(7):3169-74.
79. Lu Y, Ferris J, Gao FB. Frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis-associated disease protein TDP-43 promotes dendritic branching. *Molecular brain*. 2009;2:30.
80. Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, Dion PA, Bercier V, Bourgeois P, et al. Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Human molecular genetics*. 2010 Feb 15;19(4):671-83.
81. Wu LS, Cheng WC, Hou SC, Yan YT, Jiang ST, Shen CK. TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *Genesis (New York, NY : 2000)*. 2010 Jan;48(1):56-62.
82. Sephton CF, Good SK, Atkin S, Dewey CM, Mayer P, 3rd, Herz J, et al. TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. *The Journal of biological chemistry*. 2010 Feb 26;285(9):6826-34.
83. Kraemer BC, Schuck T, Wheeler JM, Robinson LC, Trojanowski JQ, Lee VM, et al. Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta neuropathologica*. 2010 Apr;119(4):409-19.
84. Ayala YM, De Conti L, Avendano-Vazquez SE, Dhir A, Romano M, D'Ambrogio A, et al. TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *The EMBO journal*. 2011 Jan 19;30(2):277-88.
85. Freibaum BD, Chitta RK, High AA, Taylor JP. Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *Journal of proteome research*. 2010 Feb 5;9(2):1104-20.
86. Casafont I, Bengoechea R, Tapia O, Berciano MT, Lafarga M. TDP-43 localizes in mRNA transcription and processing sites in mammalian neurons. *Journal of structural biology*. 2009 Sep;167(3):235-41.
87. Ou SH, Wu F, Harrich D, Garcia-Martinez LF, Gaynor RB. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *Journal of virology*. 1995 Jun;69(6):3584-96.
88. Abhyankar MM, Urekar C, Reddi PP. A novel CpG-free vertebrate insulator silences the testis-specific SP-10 gene in somatic tissues: role for TDP-43 in insulator function. *The Journal of biological chemistry*. 2007 Dec 14;282(50):36143-54.

89. Buratti E, Dork T, Zuccato E, Pagani F, Romano M, Baralle FE. Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *The EMBO journal*. 2001 Apr 2;20(7):1774-84.
90. Mercado PA, Ayala YM, Romano M, Buratti E, Baralle FE. Depletion of TDP 43 overrides the need for exonic and intronic splicing enhancers in the human apoA-II gene. *Nucleic acids research*. 2005;33(18):6000-10.
91. Bose JK, Wang IF, Hung L, Tarn WY, Shen CK. TDP-43 overexpression enhances exon 7 inclusion during the survival of motor neuron pre-mRNA splicing. *The Journal of biological chemistry*. 2008 Oct 24;283(43):28852-9.
92. D'Ambrogio A, Buratti E, Stuani C, Guarnaccia C, Romano M, Ayala YM, et al. Functional mapping of the interaction between TDP-43 and hnRNP A2 in vivo. *Nucleic acids research*. 2009 Jul;37(12):4116-26.
93. Kim SH, Shanware NP, Bowler MJ, Tibbetts RS. Amyotrophic lateral sclerosis-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to co-regulate HDAC6 mRNA. *The Journal of biological chemistry*. 2010 Oct 29;285(44):34097-105.
94. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):235-40.
95. Buratti E, De Conti L, Stuani C, Romano M, Baralle M, Baralle F. Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *The FEBS journal*. 2010 May;277(10):2268-81.
96. Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM. Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *The Journal of biological chemistry*. 2008 May 9;283(19):13302-9.
97. Wang IF, Wu LS, Chang HY, Shen CK. TDP-43, the signature protein of FTL-D, is a neuronal activity-responsive factor. *Journal of neurochemistry*. 2008 May;105(3):797-806.
98. Buratti E, Brindisi A, Giombi M, Tisminetzky S, Ayala YM, Baralle FE. TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Nov 11;280(45):37572-84.

