THESE DE DOCTORAT

DE
L'UNIVERSITÉ D'ANGERS
SOUS LE SCEAU DE
LA COMUE ANGERS – LE MANS

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie-Santé
Spécialité : « Biologie cellulaire - Neurosciences »

Par
Alexia BODIN

Etude de la dynamique de la protéine TDP-43 en conditions physiologique et pathologique : implication et perspectives en recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 11 octobre 2024

Unité de recherche : Unité MitoVasc, Equipe MitoLab, UMR INSERM U1083, CNRS 6015

Rapporteurs avant soutenance :

Philippe CORCIA	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, CHU de Tours
Philippe COURATIER	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Limoges

Composition du Jury :

Présidente : Anne-Marie TASSIN	Directrice de recherche CNRS, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule I2BC, Université Paris-Saclay
Examinatrice : Stéphanie MILLECAMPS	PharmD, PhD, Chargée de recherche CNRS, Institut du Cerveau et de la Moelle ICM, UMR CNRS 7225, Inserm U1127, Sorbonne Université, Paris
Directeur de thèse : Arnaud CHEVROLLIER	Maître de conférences (HDR), Université d'Angers, France
Co-directeur de thèse : Philippe CODRON	Neurologue, MD, PhD, CHU Angers

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



REMERCIEMENTS

Je remercie l'ensemble des membres de mon jury de thèse : Pr. **Philippe Couratier**, Pr. **Philippe Corcia**, Dr. **Stéphanie Millecamps** et Dr. **Anne-Marie Tassin**. Je vous remercie d'avoir accepté mon invitation à participer à l'évaluation de ce travail de thèse, ainsi qu'au temps accordé à la lecture et l'évaluation du manuscrit.

Je remercie les membres de mon comité de suivi individuel : **Mathilde Duchesne** et **Jean-François Dumas** pour m'avoir suivi pendant ces 4 ans et pour avoir toujours été de bon conseil sur ce projet parfois ambitieux.

Je remercie **Arnaud Chevrollier**, pour m'avoir co-encadré pendant cette thèse. Tu auras toujours su trouver LE détail (évident) pour faire fonctionner le microscope dès que quelque chose ne fonctionnait plus alors que j'avais « tout essayé ». J'espère qu'on ne t'a pas donné trop de sueurs froides avec Philippe, j'étais de toute évidence entre de bonnes mains.

Je remercie infiniment **Philippe Codron**, qui a été au cœur de ce travail avec moi pendant 6 ans si on compte le master 1 et le master 2. C'est grâce à toi que je suis arrivée à Mitolab, petite étudiante de Master 1 que j'étais qui découvrait le monde de la recherche. Tu m'avais dit à l'époque que tu n'aurais pas de financements pour me garder en stage de Master 2, les choses ont bien changées semblerait-il. Tu m'as prise sous ton aile et tu as toujours été présent, tu t'es toujours rendu disponible, et tu as été d'un soutien et d'une bienveillance sans faille. Si ce n'avait pas été avec toi, je ne pense pas que je me serais lancée dans une thèse.

Je remercie **Anne-Mare Tassin**, et **Logan Greibill**, ainsi que tous les membres de l'I2BC que j'ai pu côtoyer. Merci de m'avoir accueillie chaleureusement au sein de votre laboratoire pour une mobilité malheureusement bien écourtée par la covid. Merci de nous avoir suivis dans ce projet sur le centrosome, et merci Logan pour les heures de manips que tu y as passé en plus de ta thèse, sans cela nous n'aurions pas eu une aussi belle histoire à raconter.

Je remercie également la Filière de Santé Maladies Rares SLA et Maladies du Neurone Moteur (**FilSLAN**) pour avoir financé ma 4ème et dernière année de thèse, ainsi que l'association pour la recherche sur la SLA (**ARSLA**) pour leur soutien financier qui nous a été accordé et le prix qui m'a été décerné lors des JR8.

Merci à tous les membres passés et actuels de l'équipe Mitolab :
A **Guy**, pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe, et pour les réunions qui commencent à 11 heures pile et pas 11h01 (enfin 9 heures maintenant).
Aux anciens : **Aurélie**, **Nancy**, **Stéphanie**, **Charlène**, **Charlotte**, **Aglaé**, **Fédérica** avec qui cela a toujours été agréable de partager des moments en salle de pause. **Fédérica**, merci pour les lamelles d'iPSC.
Aux « titulaires » (ou presque) de Mitolab : **Olivier**, **Jeanne**, **Naïg**, **Valérie**, **Salim**, **Yannick**, **Cinzia**, **Morgane**, **Claudie**, **Anaïs** (Girona), **Mireille**, **Jade**, **Jérémy**, **Magalie**, **Florian**, vous êtes probablement ceux que j'aurai côtoyés le plus longtemps pendant ces 4 années, et ce fût un vrai plaisir, ne changez rien à qui vous êtes.
Aux doctorants du bureau : **Nolwenn**, **Léa**, **Cléis**, **Pauline**, **Théophile** : vous avez participé à la bonne ambiance du bureau, et ce malgré les odeurs, je vous souhaite une belle fin de thèse, bon courage pour la dernière ligne droite pour certains.
Aux nouveaux du bureau des Bermudes : **Florence**, **Aymane**, **Solenn**, **Lise**, **Léo**, **Victor**, **Ismaïl**, **Jordan**, **Anaïs** (Girardeau) ; courage vous aurez « bientôt » un bureau digne de ce nom. **Camille** et **Adélie** vous avez réchappé à ça et vous avez eu la chance (enfin j'espère) d'être dans notre bureau, mais ceci vaut pour vous également : profitez bien du temps que vous avez à passer à Mitolab, je vous souhaite qu'il soit aussi joyeux et agréable qu'il l'a été pour moi.
A tous les stagiaires qui sont passés de près ou de loin : **Valentin**, **Louis**, **Tiffany**, **Pauline**, **Solène**, **Axel**, **Lona**, **Abdenour**, **Hélène**, **Romain**, **Christiano**, **Jacques**, **Sallyann**, j'espère que votre passage à Mitolab aura été agréable et ne vous laissera pas trop de séquelles ahah. A **Benoît**, que j'ai pu former, j'espère que cette petite pause de la clinique en recherche t'aura été profitable.
A **Jérôme**, merci de nous avoir sauvé du naufrage administratif, en espérant que tu ne quittes pas le navire (paddle ?) de sitôt.
A tous les membres de Mitolab que je n'ai pas pu citer ci-dessus, ou aux personnels extérieurs notamment des plateformes (**Jérôme Cayon**), merci pour votre aide, vos remarques pertinentes ou aux moments que nous avons pu partager.

Au personnel du laboratoire de neuropathologie : **Isabelle**, **Catherine** et **Alicia**, pour les allers-retours que vous avez faits au CRB pour me sortir des cerveaux, et pour toutes les fois où j'ai utilisé les cryocut.

A **Julien Gouju**, pour toutes ces heures passées en extraction et sur les WB à s'arracher les cheveux… J'espère que tu finiras par le sortir ce papier sur Huntington, ne perds pas espoir !

REMERCIEMENTS

A ces collègues devenus plus que des collègues : **Jade**, **Magalie**, **Florian**, **Jérémy**, le FcDédé, parce que c'est des amis comme vous que tout le monde devrait avoir dans sa vie. Si j'ai passé 4 merveilleuses années à Angers, finalement c'est grandement grâce à vous. **Jade**, je te lègue mon badge, essaie de ne pas l'égarer temporairement. **Florian**, continue de manger ce qu'on te dépose sur ton bureau sans te poser de questions, je te lègue ma fourchette. **Jérémy**, je te lègue mes gommettes, je suis sûre que tu en feras bon usage, même si tu n'as jamais voulu prendre ton sac basic fit pour honorer la team Muscu. **Magalie**, je te lègue les prochains numéros gagnants au loto : 37 15 7 49 28 + 2, (ne me remercie pas). Je te vois venir calimero, non je ne vous oublie pas le FcDédé avec Nolween et Twistan. **Twistan**, même si tes goûts cinématographiques sont plus que douteux, et que ton cœur est et restera pour toujours à Carme (alors qu'on vous éclate à chaque fois), cela aura été un PLAISIR de devoir ponctuer mes phrases lors de nos échanges. **Nolwenn**, Nolween, Noël, Nol ? L'histoire de ta vie restera une source de distraction sans fin, tu continueras toujours à nous surprendre, et à nous faire rire. Ne perds pas espoir, tu verras je suis sûre que pour toi aussi, un jour, tout se passera bien (tu le mérites amplement). Aux +1 (et +2) de FcDédé : **Léa**, **Pauline**, **Bastien**, **mini Léa**, **Andréa**, vous non plus je ne vous oublie pas, vous avez aussi participé à ces moments de vie et je vous en remercie.

A la Col'forever : **Juliette**, **Solène**, **Mahinée**, on se suit de près, et parfois de loin (n'est-ce pas Mahi'), et ce depuis le collège, mais je sais que peu importe où je serai, vous serez toujours un peu là avec moi. On en a vécues des choses en 15 ans, mais je suis contente de les avoir vécues avec vous, je vous aime les girls, on change pas une équipe qui gagne.
Aux rapportés **Mathieu** et **Julien**, c'est toujours un bonheur de tous se retrouver le temps d'un repas, une soirée, un week-end ou d'un grandWeek-endSaMère à Mouzeil, à Saint-Gilles ou ailleurs. Je sais qu'on ne mourra jamais de faim tous ensemble (quand on arrive à trouver une date où on est tous dispos), et les gars, on est toujours pas malheureux.

A **Marion**, **Tom** et **Lucas**, que ce soit à Angers, Nyoiseau, Le Mans, Paris, Montpellier, Bari, Crozon, Europapark et peut-être bientôt ailleurs (stp pas Rennes Guichoux), finalement peu importe l'endroit, ce sera toujours un bonheur de vous retrouver et de continuer à partager des week-ends, soirées, voyages ensembles, vous avez participé à rendre ces années d'études à Angers formidables, et j'espère vous compter dans mes amis encore longtemps.

A toute ma **famille**, **amis** et à ceux qui ne sont plus là pour lire ces lignes,
Vous avez tous participé à mon bonheur et mon épanouissement, d'une façon ou d'une autre, à un moment ou un autre. A mes grands-parents, tantes, oncles, cousines, cousins (et rapportés), amis de la famille, et pour tous les repas de familles, toutes les fêtes, les anniversaires, les repas de Noël, merci pour chacun de ces moments passés ensemble.

A mes parents, ma sœur et mon frère, on dit souvent qu'on ne choisit pas sa famille, mais si j'avais eu le choix, c'est vous que j'aurai choisi. Merci pour votre présence et votre soutien inestimable. **Papa** et **Maman**, vous nous avez toujours soutenu quels que soit notre orientation et nos projets en tous genres, et si j'en suis ici aujourd'hui, c'est grâce à vous. Maman, je ne suis finalement pas mécontente de ne pas avoir fait de CAP esthétique. **Eline** et **Timon**, pour l'enfance merveilleuse qu'on a passée ensemble, et pour tous les moments qu'on continue et continuera de partager à l'avenir. Ce n'est pas parce qu'on ne se le dit pas souvent dans cette famille qu'on n'en pense pas moins, je vous aime.
Mégane et **Romain**, parce que vous aussi maintenant vous faites partie de la famille, et que c'est toujours un bonheur d'être tous réunis, on a quand même passé le meilleur confinement tous ensemble.

A l'espérance de vie inespérée de mon compagnon de vie, qui m'aura suivie pendant 9 années d'études supérieures, et qui s'il continue comme ça va survivre à l'obtention de mon diplôme de doctorat. A tous les chargeurs que tu auras mangés, dont celui de mon ordinateur n'ayant plus de batterie en veille de partiel, à toutes les plinthes, les tapis, les murs, les meubles, les portes… Tu auras tout détruit sur ton passage dans chaque nouvel appartement, y compris le mien tout beau tout neuf… Je n'aurai pas pensé t'avoir si longtemps avec moi, et même si t'es nul comme soutien émotionnel, je suis quand même contente de t'avoir ma crevette, promis je ne t'abandonnerai pas au jardin des plantes.