99. Volkening K, Leystra-Lantz C, Yang W, Jaffee H, Strong MJ. Tar DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43), 14-3-3 proteins and copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) interact to modulate NFL mRNA stability. Implications for altered RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Brain research*. 2009 Dec 11;1305:168-82.
100. Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, Buratti E, et al. TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *Journal of neurochemistry*. 2009 Nov;111(4):1051-61.
101. Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang YJ, Vanderweyde T, Citro A, Mehta T, 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):e13250.
102. Moisse K, Volkening K, Leystra-Lantz C, Welch I, Hill T, Strong MJ. Divergent patterns of cytosolic TDP-43 and neuronal progranulin expression following axotomy: implications for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury. *Brain research*. 2009 Jan 16;1249:202-11.
103. Geser F, Brandmeir NJ, Kwong LK, Martinez-Lage M, Elman L, McCluskey L, et al. Evidence of multisystem disorder in whole-brain map of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology*. 2008 May;65(5):636-41.
104. Giordana MT, Piccinini M, Grifoni S, De Marco G, Vercellino M, Magistrello M, et al. TDP-43 redistribution is an early event in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol*. Mar;20(2):351-60.
105. Pamphlett R, Luquin N, McLean C, Jew SK, Adams L. TDP-43 neuropathology is similar in sporadic amyotrophic lateral sclerosis with or without TDP-43 mutations. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2009 Apr;35(2):222-5.
106. Dickson DW, Josephs KA, Amador-Ortiz C. TDP-43 in differential diagnosis of motor neuron disorders. *Acta neuropathologica*. 2007 Jul;114(1):71-9.
107. Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Annals of neurology*. 2007 May;61(5):427-34.
108. Neumann M, Kwong LK, Truax AC, Vanmassenhove B, Kretzschmar HA, Van Deerlin VM, et al. TDP-43-positive white matter pathology in frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2007 Mar;66(3):177-83.

109. Igaz LM, Kwong LK, Xu Y, Truax AC, Uryu K, Neumann M, et al. Enrichment of C-terminal fragments in TAR DNA-binding protein-43 cytoplasmic inclusions in brain but not in spinal cord of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *The American journal of pathology*. 2008 Jul;173(1):182-94.
110. Arai T, Hasegawa M, Nonoka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, et al. Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2010 Apr;30(2):170-81.
111. Neumann M. Molecular neuropathology of TDP-43 proteinopathies. *International journal of molecular sciences*. 2009 Jan;10(1):232-46.
112. Kwong LK, Uryu K, Trojanowski JQ, Lee VM. TDP-43 proteinopathies: neurodegenerative protein misfolding diseases without amyloidosis. *Neuro-Signals*. 2008;16(1):41-51.
113. Tan CF, Eguchi H, Tagawa A, Onodera O, Iwasaki T, Tsujino A, et al. TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta neuropathologica*. 2007 May;113(5):535-42.
114. Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet neurology*. 2010 Oct;9(10):995-1007.
115. Higashi S, Iseki E, Yamamoto R, Minegishi M, Hino H, Fujisawa K, et al. Concurrence of TDP-43, tau and alpha-synuclein pathology in brains of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain research*. 2007 Dec 12;1184:284-94.
116. Amador-Ortiz C, Lin WL, Ahmed Z, Personett D, Davies P, Duara R, et al. TDP-43 immunoreactivity in hippocampal sclerosis and Alzheimer's disease. *Annals of neurology*. 2007 May;61(5):435-45.
117. King A, Sweeney F, Bodi I, Troakes C, Maekawa S, Al-Sarraj S. Abnormal TDP-43 expression is identified in the neocortex in cases of dementia pugilistica, but is mainly confined to the limbic system when identified in high and moderate stages of Alzheimer's disease. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2010 Aug;30(4):408-19.
118. Nakashima-Yasuda H, Uryu K, Robinson J, Xie SX, Hurtig H, Duda JE, et al. Comorbidity of TDP-43 proteinopathy in Lewy body related diseases. *Acta neuropathologica*. 2007 Sep;114(3):221-9.
119. Schwab C, Arai T, Hasegawa M, Yu S, McGeer PL. Colocalization of transactivation-responsive DNA-binding protein 43 and huntingtin in inclusions of

Huntington disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2008 Dec;67(12):1159-65.

120. Geser F, Robinson JL, Malunda JA, Xie SX, Clark CM, Kwong LK, et al. Pathological 43-kDa transactivation response DNA-binding protein in older adults with and without severe mental illness. *Archives of neurology*. 2010 Oct;67(10):1238-50.

121. Millecamps S, Salachas F, Cazeneuve C, Gordon P, Bricka B, Camuzat A, et al. SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *Journal of medical genetics*. 2010 Aug;47(8):554-60.

122. Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM, Baloh RH. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Nov 3;106(44):18809-14.

123. Stallings NR, Puttapparthi K, Luther CM, Burns DK, Elliott JL. Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiology of disease*. 2010 Nov;40(2):404-14.

124. Xu YF, Gendron TF, Zhang YJ, Lin WL, D'Alton S, Sheng H, et al. Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010 Aug 11;30(32):10851-9.

125. Wils H, Kleinberger G, Janssens J, Pereson S, Joris G, Cuijt I, et al. TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Feb 23;107(8):3858-63.

126. Shan X, Chiang PM, Price DL, Wong PC. Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Sep 14;107(37):16325-30.

127. Tsai KJ, Yang CH, Fang YH, Cho KH, Chien WL, Wang WT, et al. Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTL-D. *The Journal of experimental medicine*. 2010 Aug 2;207(8):1661-73.

128. Igaz LM, Kwong LK, Lee EB, Chen-Plotkin A, Swanson E, Unger T, et al. Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011 Feb 1;121(2):726-38.

129. Zhou H, Huang C, Chen H, Wang D, Landel CP, Xia PY, et al. Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene. *PLoS genetics*. 2010 Mar;6(3):e1000887.
130. Swarup V, Phaneuf D, Bareil C, Robertson J, Rouleau GA, Kriz J, et al. Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain : a journal of neurology*. 2011 Sep;134(Pt 9):2610-26.
131. Zhang T, Mullane PC, Periz G, Wang J. TDP-43 neurotoxicity and protein aggregation modulated by heat shock factor and insulin/IGF-1 signaling. *Human molecular genetics*. 2011 May 15;20(10):1952-65.
132. Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*. 2010 Aug 26;466(7310):1069-75.
133. Miguel L, Frebourg T, Campion D, Lecourtois M. Both cytoplasmic and nuclear accumulations of the protein are neurotoxic in *Drosophila* models of TDP-43 proteinopathies. *Neurobiology of disease*. 2011 Feb;41(2):398-406.
134. Ritson GP, Custer SK, Freibaum BD, Guinto JB, Geffel D, Moore J, et al. TDP-43 mediates degeneration in a novel *Drosophila* model of disease caused by mutations in VCP/p97. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010 Jun 2;30(22):7729-39.
135. Voigt A, Herholz D, Fiesel FC, Kaur K, Muller D, Karsten P, et al. TDP-43-mediated neuron loss in vivo requires RNA-binding activity. *PloS one*. 2010;5(8):e12247.
136. Laird AS, Van Hoecke A, De Muynck L, Timmers M, Van den Bosch L, Van Damme P, et al. Progranulin is neurotrophic in vivo and protects against a mutant TDP-43 induced axonopathy. *PloS one*. 2010;5(10):e13368.
137. Arias AM. *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century. *Methods Mol Biol*. 2008;420:1-25.
138. Silverman GA, Luke CJ, Bhatia SR, Long OS, Vetica AC, Perlmutter DH, et al. Modeling molecular and cellular aspects of human disease using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pediatr Res*. 2009 Jan;65(1):10-8.
139. Joyce PI, Fratta P, Fisher EM, Acevedo-Arozena A. SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mamm Genome*. Aug;22(7-8):420-48.