REMERCIEMENTS

Enfin à toute personne qui lira ce manuscrit, sachez que cette thèse c'est :
- 273 lames de microscopie
- 819 lamelles
- 9828 acquisitions
- 1 512 heures passées au microscope
- 274,5 Go de données
- 2 729 dossiers
- 11 161 fichiers
- des échecs
- mais aussi des réussites

Et c'est aussi :
- des midis sportifs
- des aquariums dans des béchers
- des cultures de plantes
- et donc l'observation des thrips à la loupe binoculaire
- une table d'activité qui aura vu mes bricolages artistiques en tout genre
- des montages photos de qualité

Mais cette thèse, c'est avant tout 4 ans de vie qui resteront à jamais gravés dans ma mémoire, et participeront indéniablement à faire celle que je serai demain.

Table des matières

AVANT-PROPOS 2

LISTE DES PUBLICATIONS 4

LISTE DES COMMUNICATIONS 6

LISTE DES ABREVIATIONS 8

INTRODUCTION 16

1. La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) 16
1.1. Généralités 16
1.2. Clinique 16
1.3. Traitements 18
2. Mécanismes biologiques de la SLA : le rôle central de la protéine TDP-43 20
2.1. TDP-43 en condition physiologique 22
2.1.1. Le gène *TARDBP* 22
2.1.2. La protéine TDP-43 22
2.1.3. Modifications post-transcriptionnelles 26
2.1.4. Fonctions de la protéine TDP-43 28
a) Transcription 28
b) Réparation de l'ADN 28
c) Stabilité des ARNm 30
d) Transport des ARNm 30
e) Traduction 30
f) Epissage 30
g) Processing des ARN non codants (miARN et lncARN) 32
h) Réponse au stress et phénomène de séparation de phase liquide-liquide (LLPS) 32
i) Mitochondrie 34
j) Autophagie 34
k) Fonctions neuronales et rôle synaptique 34
2.2. TDP-43 en condition pathologique 36
2.2.1. Gain de fonction toxique : formation d'agrégats cytoplasmiques 36
2.2.2. Perte de fonction nucléaire 38
2.2.3. Propagation de la pathologie 40
2.2.4. Génétique de la SLA, pistes physiopathologiques 42
a) Mutations du gène *SOD1* 42
b) Mutations du gène *C9ORF72* 44
c) Mutations du gène *TARDBP* 44
d) Mutations du gène *FUS/TLS* 46
e) Autres gènes impliqués dans la SLA 46
2.2.5. Autres pathologies liées à TDP-43 48
a) Dégénérescence Lobaire Fronto-Temporale (DLFT) 48
b) Encéphalopathie TDP-43 liée à l'âge à prédominance limbique (LATE) 48
c) Protéinopathie TDP-43 dans les autres pathologies neurodégénératives 48
3. Modéliser la SLA en recherche, un enjeu majeur 50
3.1. Modèles *in vitro* 50
3.2. Modèles *in vivo* 54

ENJEUX ET PROBLEMATIQUES DE LA THESE 60

MATERIEL ET METHODES 62

1. Culture cellulaire 62
1.1. Entretien 62
1.2. Culture des cellules sur lamelles 62
1.3. Traitements 64
1.4. Immunofixation et immunomarquages 64

1.5. Transfection de plasmides 64
1.5.1. Amplification des plasmides 64
1.5.2. Transformation bactérienne 66
1.5.3. Sélection des clones et amplification en milieu liquide 66
1.5.4. Extraction des plasmides 66
1.5.5. Transfection des plasmides 66
1.6. Purification de centrosomes 68
1.6.1. Western blot sur centrosome purifiés 68
1.6.2. Immunofluorescence sur centrosome purifiés 70
2. Histologie 70
2.1. Coupes histologiques de cerveau et moelle épinière 70
2.2. Extractions de protéines insolubles 70
3. Biochimie 72
3.1. Dosage de protéines 72
3.2. Western blot 72
3.2.1. Préparation des échantillons 72
3.2.2. Migration par électrophorèse 74
3.2.3. Transfert des protéines sur membrane 74
3.2.4. Incubations et révélation 74
4. Imagerie 74
4.1. Microscopie à fluorescence conventionnelle 74
4.2. Microscopie à fluorescence haute- et super-résolution 74
4.2.1. Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) 74
4.2.2. Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) 76
5. Acquisition et traitement d'images 78
5.1. Metamorph 78
5.2. Huygens 78
5.3. Image J 80
5.4. Imaris 80
6. Analyses statistiques 80
7. Analyse *in silico* : utilisation des bases de données et outils de prédiction 80
7.1. RNAct 80
7.2. BioGRID 82
8. Etude *in vivo* : Evaluation des effets de protéines insolubles issues de cerveau de patient atteint de SLA chez la souris 82
8.1. Etude *in vivo* 82
8.1.1. Design expérimental 82
8.1.2. Hébergement 82
8.1.3. Points limites 84
8.1.4. Injections 84
8.1.5. Tests comportementaux 84
a) Rotarod 84
a) Wire hang test 86
b) Y-maze test 86
8.1.6. Sacrifice 86
8.1.7. Prélèvements biologiques 86
8.2. Etude *ex vivo* 88
8.2.1. Analyses histologiques 88
PARTIE I : ETUDE DE LA DYNAMIQUE DE TDP-43 EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE 90
1. Introduction : TDP-43, une protéine de liaison à l'ARN 90
2. Objectif 92
3. Résultats 92
3.1. Localisation de la protéine TDP-43 par microscopie à fluorescence en condition physiologique 92
3.1.1. Immunomarquages avec différents anticorps anti-TDP-43 92
3.1.2. Dans différentes lignées cellulaires couramment utilisées en neurosciences 96
3.1.3. Par transfection de plasmides 98

3.2. Etude de la localisation de TDP-43 sur centrosome isolé 98
3.2.1. Par microscopie à fluorescence 100
3.2.2. Par approche biochimique 100
3.3. Etude des facteurs pouvant influencer la localisation centrosomale de la protéine TDP-43 104
3.3.1. Le cycle cellulaire 104
3.3.2. Le réseau de microtubules 104
3.4. Etude de l'ultra-localisation de la protéine TDP-43 au sein du centrosome 106
3.4.1. Par microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) 106
3.4.2. Par microscopie super-résolutive STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) 110
3.5. Analyse *in silico* et hypothèses fonctionnelles 110
3.5.1. Etude de l'interaction de TDP-43 avec des ARN localisés au centrosome 110
3.5.2. Etude de l'interaction de TDP-43 avec des protéines localisées au centrosome 112
3.6. Etude de la localisation de TDP-43 par microscopie à fluorescence en condition pathologique 116
3.6.1. Sur modèle cellulaire d'agrégats pathologiques de TDP-43 116
3.6.2. Sur fibroblastes de patients atteints de SLA 118
3.6.3. Sur coupes histologiques de SNC de patients atteints de SLA 120
3.6.4. Autre protéine impliquée dans la SLA : FUS 122
4. Discussion 124

PARTIE II : ETUDE DE LA DYNAMIQUE DE TDP-43 EN CONDITION PATHOLOGIQUE 132

1. Introduction : insuffisance des modèles d'études dans la recherche sur la sSLA 132
2. Objectif 134
3. Résultats 134
3.1. Purification des protéines insolubles à partir de cerveaux de sujet sain et de patients atteints de SLA 134
3.2. Induction *in vivo* : Evaluation des effets de protéines insolubles de cerveau de patients atteints de SLA chez la souris 134
3.2.1. Observations générales et mortalité 136
3.2.2. Evolution du poids corporel 138
3.2.3. Evaluation des fonctions motrices par Wire hang test 138
3.2.4. Evaluation des fonctions motrices par rotarod 142
3.2.5. Evaluation des fonctions cognitives par test du labyrinthe en Y (Y-maze). 142
3.2.6. Analyses complémentaires prévisionnelles 144
4. Discussion et perspectives 146

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 150

BIBLIOGRAPHIE 152

TABLE DES ILLUSTRATIONS 174

TABLE DES TABLEAUX 178

ADDENDUM 180

ANNEXES 182

Avant-propos

Ce travail de thèse a été réalisé dans l'unité mixte de recherche MitoVasc, au sein de l'équipe MitoLab (Inserm U1083, CNRS 6015) sous la direction des Dr Arnaud Chevrollier et Philippe Codron. Ce projet de thèse s'inscrit dans la continuité d'un stage de Master 1 réalisé sur l'étude du collagène de fibroblastes issus de patients atteints de SLA sporadique, et d'un stage de Master 2 sur l'étude de la localisation intracellulaire de la protéine TDP-43. Ce projet de thèse a été financé par un contrat ministériel de l'Ecole Doctorale Biologie-Santé de l'Université Bretagne-Loire, complété par une 4ème année de thèse financée par la Filière de Santé Maladies Rares SLA et Maladies du Neurone Moteur (FilSLAN). L'Association pour la recherche sur la SLA (ARSLA) a quant à elle financé la grande majorité des besoins matériels utilisés pour ces travaux de recherche.

Une des nombreuses thématiques de l'Unité MitoVasc dirigée par le Dr Guy Lenaers, en collaboration avec le service de neurologie dirigé par le Pr. Christophe Verny, le laboratoire de neuropathologie et le centre SLA du CHU d'Angers, est d'étudier les pathologies neurodégénératives afin d'élucider les mécanismes physiopathologiques impliqués, et d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les maladies neurodégénératives (MND) représentent un enjeu majeur de santé publique en raison de leur prévalence croissante dans une population mondiale vieillissante. Ces maladies entraînent une dégénérescence progressive et irréversible des cellules nerveuses, affectant gravement les fonctions cognitives, motrices et comportementales des individus. Les répercussions sont considérables, tant sur le plan humain que socio-économique, en raison des coûts élevés des soins de santé et de la charge croissante pour les aidants et les systèmes de santé. La recherche de traitements efficaces et de stratégies de prévention est donc cruciale pour atténuer l'impact de ces maladies sur les individus et la société dans son ensemble.

Ce projet de recherche avait pour objectif principal d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), la 3ème MND la plus courante chez l'adulte après la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Dans ce but, nous avons étudié la protéine TDP-43, un acteur central dans cette pathologie, et nous avons tenté de générer un nouveau modèle d'étude murin faisant à l'heure actuelle dans la recherche sur la SLA.

Cette thèse débute par une introduction bibliographique du sujet, pour replacer ce projet dans le contexte et dresser l'état des connaissances actuelles. La section « matériel et méthodes » détaille les techniques utilisées et les analyses effectuées à partir des différents échantillons biologiques utilisés. Les résultats sont présentés en deux parties, la première portant sur l'étude de la dynamique de la protéine TDP-43 en condition physiologique, pour laquelle une collaboration avec l'équipe du Dr Anne-Marie Tassin à l'Institut de Biologie Intégrative de la cellule (I2BC) à Gif-sur-Yvette a été réalisée. La deuxième partie porte sur la genèse d'un nouveau modèle cellulaire et murin de la SLA sporadique, qui a en partie été réalisé à l'aide d'une collaboration avec la CRO (contact research organization) Porsolt (Le Genest-Saint-Isle, France). Pour finir, les résultats déjà obtenus et toujours en cours sont discutés et mis en perspectives quant à leur apport et leur impact sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués et pour le futur de la recherche sur la SLA.