140. Hamilton F. An account of the fishes found in the river Ganges and its branches. Edinburgh & London; 1822.
141. Haffter P, Nusslein-Volhard C. Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. *Int J Dev Biol.* 1996 Feb;40(1):221-7.
142. Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature genetics.* 2000 Oct;26(2):216-20.
143. Higashijima S, Hotta Y, Okamoto H. Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under the control of the islet-1 promoter/enhancer. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2000 Jan 1;20(1):206-18.
144. Meng A, Tang H, Ong BA, Farrell MJ, Lin S. Promoter analysis in living zebrafish embryos identifies a cis-acting motif required for neuronal expression of GATA-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997 Jun 10;94(12):6267-72.
145. Cheng KC, Xin X, Clark DP, La Riviere P. Whole-animal imaging, gene function, and the Zebrafish Phenome Project. *Curr Opin Genet Dev.* Oct;21(5):620-9.
146. Detrich HW, 3rd, Yergeau DA. Comparative genomics in erythropoietic gene discovery: synergisms between the Antarctic icefishes and the zebrafish. *Methods Cell Biol.* 2004;77:475-503.
147. Agranoff BW, Klinger PD. PUROMYCIN EFFECT ON MEMORY FIXATION IN THE GOLDFISH. *Science (New York, NY).* 1964 Nov 13;146(3646):952-3.
148. Harvey B, Zakutnyaya O. *Russian Space Probes: Scientific Discoveries and Future Missions: Springer Praxis Books / Space Exploration;* 2011.
149. Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature.* 1981 May 28;291(5813):293-6.
150. Walker C, Streisinger G. Induction of Mutations by gamma-Rays in Pregonial Germ Cells of Zebrafish Embryos. *Genetics.* 1983 Jan;103(1):125-36.
151. Stuart GW, McMurray JV, Westerfield M. Replication, integration and stable germline transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development.* 1988 Jun;103(2):403-12.
152. Streisinger G, Singer F, Walker C, Knauber D, Dower N. Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish. *Genetics.* 1986 Feb;112(2):311-9.

153. Etchin J, Kanki JP, Look AT. Zebrafish as a model for the study of human cancer. *Methods Cell Biol.*105:309-37.
154. Bakkens J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc Res.* Jul 15;91(2):279-88.
155. Cui C, Benard EL, Kanwal Z, Stockhammer OW, van der Vaart M, Zakrzewska A, et al. Infectious disease modeling and innate immune function in zebrafish embryos. *Methods Cell Biol.*105:273-308.
156. Bibliowicz J, Tittle RK, Gross JM. Toward a better understanding of human eye disease insights from the zebrafish, *Danio rerio*. *Prog Mol Biol Transl Sci.*100:287-330.
157. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 2007 May;8(5):353-67.
158. Brennan CH. Zebrafish behavioural assays of translational relevance for the study of psychiatric disease. *Rev Neurosci.*22(1):37-48.
159. Kabashi E, Brustein E, Champagne N, Drapeau P. Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. *Biochimica et biophysica acta.* 2011 Mar;1812(3):335-45.
160. Beattie CE. Control of motor axon guidance in the zebrafish embryo. *Brain Res Bull.* 2000 Nov 15;53(5):489-500.
161. Drapeau P, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, McDearmid JR, Brustein E. Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog Neurobiol.* 2002 Oct;68(2):85-111.
162. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 1995 Jul;203(3):253-310.
163. Fetcho JR, Higashijima S, McLean DL. Zebrafish and motor control over the last decade. *Brain Res Rev.* 2008 Jan;57(1):86-93.
164. Gilbert N, Boyle S, Sutherland H, de Las Heras J, Allan J, Jenuwein T, et al. Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1. *The EMBO journal.* 2003 Oct 15;22(20):5540-50.
165. Bernhardt RR, Chitnis AB, Lindamer L, Kuwada JY. Identification of spinal neurons in the embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol.* 1990 Dec 15;302(3):603-16.