Liste des publications

Bodin A, Greibill L, Gouju J, Letournel F, Pozzi S, Julien JP, Renaud L, Bohl D, Millecamps S, Verny C, Cassereau J, Lenaers G, Chevrollier A, Tassin AM, Codron P. *Transactive response DNA-binding protein 43 is enriched at the centrosome in human cells.* **Brain**. 2023 Sep 1;146(9):3624-3633. (Annexe 1)

Codron P, Letournel F, Marty S, Renaud L, Bodin A, Duchesne M, Verny C, Lenaers G, Duyckaerts C, Julien JP, Cassereau J, Chevrollier A. *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) reveals the nanoscale organization of pathological aggregates in the human brain.* **Neuropathol Appl Neurobiol** 47, 127–142 (2021). (Annexe 3)

Vovard B, Bodin A, Gouju J, de Guilhem de Lataillade A, Derkinderen P, Etcharry-Bouyx F, Chauviré V, Guillet-Pichon V, Verny C, Letournel F, Lenaers G, Chevrollier A, Codron P. *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy Imaging of Multiple System Atrophy Inclusions Suggests Stepwise α-Synuclein Aggregation.* **Mov Disord.** 2024 Feb 15. (Annexe 4)

Bureau J, Manero F, Baris O, Bodin A, Verny C, Chevrollier A, Lenaers G, Cordon P. *Opa1 and MT-Nd6 mutations induce early mitochondrial changes in the retina and prelaminar optic nerve.* [Revisions mineures **Brain Communications** (Oxford Academics)] (Annexe 5)

Liste des Communications

10èmes journées de la recherche sur la SLA et les maladies du neurone moteur (MNM), 9 et 10 octobre 2024, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière Paris, Communication orale « Résultats obtenus au cours de la 4ème année financée par la filière FilSLAN ».

Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale Biologie Santé, 4 et 5 avril 2023, Oniris Nantes, Communication orale « TDP-43 is enriched at the centrosome in human cells ».

Journées de la Recherche Biomédicale Angers-Tours, 2 décembre 2022, Grenier Saint-Jean Angers, Communication orale « TDP-43 is enriched at the centrosome in human cells », **prix de la meilleure communication orale.**

8èmes journées de la recherche sur la SLA et les MNM, 12 et 13 octobre 2022, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière Paris, Communication orale « TDP-43 is enriched at the centrosome in human cells », **Prix communication orale de l'ARSLA.**

Journées Scientifiques de la Structure Fédérative de Recherche, 9 juin 2022, faculté de pharmacie site Davier Angers. Communication affichée « TDP-43 is enriched at the centrosome in human cells ».

Congrès Meetochondrie, 8 au 11 mai 2022, Lège Cap Ferret. Communication affichée « TDP-43 is enriched at the centrosome in human cells ».

Liste des Abréviations

3'UTR	3'UnTranslated Region
ABCC9	ATP binding cassette subfamily C member 9 (gène)
Add2	ARNm de l'Adducine 2 (ou β-adducine)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALS10	Amyotrophic lateral sclerosis type 10 (gène)
ALSFRS-R	ALS Functional Rating Scale – Revised
ALSIN	Gène codant pour la protéine Alsine
AMP	Atrophie Musculaire Progressive
ANG	Gène codant pour l'Angiogénine
APOE	Gène codant pour l'Apolipoprotéine E
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messager
ARNmt	ARN mitochondrial
ARNnc	ARN non codant
ARSLA	Association pour la Recherche sur la SLA
ASO	Oligonucléotides antisens (de l'anglais AntiSense Oligonucleotide)
ASPM	Abnormal Spindle-like Microcephaly-associated (gène)
ATG7	Autophagy related 7 (gène)
ATXN2	Gène codant pour la protéine Ataxine 2
BioGRID	Biological General Repository for Interaction Datasets (base de données)
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility (gène)
BSA	Bovine Serum Albumine
C.elegans	Caenorhabditis elegans
C9ORF72	Région non codante du cadre de lecture ouvert 72 du chromosome 9
CCNF	Gène codant pour la Cycline F
CDC7	Cell Division Cycle 7-related protein kinase
CEP164	CEntrosomal Protein of 164 kDa
CEP350	CEntrosome-associated Protein 350
CHCHD10	Coiled-coil-Helix-Coiled-coil-Helix Domain-containing protein 10
CHMP2B	CHarged Multivesicular body Protein 2b (gène)
CRB	Centre de Ressources Biologiques
CRO	Contact Research Organization
CSNK1δ	Caséine Kinase 1 delta (gène)
CTF	C-Terminal Fragment
CTR	Centrosomes purifiés
CYLD	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD (gène)
DAO	D-Amino-acid Oxidase (gène)
DCTN1	Gène codant pour la protéine Dynactine 1

DDX3X	ATP-dependent RNA helicase DDX3X
DFT	Démence Fronto-Temporale
DLFT	Dégénérescence lobaire frontotemporale
DTT	DiThioThréitol
ELAVL1	ELAV-like protein 1
EWSR1	RNA-binding protein EWS
FDA	Food and Drug Administration
FilSLAN	Filière de Santé Maladies Rares SLA et Maladies du Neurone Moteur
fSLA	SLA familiale
FUS/TLS	FUsed in Sarcoma/Translocated in LipoSarcoma
GFP	Green Fluorescent Protein
GRD	Glycin Rich Domain
GRN	Gène codant pour la Granuline
GSK3β	Glycogen synthase kinase-3 beta
HDAC6	Histone DeACetylase 6
HeLa	Henrietta Lacks (lignée cellulaire de carcinome cervical humain)
hnRNP	Heterogeneous ribonucleoprotein
hnRNPA1	Heterogeneous ribonucleoprotein A1
I	Fraction insoluble
I2BC	Institut de Biologie Intégrative de la Cellule
IL6	Interleukine 6
iPSC	Induced Pluripotent Stem Cells
IR	Indice de réfraction
IT	Intrathecal injection
KCNMB2	Calcium-activated potassium channel subunit β-2 (gène)
KD	KnockDown
kDa	kiloDalton
KE-37	Cellules lymphoblastiques humaines
KO	KnockOut
LATE	Encéphalopathie TDP-43 à prédominance limbique liée à l'âge (de l'anglais Limbic-predominant Age-related TDP-43 Encephalopathy)
LCD	Domaine de faible complexité (de l'anglais Low Complexity Domain)
LCS	Liquide CérébroSpinal
LLPS	Séparation de phase liquide-liquide (de l'anglais Liquid-liquid phase separation)
lncARN	ARN long non codant
MAP1B	Gène codant pour la protéine Microtubule-Associated Protein 1B
MATR3	Gène codant pour la protéine Matrin-3
miARN	MicroARN
MLO	Organite sans membrane (de l'anglais MembraneLess Organelle)
MND	Maladie NeuroDégénérative

MNM	Maladie du Neurone Moteur
MOBP	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein (gène)
MPT	Modification Post-Transcriptionnelle
MTOC	Centre organisateur des microtubules (de l'anglais MicroTubule Organizing Center)
N2A	Neuro-2a
NEAA	Acides aminés non essentiels (de l'anglais Non-Essential Amino Acid)
NEAT1	Nuclear Enriched Abundant Transcript 1 (ARNm)
NEFL	Neurofilament light polypeptide
NEFL, NFL	Neurofilament Light chain
NEK1	Serine/threonine-protein kinase Nek1 (gène)
NES	Signal d'export nucléaire (de l'anglais Nuclear Export Signal)
NFH	Neurofilament Heavy chain
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B (protéine)
NHEJ	Jonction d'extrémités non homologues (de l'anglais Non-Homologous End-Joining) (mécanisme de réparation de l'ADN)
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
NLS	Signal de localisation nucléaire (de l'anglais Nuclear Localization Signal)
NUMA1	Nuclear mitotic apparatus 1 (gène)
OPTN	Gène codant pour la protéine Optineurine
PBH2	Gène codant pour la Prohibitine
PBS	Tampon phosphate salin (de l'anglais Phosphate Buffered Saline)
PCM	Matrice péricentriolaire (de l'anglais PeriCentriolar Matrix)
PCNT	Péricentrine (ARNm)
PFA	ParaFormAldéhyde
PFFs	Fibrilles préformées de TDP-43 (de l'anglais preformed fibrils)
PFN1	Gène codant pour la Profiline-1
PPIA	Gène codant pour la protéine Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
PrLD	Prion-Like Domain
RACK1	Gène codant pour la protéine Small ribosomal subunit protein RACK1
RAN	Traduction non-ATG dépendante (de l'anglais Repeat-Associated Non-ATG translation)
RBP	Protéine de liaison à l'ARN (de l'anglais RNA Binding Protein)
RFP	Red Fluorescent Protein
RNAct	Base de données de prédiction d'interactions ARN/protéine
RNP	RiboNucléoProtéine
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (de l'anglais Reactive Oxygen Spieces)
RPM	Revolutions Per Minute
RRM	Domaine de reconnaissance de l'ARN (de l'anglais RNA Recognition Motif)
S	Fraction Soluble
SCFD1	Sec1 family domain-containing 1 (gène)
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique

SLP	Sclérose Latérale Primitive
SMN	Survie des motoneurones
SNC	Système Nerveux Central
SOD1	SuperOxide Dismutase 1 (gène et protéine)
SQSTM1	Gène codant pour la protéine Sequestosome-1
sSLA	SLA sporadique
STORM	Microscopie à reconstruction optique stochastique (de l'anglais Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)
SUMO	Small Ubiquitin-like MOdifier (protéine)
SURFF	Super-Resolution Radial Fluctuations
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TAF15	TATA-binding protein-associated factor 2N (gène)
TARDBP	Gène codant pour la protéine TDP-43
TBK1	Serine/threonine-protein kinase TBK1 (gène et protéine)
TBS	Tris-Buffered Saline
TDP-43	Transactive response DNA binding protein 43 kDa
TDPBR	TDP-43 Binding Region
TFEB	Transcription Factor EB
TIRF	Fluorescence par réflexion totale interne (de l'anglais Total Internal Reflection Fluorescence)
TMEM106B	Gène codant pour la protéine Transmembrane protein 106B
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α (cytokine)
TTBK1/2	Tau Tubuline Kinase 1 et 2
TUBA4A	Tubulin alpha-4A chain (gène)
UBQLN2	Gène codant pour la protéine Ubiquiline-2
UNC13A	Gène codant pour la protéine Protein unc-13 homolog A
VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C (gène)
VCP	Vasolin Containing Protein (gène)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFα	Vascular Endothelial Growth Factor α
VIH-1	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VPS4B	Gène codant pour Vacuolar Srotein Sorting-associated protein 4B
VSP54	Vacuolar protein sorting-associated protein 54 (gène)
WB	Western Blot
WT	Type Sauvage (de l'anglais Wild Type)

Introduction

1. La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)

1.1. Généralités

La sclérose latérale amyotrophique (SLA), également connue sous le nom de maladie de Charcot, est la troisième maladie neurodégénérative de l'adulte en France. Avec une incidence estimée à 2 cas pour 100 000 habitants, soit environ 1500 nouveaux cas par an (Luna *et al*, 2022), la SLA touche plus de 8 000 personnes en France. Les hommes sont légèrement plus représentés au sein des patients avec 1,3 homme pour 1 femme atteinte de la maladie. Caractérisée par une dégénérescence des neurones moteurs du cortex, des noyaux du tronc cérébral, et de la corne antérieure de la moelle épinière (Kiernan *et al*., 2011), cette pathologie entraîne une paralysie diffuse et progressive qui aboutit au décès des patients en moyenne 20 à 30 mois après l'apparition des premiers symptômes (Chiò *et al*., 2009).

La SLA se présente dans la majorité des cas sous forme sporadique (90% SLA sporadiques ou sSLA) sans cause étiologique identifiée, et à moindre fréquence sous forme héréditaire (10% SLA familiale ou fSLA), liée à des mutations génétiques sur des gènes tels que *SOD1, FUS, C9ORF72, TARDBP*. Des gènes de susceptibilité (plus de 120) ont par ailleurs été identifiés, tels que *SMN* (survie des motoneurones) *VEGF* (vascular endothelial growth factor), *ANG* (angiogénine), *APOE* (Apolipoprotéine E) ou encore *NFH* (neurofilament heavy chain), qui pourraient augmenter le risque de survenue de SLA (Corcia *et al*., 2014 ; Wang MD *et al*., 201). A ces facteurs multi-génétiques, des facteurs environnementaux s'ajoutent et pourraient également influencer le développement de la maladie tels qu'un traumatisme du système nerveux central (SNC), une activité physique soutenue, un tabagisme actif, un déficit en vitamine D, ou encore une exposition aux métaux lourds, pesticides ou solvants (Camu *et al*., 2014 ; Wang *et al*., 2017). Malgré les avancées réalisées sur la compréhension de la SLA, les causes à l'origine de cette pathologie restent incomprises. Les formes génétiques sont de mieux en mieux documentées, mais les formes sporadiques restent inexpliquées.