166. Kuwada JY, Bernhardt RR, Nguyen N. Development of spinal neurons and tracts in the zebrafish embryo. *J Comp Neurol*. 1990 Dec 15;302(3):617-28.
167. Eisen JS, Myers PZ, Westerfield M. Pathway selection by growth cones of identified motoneurons in live zebra fish embryos. *Nature*. 1986 Mar 20-26;320(6059):269-71.
168. Myers PZ, Eisen JS, Westerfield M. Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1986 Aug;6(8):2278-89.
169. Pike SH, Melancon EF, Eisen JS. Pathfinding by zebrafish motoneurons in the absence of normal pioneer axons. *Development*. 1992 Apr;114(4):825-31.
170. Westerfield M, Liu DW, Kimmel CB, Walker C. Pathfinding and synapse formation in a zebrafish mutant lacking functional acetylcholine receptors. *Neuron*. 1990 Jun;4(6):867-74.
171. Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch JL, Biellmann D, Chatonnet A, et al. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat Neurosci*. 2002 Feb;5(2):111-8.
172. Saint-Amant L, Drapeau P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J Neurobiol*. 1998 Dec;37(4):622-32.
173. Buss RR, Drapeau P. Synaptic drive to motoneurons during fictive swimming in the developing zebrafish. *J Neurophysiol*. 2001 Jul;86(1):197-210.
174. Zon LI, Peterson R. The new age of chemical screening in zebrafish. *Zebrafish*. Mar;7(1):1.
175. Kabashi E, Champagne N, Brustein E, Drapeau P. In the swim of things: recent insights to neurogenetic disorders from zebrafish. *Trends in genetics : TIG*. 2010 Aug;26(8):373-81.
176. Kabashi E, Bercier V, Lissouba A, Liao M, Brustein E, Rouleau GA, et al. FUS and TARDBP but not SOD1 interact in genetic models of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS genetics*. 2011 Aug;7(8):e1002214.
177. Kawakami K. Transgenesis and gene trap methods in zebrafish by using the Tol2 transposable element. *Methods Cell Biol*. 2004;77:201-22.
178. Grabher C, Wittbrodt J. Meganuclease and transposon mediated transgenesis in medaka. *Genome Biol*. 2007;8 Suppl 1:S10.

179. Koga A, Inagaki H, Bessho Y, Hori H. Insertion of a novel transposable element in the tyrosinase gene is responsible for an albino mutation in the medaka fish, *Oryzias latipes*. *Mol Gen Genet*. 1995 Dec 10;249(4):400-5.
180. Koga A, Suzuki M, Inagaki H, Bessho Y, Hori H. Transposable element in fish. *Nature*. 1996 Sep 5;383(6595):30.
181. Kawakami K, Koga A, Hori H, Shima A. Excision of the tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. *Gene*. 1998 Dec 28;225(1-2):17-22.
182. Meijering E, Jacob M, Sarria JC, Steiner P, Hirling H, Unser M. Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2004 Apr;58(2):167-76.
183. Urasaki A, Morvan G, Kawakami K. Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics*. 2006 Oct;174(2):639-49.
184. Feder ME, Krebs RA. Ecological and evolutionary physiology of heat shock proteins and the stress response in *Drosophila*: complementary insights from genetic engineering and natural variation. *EXS*. 1997;83:155-73.
185. Baron U, Gossen M, Bujard H. Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic acids research*. 1997 Jul 15;25(14):2723-9.
186. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992 Jun 15;89(12):5547-51.
187. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of clinical investigation*. 2006 Mar;116(3):561-70.
188. Mosimann C, Zon LI. Advanced zebrafish transgenesis with Tol2 and application for Cre/lox recombination experiments. *Methods Cell Biol*.104:173-94.
189. Traynor BJ, Bruijn L, Conwit R, Beal F, O'Neill G, Fagan SC, et al. Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. *Neurology*. 2006 Jul 11;67(1):20-7.
190. Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS letters*. 2007 Jul 31;581(19):3702-10.