1.2. Clinique

Classiquement la SLA débute aux alentours de 60 ans, et se manifeste par un déficit moteur diffus, des troubles de la phonation, de la déglutition, et des difficultés respiratoires. La SLA est caractérisée par une grande variabilité phénotypique, allant de formes exclusivement centrales à des formes périphériques, avec des symptômes localisés aux membres, aux muscles respiratoires, ou à l'étage oro-pharyngé. La durée d'évolution de la maladie varie considérablement entre les patients, de quelques mois à plusieurs décennies (Swinnen et Robberecht, 2014). Des formes juvéniles, bien qu'exceptionnelles, sont définies par un âge de survenue inférieure à 25 ans. Le diagnostic, principalement clinique et électrophysiologique, repose sur l'atteinte des motoneurones du cerveau, du tronc cérébral et de la moelle épinière. La clinique de la SLA se caractérise par des signes résultant de l'atteinte sélective des motoneurones responsables du contrôle des muscles volontaires, excluant ceux qui échappent à la volonté, tels que le muscle cardiaque. Trois formes distinctes de SLA émergent en fonction du site initial d'atteinte des motoneurones périphériques. La forme à début "spinal" est

associée à une altération initiale des motoneurones de la moelle épinière, entraînant des troubles de la motricité des membres supérieurs ou inférieurs. La forme à début "bulbaire" est caractérisée par une atteinte initiale des motoneurones du tronc cérébral, induisant des perturbations de la parole et de la déglutition. Cette variante prédomine chez les femmes et commence généralement à un âge plus avancé. Enfin, bien que très rare, il existe aussi une forme à début "respiratoire" où les muscles respiratoires sont les premiers touchés responsables d'une insuffisance respiratoire restrictive et d'un pronostic plus sombre. Des signes cliniques non moteurs peuvent également être présents, tels que des troubles cognitifs (chez près de 50% des patients, 15% remplissant les critères de dégénérescence fronto-temporale), une dysautonomie, un syndrome extrapyramidal, des symptômes douloureux ou sensitifs, ou encore des troubles de l'équilibre (Phukan *et al*., 2011 ; Swinnen et Robberecht, 2014). Cette diversité de manifestations cliniques souligne la complexité diagnostique de la SLA et la nécessité d'une prise en charge globale des patients.

A la différence de la SLA qui touche à la fois les premiers et seconds motoneurones, la Sclérose Latérale Primitive (SLP) affecte exclusivement les premiers motoneurones. C'est une maladie rare, sporadique et idiopathique présente chez moins d'une personne sur 100 000. Habituellement, les symptômes regroupent une spasticité, raideur, réflexes exagérés, faiblesse musculaire, mais sans atrophie musculaire significative au début. Les troubles de la déglutition et de la parole peuvent également survenir. Contrairement à la SLA, l'atteinte respiratoire reste au second plan. Le pronostic et l'espérance de vie des personnes atteintes de SLP sont bien meilleurs que pour les patients atteints de la SLA. A l'inverse de la SLP, l'Atrophie Musculaire Progressive (AMP) touche uniquement les seconds motoneurones du tronc cérébral et de la moelle épinière, responsables d'une faiblesse et d'une atrophie progressive au niveau des membres associées à des crampes et fasciculations, et d'une atteinte bulbaire. L'atteinte des muscles respiratoires conditionne grandement le pronostic. La SLP et l'AMP peuvent toutes deux évoluer vers une SLA au fil du temps, participant au débat de savoir si ces deux pathologies sont des variantes de MNM ou si elles appartiennent au spectre de la SLA.

1.3. Traitements

La recherche clinique sur la SLA a été marquée ces 20 dernières années par une multitude d'essais thérapeutiques négatifs (Mitsumoto *et al*., 2014). Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif de la maladie dans sa forme sporadique. En Europe, seul le Riluzole peut être proposé, ayant pour but de ralentir la progression de la maladie. Son mode d'action n'est pas totalement connu, et il présente une efficacité modeste en augmentant de quelques mois l'espérance de vie des patients (Miller *et al*., 2012).

L'Edaravone a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis en 2017 après avoir démontré une diminution significative du score ALSFRS chez des patients avec une SLA précoce avec une durée d'évolution inférieure à 2 ans et une capacité vitale de 80% ou plus (Writing group & Edaravone, 2017). Son utilisation reste exceptionnelle en France compte tenu de la lourdeur du protocole d'administration (injection intraveineuse quotidienne 10 jours par mois). Une étude de phase 3 récente (Essai ADORE) évaluant l'efficacité d'une formulation orale en prise quotidienne sur le score fonctionnel à 1 an n'a pas permis d'observer de différence significative entre le groupe traité et le groupe placebo (résultats non publiés).

En 2023, le Tofersen a reçu un agrément conditionnel d'utilisation aux Etats-Unis dans le cadre du traitement des patients atteints de SLA liée aux mutations du gène *SOD1*. Le Tofersen est une thérapie par oligonucléotides antisens (ASO) qui cible et dégrade les ARNm afin de réduire la synthèse de la protéine SOD1, résultant d'une aggravation moins importante avec un risque de ventilation permanente diminué (Blair, 2023). En Europe et en France, une étude de phase 3 sur 2 ans est en cours avec des résultats espérés pour 2026. L'utilisation du Tofersen a été autorisée en 2024 pour un accès compassionnel en France.

En dehors de ces traitements, la prise en charge des patients doit être globale et multidisciplinaire (HAS, 2006). Afin d'améliorer la qualité de vie des patients, des soins de kinésithérapie, ergothérapie, orthophonie, psychologie, associés à des dispositifs médicaux d'aide à la communication, respiration, et nutrition sont proposés. Des traitements symptomatiques tels que des antalgiques, myorelaxants, anxiolytiques, thermorégulateurs et anti-inflammatoires peuvent être prescrits au besoin.

En parallèle, de nombreuses études cliniques sont en cours en France et à l'étranger (WVE-004 : ASO pour C9ORF72, REViVALS-1A : thérapie génique pour stimuler facteur de croissance HGF pour la régénération des cellules nerveuses, Verdiperstat : inhibiteur de la neuroinflammation, etc…) et permettront peut-être à l'avenir la mise sur le marché de nouveaux traitements (ARSLA, Les essais thérapeutiques).

2. Mécanismes biologiques de la SLA : le rôle central de la protéine TDP-43

Si les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA restent incertains, un acteur central a été identifié en 2006. La protéine Transactive Response DNA-binding protein-43 (TDP-43) a été observée au sein des agrégats protéiques retrouvés au sein des motoneurones du SNC de patient atteints de SLA (Arai *et al*., 2006 ; Neumann *et al*., 2006). Des mutations sur le gène de *TARDBP* qui code pour la protéine TDP-43 sont à l'origine de formes familiales de SLA (Gitcho *et al*., 2008 ; Kabashi *et al*., 2008 ; Sreedharan *et al*., 2008) et ont contribué à placer TDP-43 comme un acteur central de la maladie. En condition physiologique, la protéine TDP-43 est une protéine ubiquitaire majoritairement nucléaire (Figure 1A) qui en condition pathologique s'agrège dans le cytoplasme des neurones sous forme ubiquitinylée, fragmentées et hyper-phosphorylée. Ces agrégats pathologiques sont observés chez tous les patients atteints de SLA, quelle que soit la forme (sporadique ou familiale, exceptées celles liées aux gènes *SOD1* et *FUS*) et ont par conséquent été désignés comme étant un marqueur pathologique de la SLA (Mackenzie *et al*., 2010).

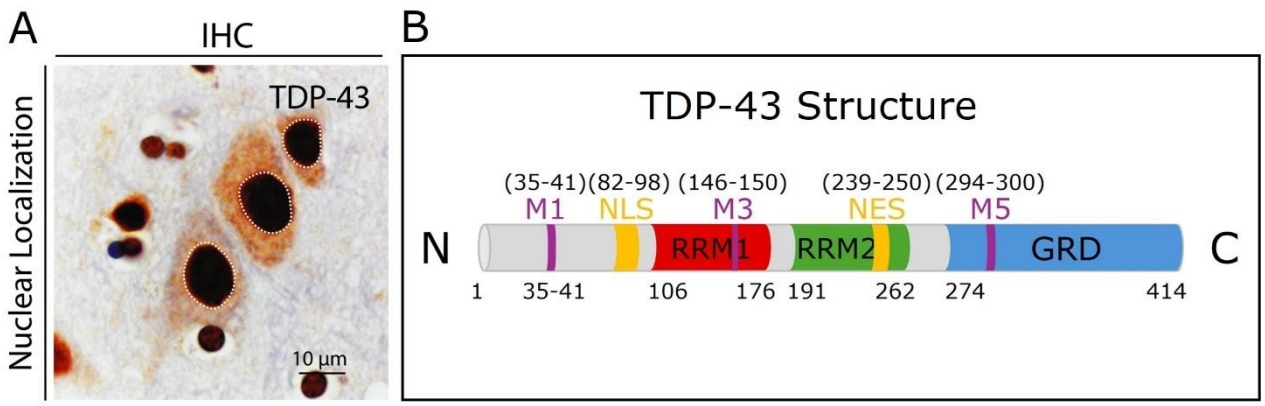


Figure 1 Structure de la protéine TDP-43. *(A) Image représentative de la localisation normale de TDP-43 dans les neurones corticaux (détection immunohistochimique de TDP-43 dans le cortex préfrontal d'un sujet témoin) Codron et al., 2020. (B) Représentation schématique de la structure de la protéine TDP-43 et des différents domaines qui la composent. RRM : RNA recognition motifs. GRD : Glycin Rich Domain. NLS : nuclear localization sequence. NES : nuclear export sequence. M1, M3, M5 : séquences d'adressage mitochondrial.*

2.1. TDP-43 en condition physiologique

La protéine TDP-43, codée par le gène *TARDBP*, est une protéine de liaison à l'ARN (RNA Binding Protein = RBP) appartenant à la famille des hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein). Elle est dotée de deux domaines de liaison à l'ARN nommés RNA Recognition Motif (RRM1 et RRM2) et d'un domaine de faible complexité de type Prion (PrLD) dans son domaine C-terminal (Figure 1B). C'est une protéine ubiquitaire qui participe activement à de nombreux processus cellulaires essentiels au métabolisme de l'ARN tels que la transcription, l'épissage, la stabilisation et le transport. Bien que la distribution principale de TDP-43 soit nucléaire, on la retrouve également en moindre proportion dans le cytoplasme où elle y effectue le transfert et le transport d'ARNm, ou dans les synapses où elle participe à la traduction et l'épissage de protéines locales. On estime que la protéine TDP-43 est capable de prendre en charge 30% du transcriptome total et qu'elle aurait plus de 6000 ARN cibles au sein du cerveau (Ling *et al* 2013).

2.1.1. Le gène *TARDBP*

Le gène *TARDBP* parfois appelé *ALS10* est localisé sur le chromosome 1 en position 1p36.22 et est hautement conservé chez toutes les espèces (Stover *et al*., 2004 ; Wang *et al*., 2004) ce qui reflète l'importance de la protéine pour laquelle il code. Les 14 kb qui composent ce gène codent pour 6 exons et un domaine de liaison TDPBR (TDP Binding Region) situé dans la région 3'UTR. Il existe une trentaine de transcrits de ce gène : un transcrit majoritaire qui donne la protéine TDP-43 sauvage, 12 transcrits minoritaires qui donnent des protéines de différentes tailles, 12 transcrits qui sont dégradés, et 6 transcrits non codants. Chez l'Homme, le gène *TARDBP* est exprimé dans tous les tissus puisqu'il code pour une protéine ubiquitaire. Son expression est finement régulée par un rétrocontrôle négatif dépendant de la concentration nucléaire en protéine TDP-43 (Ayala *et al*., 2011). En effet lorsque la concentration nucléaire en protéines TDP-43 est suffisante, les protéines TDP-43 vont se fixer sur la région TDPBR de son propre ARNm et ainsi réprimer sa traduction. A l'inverse, lorsque la concentration en protéines TDP-43 nucléaire est insuffisante, elles ne seront pas suffisamment nombreuses pour couvrir les TDPBR des ARN pré-messager, entrainant la synthèse de nouvelles protéines.

2.1.2. La protéine TDP-43

Originellement, la protéine TDP-43 a été décrite après avoir été identifiée comme une protéine qui réprime la transcription du VIH-1 (Ou *et al*., 1995). Ce n'est que bien plus tard, en 2006 après avoir été observée au sein d'agrégats pathologiques de SNC de patients atteints de SLA (Arai *et al*., 2006 ; Neumann *et al*., 2006) qu'elle a été reliée à la maladie.

La protéine TDP-43 fait 43 kDa et est composée de 414 acides aminés. Elle est composée de deux domaines de liaison à l'ADN et à l'ARN nommés RRM 1 et 2 (RNA Recognition Motif), d'un domaine N-terminal avec un signal d'import nucléaire NLS (Nuclear Localisation Sequence), d'un domaine d'export nucléaire NES (Nuclear Export Signal), de 3 domaines d'adressage mitochondriaux (M1, M3, M5) (Wang *et al*., 2016) et d'un domaine C-terminal riche en glycines (Figure 1B). A ce jour la structure 3D de la protéine n'est pas complètement connue.

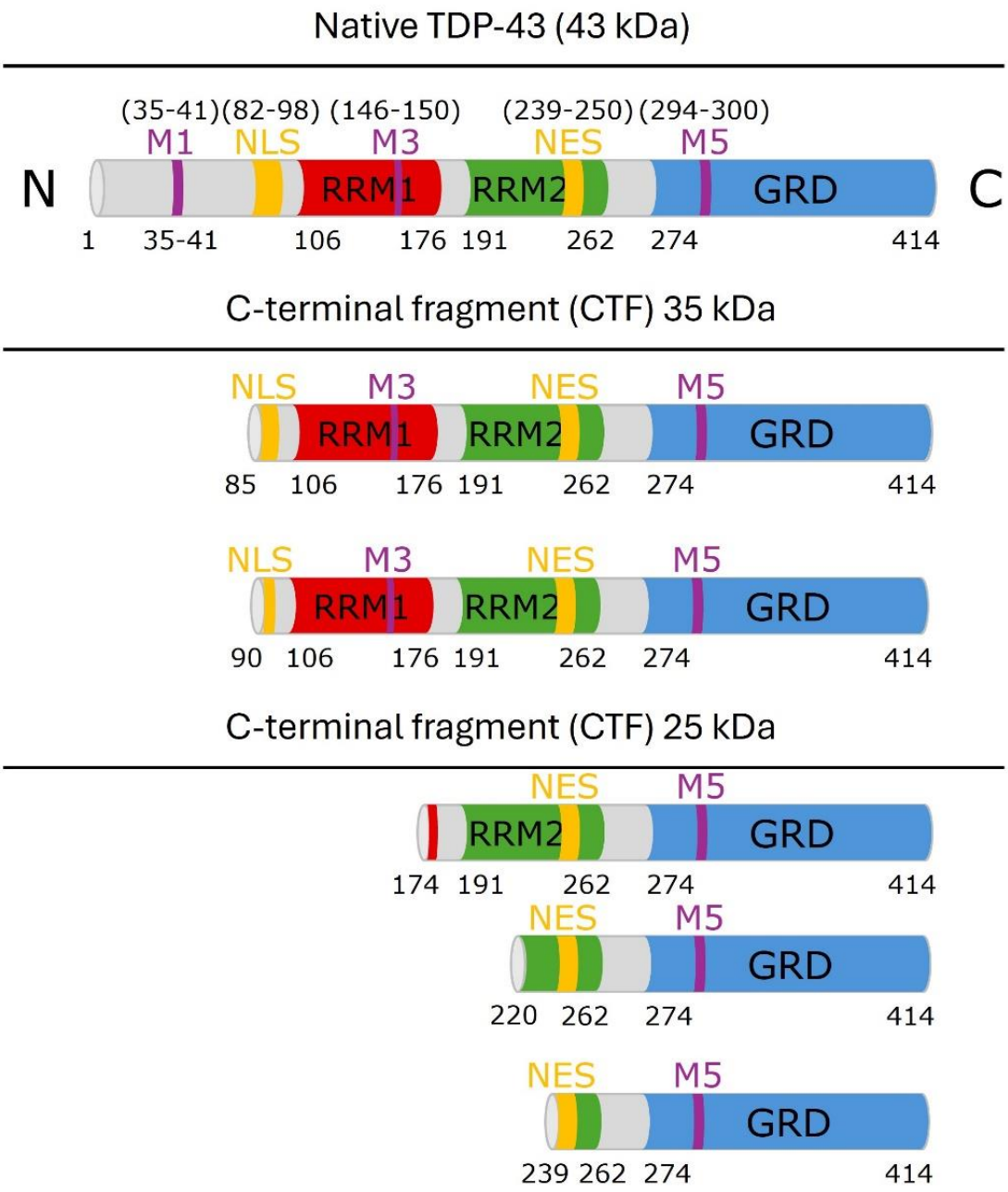


Figure 2 Représentation schématique de la structure des fragments C-terminaux (CTF) retrouvés chez les patients atteints de SLA. *Les CTFs de 35 kDa possèdent un NLS tronqué, et les CTF de 25 kDa en sont totalement délétés ainsi que du RRM1.*

La protéine TDP-43 est fonctionnelle sous forme d'homodimère mais il existe un équilibre entre les monomères et les dimères dans la cellule en fonction des besoins, et la dimérisation de la protéine est médiée par son domaine N-terminal. Ce dernier permet également la formation d'oligomères qui contribuent à la formation de gouttelettes lipidiques par un phénomène de séparation de phases liquide-liquide LLPS et à la formation de granules de stress (Afroz *et al*., 2017). Le domaine N-terminal est un fragment d'environ 10 kDa (1-77 aa) qui contient le NLS et qui est par conséquent important pour la localisation nucléaire physiologique de la protéine (Zhang *et al*., 2013).

Les deux domaines RRM représentent environ 20 kDa à eux deux, et sont des RRM canoniques de la famille des hnRNP. Ils ont une spécificité de reconnaissance des motifs TG de l'ADN et GU de l'ARN (Buratti et Baralle, 2001), mais le RRM1 a une affinité plus forte pour les acides nucléiques que le RRM2 (Lukavsky., 2013), lui conférant un rôle plus important dans l'interaction ARN/ADN-protéine. C'est grâce à ses RRM que la protéine TDP-43 reconnait le domaine TDPBR en 3'UTR de son propre ARNm, et est capable d'autoréguler son niveau d'expression (Ayala *et al*., 2011). Les RRM 1 et 2 peuvent interagir entre eux et ainsi participer à l'agrégation de la protéine (Agrawal *et al*., 2019).

La protéine TDP-43 est majoritairement nucléaire, mais une faible quantité est retrouvée dans le cytoplasme où elle joue des rôles importants sur le métabolisme des ARN. Pour cela, les signaux d'import et d'export nucléaire (NLS et NES) permettent à la protéine de quitter le noyau pour effectuer ses fonctions cytoplasmiques, puis de revenir dans le noyau une fois ses tâches accomplies. Il a été démontré que des mutations dans le NLS de la protéine TDP-43 empêchent la protéine de se relocaliser au sein du noyau après son export nucléaire, participant à l'agrégation cytoplasmique de la protéine (Nishimura *et al*., 2010).

Le domaine C-terminal (277-414 aa) est un domaine dit de faible complexité LCD (Low Complexity Domain) ou Prion-like PrLD (Prion Like Domain) riche en résidus glycine, glutamines et asparagines. Ce domaine est crucial pour l'interaction protéine-protéine grâce à sa structure intrinsèquement désordonnée ce qui lui confère une flexibilité permettant de se conformer à de nombreuses structures avec lesquelles interagir (Ntountoumi *et al*., 2019). Le domaine C-terminal est important pour le phénomène de séparation de phase liquide-liquide (Li *et al*., 2018), pour la formation de granules de stress, et pour la formation d'organelles non membranaires (MLO : membrane less organelle) (Conicella *et al*., 2016 ; Li *et al*., 2018 1 et 2). La majorité des mutations identifiées dans le gène *TARDBP* sont retrouvées dans le domaine C-terminal, et il possède également les sites de phosphorylation associés à la SLA. Des formes tronquées du domaine C-terminal de 25 et 35 kDa, les CTF (C-Terminal Fragment) (Figure 2) sont retrouvées dans les inclusions protéiques présentes chez les patients atteints de SLA. Par conséquent, le domaine C-terminal joue un rôle clé dans les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA.

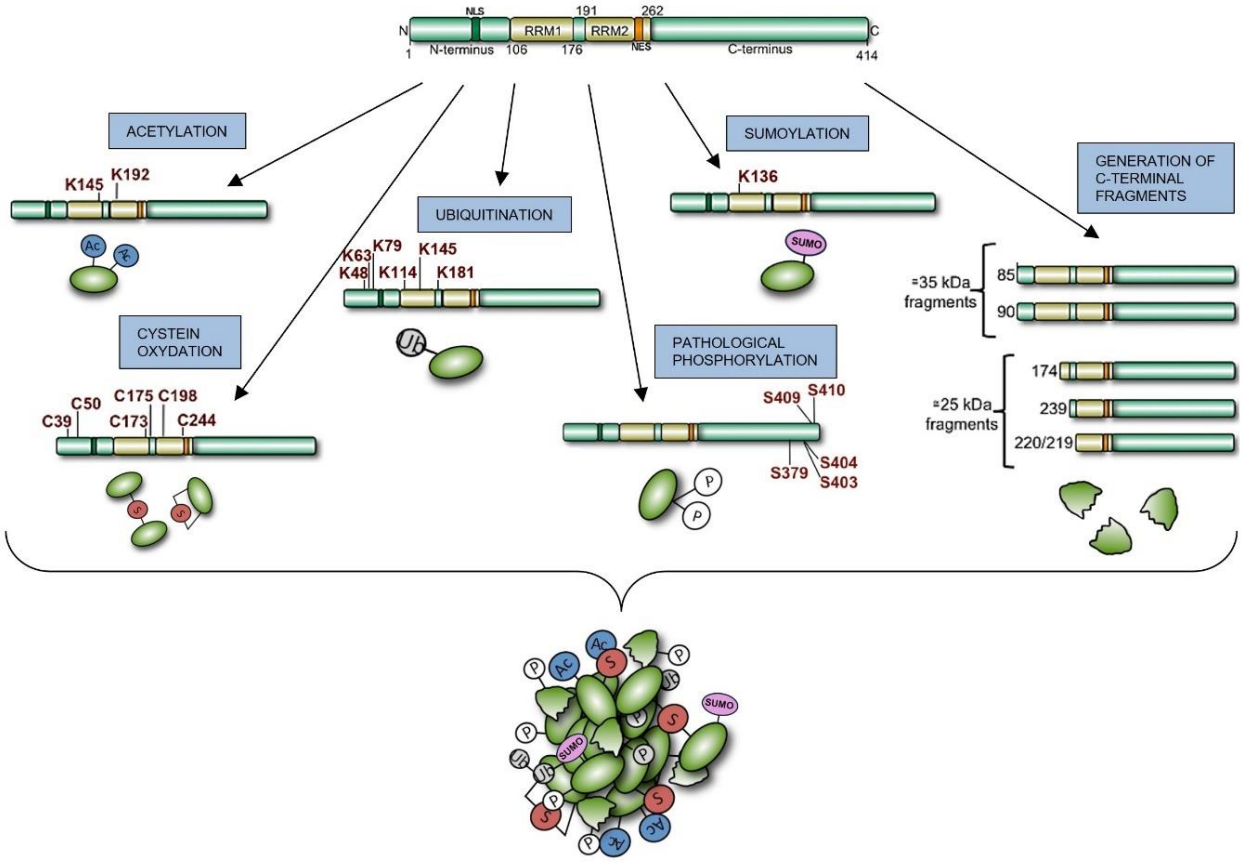


Figure 3 Schéma des différentes modifications post-transcriptionnelles de la protéine TDP-43. *L'ubiquitination et la phosphorylation représentent les principales modifications post-traductionnelles de la protéine TDP-43 à la suite d'un stress. Ce stress peut aussi induire une acétylation, une sumoylation de la protéine, et une oxydation des cystéines. Ces modifications post-transcriptionnelles influent sur les fonctions de la protéine TDP-43 et favorisent son agrégation. Le stress cellulaire provoque également la génération de fragments C-terminaux par clivage protéolytique par les Caspases et les Calpaïnes. Ces fragments sont généralement toxiques pour les cellules et ont tendance à s'accumuler dans le cytoplasme où ils contribuent à l'agrégation de la protéine TDP-43 à la suite d'un stress cellulaire supplémentaire. (Schéma adapté à partir de Buratti 2018).*