191. Wegorzewska I, Baloh RH. TDP-43-based animal models of neurodegeneration: new insights into ALS pathology and pathophysiology. *Neurodegener Dis.* 8(4):262-74.
192. Flanagan-Steet H, Fox MA, Meyer D, Sanes JR. Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development.* 2005 Oct;132(20):4471-81.
193. Blechinger SR, Evans TG, Tang PT, Kuwada JY, Warren JT, Jr., Krone PH. The heat-inducible zebrafish hsp70 gene is expressed during normal lens development under non-stress conditions. *Mech Dev.* 2002 Mar;112(1-2):213-5.
194. Zhan H, Gong Z. Delayed and restricted expression of UAS-regulated GFP gene in early transgenic zebrafish embryos by using the GAL4/UAS system. *Mar Biotechnol (NY).* Feb;12(1):1-7.
195. Lohr H, Ryu S, Driever W. Zebrafish diencephalic A11-related dopaminergic neurons share a conserved transcriptional network with neuroendocrine cell lineages. *Development.* 2009 Mar;136(6):1007-17.
196. Armstrong GAB, Liao M, Drapeau P. Defective neuromuscular transmission in zebrafish expressing human TARDBP (TDP-43) with a mutation related to ALS and FTL. *22nd International Symposium on ALS/MND2011.* p. P123.
197. Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental neurology.* 2004 Feb;185(2):232-40.
198. Li P, White RM, Zon LI. Transplantation in zebrafish. *Methods Cell Biol.* 105:403-17.
199. Borroni B, Bonvicini C, Alberici A, Buratti E, Agosti C, Archetti S, et al. Mutation within TARDBP leads to frontotemporal dementia without motor neuron disease. *Human mutation.* 2009 Nov;30(11):E974-83.
200. Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J Immunol Methods.* 1997 Mar 28;202(2):133-41.
201. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India.* 2004 Oct;52:794-804.
202. Lanson NA, Jr., Maltare A, King H, Smith R, Kim JH, Taylor JP, et al. A Drosophila model of FUS-related neurodegeneration reveals genetic interaction between FUS and TDP-43. *Human molecular genetics.* Jul 1;20(13):2510-23.

Annexe

Table 5. Données de la Figure 8B

Pourcentages des embryons de la génération F2 en fonction du phénotype, suite à un choc thermique de 38,5°C pendant 30 minutes réalisé à 18 hpf. Le nombre d'embryons est donné entre parenthèses.

| | Normaux | Phénotype moteur | Morphologie anormale | Morts | Total |
|--|------------|------------------|----------------------|-------------|------------|
| <i>TARDBP</i> ^{G348C} avec choc thermique | 2,61% (10) | 59,79% (229) | 15,41% (59) | 22,19% (85) | 100% (383) |
| Non Tg avec choc thermique | 100% (387) | 0% (0) | 0% (0) | 0% (0) | 100% (387) |
| <i>TARDBP</i> ^{G348C} sans choc thermique | 100% (318) | 0% (0) | 0% (0) | 0% (0) | 100% (318) |
| <i>TARDBP</i> ^{WT} avec choc thermique | 100% (390) | 0% (0) | 0% (0) | 0% (0) | 100% (390) |

Table 6. Statistiques de la Figure 9B

| | Ratio de la longueur de pré-branchement |
|--|---|
| <i>TARDBP</i> ^{G348C} avec choc thermique | 0,456 ± 0.0216 (N=12) |
| Non Tg avec choc thermique | 0.620 ± 0.0155 (N=11) |
| <i>TARDBP</i> ^{G348C} sans choc thermique | 0.663 ± 0.0145 (N=8) |
| <i>TARDBP</i> ^{WT} avec choc thermique | 0.653 ± 0.0218 (N=10) |