2.1.3. Modifications post-transcriptionnelles

Les modifications post-transcriptionnelles (MPT), sont retrouvées chez plus de la moitié des protéines d'une cellule eucaryote, parfois en réponse à un stimulus environnemental, et sont des phénomènes réversibles. Les principales MPT sont la phosphorylation, l'ubiquitination, la glycosylation et l'acétylation. Leur importance est cruciale pour les protéines et elles permettent de moduler leur stabilité, solubilité, localisation, interactions et leur dégradation. Concernant la protéine TDP-43, six modifications post-transcriptionnelles ont été décrites : la phosphorylation, l'acétylation, l'oxydation des cystéines, la fragmentation de TDP-43, l'ubiquitination, et la SUMOylation (Buratti, 2018) (Figure 3).

En condition physiologique, la protéine TDP-43 possède 64 sites de phosphorylation potentiels, mais deux sites majeurs, les sérines 409 et 410 sont impliqués en condition pathologique (Neumann *et al*., 2009). L'hyperphosphorylation de la protéine TDP-43 est un marqueur pathologique observé dans le cerveau de patients atteints de SLA (Hasegawa *et al*., 2008). La phosphorylation de la protéine TDP-43 influence ses fonctions physiologiques, notamment sa liaison à l'ARN, l'épissage alternatif, sa localisation, la séparation de phases, l'agrégation et sa clairance. Pour autant, il est difficile de statuer sur l'impact de cette phosphorylation en pathologie puisque certaines études démontrent qu'elle favoriserait l'agrégation, alors que d'autres à l'inverse ont démontré qu'elle préviendrait l'agrégation (Li *et al*., 2011). La phosphorylation semble malgré tout être protectrice contre le clivage par la calpaïne, à l'origine de la formation de certains CTF.

L'acétylation est une MPT qui consiste en l'ajout d'un groupement acétyle sur une lysine par des acétyltransférases. Elle est suspectée d'avoir un lien dans la SLA car des lésions avec la protéine TDP-43 acétylée ont été retrouvées dans la moelle épinière de patients SLA (Cohen *et al*., 2015). Les plus connues ont lieu sur la lysine 145 dans le RRM1 et la lysine 192 dans le RRM2 (Cohen *et al*., 2015). L'acétylation diminue la capacité de TDP-43 à se lier aux ARN via ses RRM.

L'oxydation des cystéines consiste en la formation d'un pont disulfure entre 2 cystéines en réponse à un stress oxydant. Sur la protéine TDP-43, la formation de pont disulfure peut avoir lieu sur les cystéines en position 39, 50, 173, 175, 198 et 244. L'oxydation des cystéines entraine des modifications sur la localisation, la conformation et la solubilité de TDP-43 en cas de stress oxydatif (Cohen *et al*., 2012 ; Rabdano *et al*., 2017).

La fragmentation de TDP-43 conduit à la genèse de C-terminal fragment (CTF) de 25 et 35 kDa retrouvés dans les agrégats des patients atteints de SLA (Neumann *et al*., 2006). Le clivage de la protéine TDP-43 pour former les CTF n'est pas réversible contrairement aux autres MPT, et est induit par des caspases à la suite d'un stress (caspase 3 et 7 = CTF 35kDa ; caspase 4 et calpaïne = CTF 25 kDa) (Li *et al*., 2015). Il existe 2 isoformes de CTF 35 kDa qui contiennent toutes deux une partie du NLS, le NES, les domaines RRM1 et 2 et le LCD. Les 3 isoformes de CTF 25 kDa ne contiennent pas le NLS ni le RRM1 (Buratti, 2018) (Figure 2). Ces CTF sont toxiques et impliqués en pathologie car ils ne possèdent pas de NLS ce qui les empêche de retourner dans le noyau après leur export nucléaire, par conséquent ils ne peuvent pas exercer leurs fonctions physiologiques nucléaires et s'accumulent dans le cytoplasme. En revanche ils possèdent tous l'extrémité C-terminale de la protéine qui possède des propriétés prion-like et donc une propension à l'agrégation augmentée

(Shimonaka *et al*., 2016). De plus, il a été démontré qu'une surexpression des CTF induit une agrégation de la protéine endogène (Ishii *et al*., 2017).

L'ubiquitination est une réaction enzymatique qui permet l'ajout d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine sur une lysine acceptrice. Le rôle principal de l'ubiquitination est la dégradation des protéines par le protéasome, mais elle intervient également dans la régulation de la localisation cellulaire, dans le trafic intracellulaire, dans le remodelage de la chromatine et la réparation de l'ADN. L'ubiquitine est un des premiers composants des agrégats à avoir été identifié chez les patients atteints de SLA (Leigh *et al*., 1991). Depuis, de nombreux sites d'ubiquitination de TDP-43 ont été décrits sur les lysines 48, 63, 79, 102, 114, 145 et 181(Hans *et al*., 2018).

La sumoylation est une MPT faisant intervenir une protéine SUMO (Small Ubiquitine-like MOdifiers). Elle consiste en la liaison covalente réversible d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine dans la majorité des cas. La sumoylation joue sur la capacité d'interaction avec d'autres protéines, sur le changement de conformation, et/ou peut favoriser d'autres MPT. Elle participe à la régulation de certaines voies de phosphorylation, et joue un rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique et dans la transmission synaptique (Feligioni *et al*., 2009). A ce jour, un site potentiel de sumoylation a été identifié sur TDP-43 (Lysine 136), et jouerai un rôle dans la formation d'agrégats cytoplasmiques de TDP-43 (Maurel *et al*., 2020).

2.1.4. Fonctions de la protéine TDP-43

a) Transcription

La protéine TDP-43 est connue pour jouer un rôle dans la transcription depuis qu'elle a été identifiée comme un facteur de transcription du VIH-1 (Ou *et al*., 1995) et d'autres gènes (*SP-10, TNF-α, VPS4B*). La protéine TDP-43 a été retrouvée au niveau des fibres de périchromatine et des sites de transcription actifs (Casafonts *et al*., 2009). TDP-43 joue un rôle dans la transcription des gènes codants et non codants à l'échelle du génome (Morera *et al*., 2019). Parmi les gènes codants pour les protéines, TDP-43 serait majoritairement impliquée dans la transcription des gènes d'une longueur inférieure à 30 000 paires de bases. Le rôle précis de TDP-43 dans la transcription n'est pas très bien établi mais elle semblerait agir par un mécanisme qui ne nécessite pas d'interaction directe avec l'ARN polymérase II (Morera *et al*., 2019). La protéine TDP-43 semble donc jouer un rôle indirect essentiel dans la régulation de la transcription en se liant aux ARN naissants (Figure 4).

b) Réparation de l'ADN

Plusieurs études suggèrent que la protéine TDP-43 serait impliquée dans la prévention et la réparation des dommages de l'ADN en étant recrutée sur les sites de cassure (Mitra *et al*., 2019 ; Hill *et al*., 2016). Des études ont mis en avant une augmentation des dommages de l'ADN à la suite d'une déplétion de la protéine TDP-43 sous-tendant une implication de cette dernière dans le maintien du génome (Hill *et al*., 2016 ; Kawaguchi *et al*., 2020). En effet, la protéine TDP-43 se lie à la machinerie qui assure le maintien de l'intégrité de l'ADN (Kawaguchi *et al*., 2020), et elle a été identifiée comme un composant de la voie de réparation des cassures doubles brins de l'ADN médiée par la voie de jonction des extrémités non homologues (NHEJ = non homologous end joining) (Mitra *et al*., 2019).

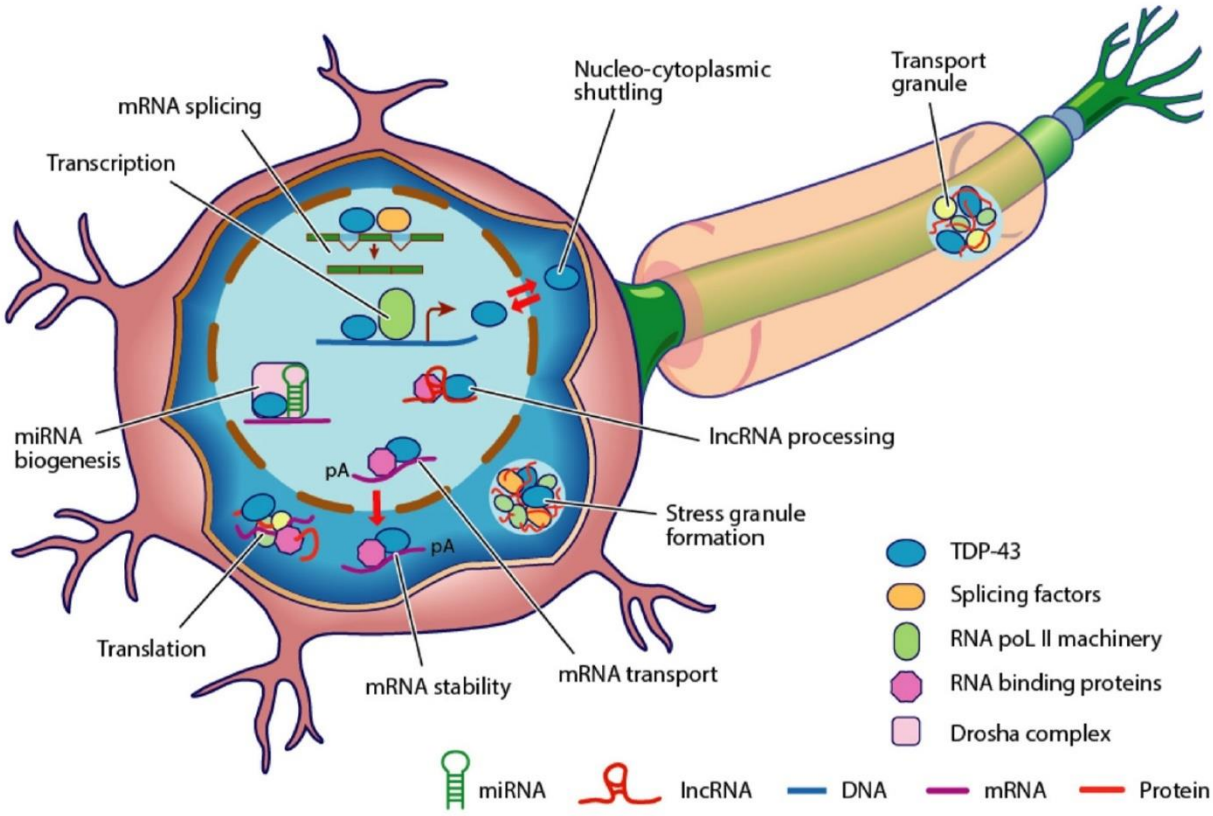


Figure 4 Représentation schématique des principales fonctions de la protéine TDP-43. *La protéine TDP-43 joue un rôle essentiel dans le métabolisme des ARN. Dans le noyau elle participe à la transcription ainsi qu'à l'épissage d'ARNm. Elle joue également un rôle essentiel dans la genèse de miARN et lncARN. Au niveau cytoplasmique elle participe à la stabilisation, au transport et à la traduction d'ARNm. Enfin, en condition de stress elle participe à la formation de granules de stress. (Schéma issu de De Boer et al., 2021).*

c) Stabilité des ARNm

L'expression génétique peut être régulée au niveau post-transcriptionnel en ajustant la stabilité de l'ARNm, et les RBP qui se lient aux ARNm peuvent réguler ce processus en favorisant ou en empêchant le recrutement de la machinerie de dégradation des ARNm (Wu et Brewer, 2012). La protéine TDP-43 se lie à la région 3'UTR de nombreux ARNm (Tollervey *et al*., 2011), ce qui lui confère un rôle dans la stabilisation et le transport de ces derniers (Figure 4). Dans le cas de certains ARNm, TDP-43 semble favoriser la stabilité de ces ARNm (NEFL, Add2, HDAC6) (Strong *et al*., 2007 ; Costessi *et al*., 2014 ; Fiesel *et al*., 2010), à l'inverse pour d'autres elle semble y être défavorable (VEGFa, Progranulin) (Colombrita *et al*., 2012). A travers son rôle de stabilisation des ARNm, la protéine TDP-43 pourrait donc indirectement moduler préférentiellement l'expression de certains gènes.

d) Transport des ARNm

TDP-43 forme des ribonucléoprotéines (RNP = association d'un ARNm et d'une RBP) pour assurer le transport des ARNm dans la cellule (Birsa *et al*., 2020) (Figure 4). Ce transport se fait le long du cytosquelette de microtubules de façon bidirectionnelle (Alami *et al*., 2014). Le transport des ARNm est un mécanisme essentiel pour le maintien du protéome synaptique et des fonctions neuronales. Les synapses des neurones sont souvent très éloignées du corps cellulaire, le transport des ARNm pour permettre une traduction locale est donc primordial pour ces cellules polarisées.

e) Traduction

Le rôle précis de TDP-43 dans la traduction reste à préciser mais des études de protéomiques ont rapporté que TDP-43 interagit avec des sous unités ribosomales et des facteurs de régulation de la traduction (Freibaum *et al*., 2010) (Figure 4). L'importance de TDP-43 dans la régulation de la traduction locale a été démontrée pour la première fois dans les neurones d'hippocampe de rat, où l'on a constaté que TDP-43 agissait comme un répresseur de la traduction (Wang *et al*., 2008). Puis, il a été démontré que TDP-43 interagit avec la protéine RACK1 qui est un régulateur connu de la traduction dépendante de l'activité (Russo *et al*., 2017). De plus, TDP-43 serait capable de réguler positivement ou négativement la traduction en fonction de ses cibles, par conséquent cette protéine joue probablement un rôle indirect dans la régulation de l'expression de certaines protéines en modulant la traduction de transcrits spécifiques.

f) Epissage

L'épissage alternatif utilise le spliceosome, un complexe protéique pour permettre la maturation des ARN pré-messager en ARNm en éliminant les introns. TDP-43 semble réguler l'épissage (Figure 4), en se liant à des protéines impliquées dans ce processus, majoritairement des hnRNP (Freibaum *et al*., 2010). TDP-43 régule l'épissage de nombreux transcrits qui codent pour des protéines impliquées dans la survie neuronale ainsi que des protéines en lien avec des pathologies neurodégénératives (Tollervey *et al*., 2011). En effet, TDP-43 semble réguler l'épissage alternatif de hnRNP A1 (Deshaies *et al*., 2018) et Tau (Gu *et al*., 2017). Il a également été observé un changement d'épissage alternatif associé à des niveaux réduits de TDP-43 qui entrainaient la réduction de l'inclusion de certains exons (Tollervey *et al*., 2011). De plus, des analyses transcriptomiques

réalisées chez des patients atteints de SLA/DFT et sur modèles animaux ont montrés que la protéine TDP-43 est capable de réprimer l'inclusion d'exons cryptiques (Ling *et al*., 2015 ; Tan *et al*., 2016). Les exons cryptiques sont normalement exclus de l'ARNm mature, mais lorsqu'ils sont insérés, ils entrainent une modification du cadre de lecture qui conduit à la formation d'un codon stop et donc à une protéine tronquée, ou bien à l'expression d'une protéine anormale dite cryptique (Buratti, 2021).

g) Processing des ARN non codants (miARN et lncARN)

Les ARN non codants (ARNnc) regroupent les miARN (microARN) et les lncARN (ARN long non codants), qui sont des ARN dont le rôle n'est pas de produire des protéines mais de réguler l'expression des gènes. Les miARN sont des ARN courts qui jouent un rôle important dans la régulation de la stabilité et de la traduction des ARNm. Ils sont importants pour la survie des motoneurones et une dérégulation des miARN a été associée à la SLA (Emde *et al*., 2015 ; Rinchetti *et al*., 2018 ; Haramati *et al*., 2010). TDP-43 est impliquée dans la maturation des miARN en se liant à des miARN immatures ou aux complexes Drosha/DICER responsables de la maturation de ces derniers (Buratti *et al*., 2010 ; Kawahara et Mieda-Sato, 2012) (Figure 4). Les lncARN contiennent plus de 200 nucléotides et sont notamment localisés au sein des paraspeckles, des complexes nucléaires où un lncRNA sert d'échafaudage pour l'assemblage de plusieurs protéines (Naganuma *et al*., 2012). Les fonctions des paraspeckles décrites jusqu'à présent comprennent la rétention nucléaire d'ARN spécifiques, la régulation de l'expression génique par la séquestration de facteurs de transcription et la modulation de la biogenèse des ARNm. Le lncARN NEAT1 est essentiel pour la structure des paraspeckles (Clemson *et al*., 2009) et a été identifié dans les cerveaux de patients atteints de SLA (Nishimoto *et al*., 2021). Les interactions de NEAT1 avec les protéines de liaison de l'ARN associées à la SLA ont été étudiées et il a été démontré que TDP-43 était enrichie dans les paraspeckles et se liait directement aux transcrits de NEAT1 (Gagliardi *et al*., 2018).

h) Réponse au stress et phénomène de séparation de phase liquide-liquide (LLPS)

En réponse à un stress environnemental (stress oxydatif, choc thermique, stress osmotique), des organelles sans membranes (MLO) tels que des granules de stress cytoplasmiques peuvent être formés, et désassemblés aussitôt la fin du stress (Anderson et Kedersha, 2008). TDP-43 est impliquée dans la formation de ces granules de stress notamment grâce à son domaine C-terminal pour cloisonner les ARNm de maintenance le temps du stress et favoriser la traduction des ARNm de réponse au stress (Colombrita *et al*., 2009) (Figure 4). La formation de ces granules de stress est médiée par le phénomène de séparation de phase liquide-liquide (LLPS). La LLPS est un phénomène omniprésent au sein des cellules à l'origine de la formation de compartiments sans membrane, permettant la régulation de réactions biochimiques, la séquestration de facteurs toxiques ou plus généralement l'organisation subcellulaire. Un certain nombre de RBP dont la mutation est à l'origine de formes familiales de SLA ont la capacité de réaliser une séparation de phase grâce à leur domaine C-terminal, c'est le cas notamment de TDP-43 (Babinchak *et al*., 2019). TDP-43 joue donc un rôle important dans les phénomènes de LLPS et dans la réponse au stress, en particulier via sa capacité à former des granules de stress.

i) Mitochondrie

Un nombre croissant d'éléments laissent penser qu'un dysfonctionnement mitochondrial serait impliqué dans la physiopathologie de la SLA, sans pour autant savoir si cela est dû à un rôle direct des protéines liées à la SLA sur la fonction et la dynamique mitochondriale, ou plutôt une conséquence de la dégénérescence neuronale et de l'inflammation induite. La protéine TDP-43 possède des domaines d'adressage mitochondriaux (M1, M3, M5) qui laissent supposer un rôle physiologique de cette protéine au sein même de la mitochondrie (Wang *et al*., 2016). Ce travail, publié dans *Nature Medicine*, a démontré que TDP-43 est localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale où elle empêcherait la traduction de plusieurs ARN mitochondriaux (ARNmt) qui codent pour des sous unités de la chaine respiratoire (Wang *et al*., 2016). Par ailleurs, TDP-43 jouerait un rôle dans le maintien de l'homéostasie mitochondriale grâce au maintien de la stabilité des transcrits mitochondriaux (Izumikawa *et al*., 2017). Une interaction de la protéine TDP-43 a enfin été décrite avec la prohibitine (PBH2), une protéine impliquée dans la mitophagie (Davis *et al*., 2018).

j) Autophagie

L'autophagie est un mécanisme physiologique homéostatique utilisé par la cellule pour dégrader et recycler les composants intracellulaires. C'est un processus finement régulé par de nombreuses protéines, dont des protéines qui sont connues pour être mutées dans les formes de fSLA. TDP-43 jouerait un rôle dans l'autophagie depuis que des knockdown (KO) du gène *TARDBP* ont démontrés des altérations de l'autophagie et des défauts de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Bose *et al*., 2011 ; Torres *et al*., 2018 ; Xia *et al*., 2016). L'implication de TDP-43 dans la régulation de l'autophagie supporte l'idée que ce processus essentiel à la clairance des agrégats cytoplasmiques, peut être impacté dans la physiopathologie de la SLA.

k) Fonctions neuronales et rôle synaptique

La protéine TDP-43 est essentielle au développement du SNC, depuis le développement embryonnaire précoce jusqu'à l'âge adulte. En effet, il a été montré que le niveau d'expression de TDP-43 est élevé au cours du développement embryonnaire, puis diminue progressivement mais persiste au cours du développement postnatal. De plus, des KO du gène *TARDBP* entrainent un décès embryonnaire aux stades précoces chez la souris (Sephton *et al*., 2010), ce qui démontre l'importance neurodéveloppementale de la protéine TDP-43. Mais TDP-43 joue également un rôle important dans le SNC à un stade plus mature, en post-natal jusqu'à l'âge adulte. La traduction locale est un mécanisme clé pour de nombreuses fonctions neuronales telles que le développement de neurite, la formation et la stabilisation synaptique ou encore la maturation et la plasticité cérébrale (Holt et Schuman, 2013). En ce sens, la protéine TDP-43 qui joue des rôles variés sur le métabolisme des ARN, peut de ce fait affecter l'activité neuronale de différentes façons (modulation de l'expression et de l'épissage de certains transcrits, modulation du transport, de la stabilité et ou de la traduction d'ARNm spécifiques).

La protéine TDP-43 est retrouvée au niveau des terminaisons synaptiques. TDP-43 est impliquée dans l'organisation des microtubules synaptiques et interagit avec l'ARNm futsch/MAP1B, qui est essentiel pour la croissance synaptique et la formation des boutons synaptiques (Godena *et al*., 2011). Une réduction ou une augmentation des niveaux d'expression de TDP-43 sont associées à une altération de la morphologie des

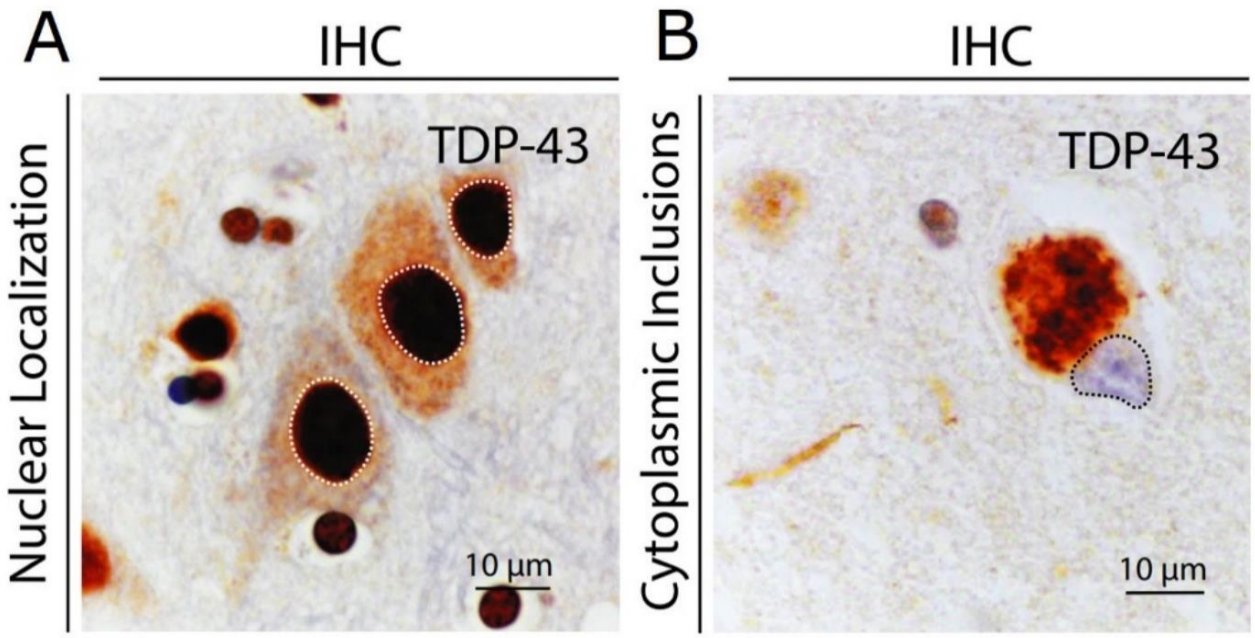


Figure 5 Agrégats pathologiques de TDP-43 retrouvés chez les patients atteints de SLA. *(A) Image représentative de la localisation normale de TDP-43 (signal brun foncé) dans les neurones corticaux en condition physiologique dans les neurones corticaux d'un sujet témoin. (B) Image représentative des inclusions cytoplasmiques de TDP-43 en condition pathologique dans un neurone cortical d'un patient atteint de SLA. La protéine TDP-43 normalement majoritairement nucléaire (A) est relocalisée et agrégée dans le cytoplasme des neurones moteurs des patients associé à une perte d'expression nucléaire (signal bleu-violet) (B). Issu de Codron et al., 2020.*

neurites (Han *et al*., 2013 ; Herzog *et al*., 2017). La surexpression de TDP-43 chez C. elegans entraîne la formation de synapses anormales, mettant en évidence son potentiel neurotoxique lorsqu'elle est mal localisée ou surexprimée (Ash *et al*., 2010). Sa mauvaise localisation ou sa surexpression peut entraîner un dysfonctionnement synaptique et une neurotoxicité, contribuant ainsi à la pathogenèse de maladies neurodégénératives telles que la SLA.

2.2. TDP-43 en condition pathologique

Comme évoqué précédemment, en condition pathologique, la protéine TDP-43 normalement nucléaire, est retrouvée agrégée dans le cytoplasme des neurones sous forme ubiquitinylée, fragmentées et hyper-phosphorylée (Figure 5). Ces agrégats pathologiques sont observés chez tous les patients atteints de SLA, quelle que soit la forme (sporadique ou familiale, exceptées celles liées aux gènes *SOD1* et *FUS*) et ont par conséquent été désignés comme étant un marqueur pathologique de la SLA (Mackenzie *et al*., 2010). Cette relocalisation cytoplasmique de la protéine a deux conséquences, premièrement un gain de fonction toxique induit par les agrégats cytoplasmiques, et une perte de fonction nucléaire résultant de la perte du pool nucléaire de TDP-43. De ce fait, les agrégats cytoplasmiques de TDP-43 jouent un rôle central dans la neurodégénérescence observée chez les patients atteints de SLA (Hergesheimer *et al*., 2019).

2.2.1. Gain de fonction toxique : formation d'agrégats cytoplasmiques

Les mécanismes à l'origine de la formation des agrégats sont débattus mais sont assurément la résultante de l'accumulation de plusieurs évènements, causes ou conséquences de l'agrégation. Plusieurs phénomènes peuvent-être à l'origine d'un défaut de la localisation de la protéine TDP-43 induisant une augmentation anormale de la concentration cytoplasmique telles que des mutations dans le NLS de la protéine, un stress oxydatif, un dysfonctionnement des mécanismes de régulation de l'homéostasie protéique, une altération du transport nucléocytoplasmique, ou encore une perturbation de la régulation des ARNm qui impacteraient la localisation de la protéine TDP-43.

En effet, lorsqu'une protéine est présente en trop grande concentration dans le cytoplasme, elle a tendance à changer de conformation et s'agréger. L'agrégation de cette protéine peut ensuite elle-même participer à la co-agrégation d'autres protéines (phénomène « prion-like »). Des protéines telles que p62, l'ubiquitine et des protéines chaperonnes sont retrouvées piégées dans ces agrégats pathologiques (King *et al*., 2011 ; Yang et Hu, 2016). Ceci laisse penser que ces protéines ne peuvent plus effectuer leurs fonctions physiologiques et donc participer à l'élimination par le protéasome pour l'ubiquitine, ou le bon repliement des protéines pour les protéines chaperonnes. Aussi, un dépassement des mécanismes de maintien de l'homéostasie protéique tels que le système ubiquitine-protéasome ou l'autophagie pourrait participer à la genèse des agrégats cytoplasmiques en empêchant l'élimination des protéines anormales (Scotter *et al*., 2014). Il est également proposé qu'un stress oxydant pourrait être à l'origine de modifications post-traductionnelles initiales responsables des modifications conformationnelles de la protéines TDP-43 qui favoriseraient son agrégation (Chang *et al*., 2013 ; Shodai *et al*., 2013).

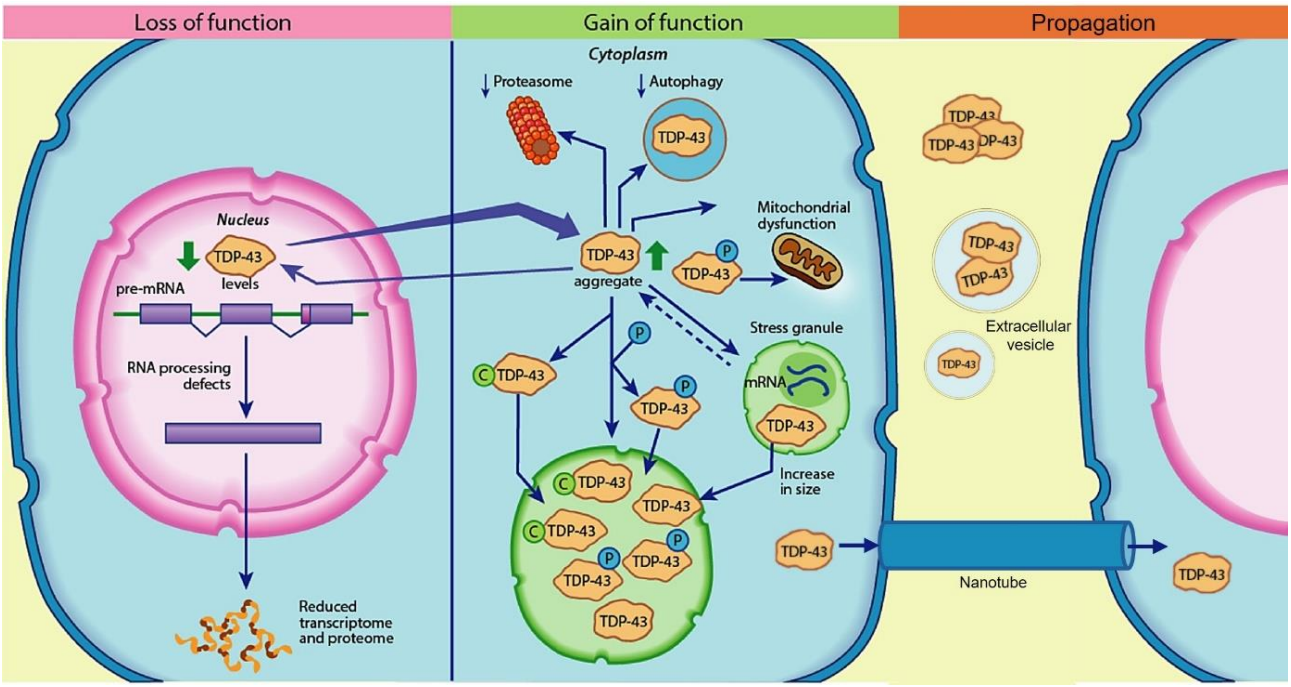


Figure 6 Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA. *La déplétion nucléaire de la protéine TDP-43 entraîne une dérégulation du métabolisme des ARN qui se traduit par une réduction de la synthèse des protéines. L'agrégation cytoplasmique de la protéine TDP-43 hyperphosphorylée (P bleu) entraine un stress cellulaire, conduisant à la genèse de granules de stress. TDP-43 entraine également un dysfonctionnement mitochondrial, une réduction de l'autophagie et un dysfonctionnement des processus d'homéostasie médiés par le protéasome et l'autophagie. Les modifications post-traductionnelles telles que l'oxydation des cystéines (C vert), l'acétylation, le clivage protéolytique, la sumoylation, et l'ubiquitination jouent également en rôle en pathologie et favorisent globalement l'agrégation par un gain de fonction toxique cytoplasmique. Puis la propagation de la pathologie se fait de proche en proche et est transmise aux cellules voisines par un mécanisme prion-like, par relargage dans le milieu extracellulaire, ou via des vésicules extracellulaires ou des nanotubes. (Schéma adapté à partir de De Boer et al., 2021).*

Une fois formés, les agrégats cytoplasmiques de TDP-43 sont responsables d'une cytotoxicité. Il en résulte une désorganisation de l'architecture cytoplasmique, et une perturbation des cascades et voies de signalisations internes (Zhang *et al*., 2009 ; Guo *et al*., 2011 ; Fang YS *et al*., 2014). Aussi, une augmentation de la concentration cytoplasmique de TDP-43 induit une augmentation de sa localisation mitochondriale, donc une inhibition de la traduction des ARNmt qui codent pour le complexe I de la chaine respiratoire. Ceci entraine une altération du métabolisme énergétique et une augmentation de la production de radicaux libres oxydants (Onesto *et al*., 2016 ; Wang W *et al*., 2016) qui à leurs tours participent à l'agrégation en renforçant le stress oxydant. De plus, ce stress mitochondrial induit une fragmentation du réseau mitochondrial et un déséquilibre de l'homéostasie calcique par altération des échanges avec le réticulum endoplasmique (Wang W *et al*., 2013 ; Stoica *et al*., 2014). Enfin, une accumulation de la protéine TDP-43 entraine une hyperactivation des voies neuroinflammatoires par interaction directe du RRM1 de TDP-43 avec la sous unité p65 du facteur de transcription pro-inflammatoire NF-κB (Swarup *et al*., 2011). Tous ces mécanismes contribuent à la genèse, et/ou au maintien de l'agrégation de TDP-43. L'ensemble des mécanismes physiopathologiques conduisant à un gain de fonction cytoplasmique sont résumés dans la Figure 6.

2.2.2. Perte de fonction nucléaire

Une conséquence secondaire à la délocalisation cytoplasmique de la protéine TDP-43 est la diminution de la concentration nucléaire de la protéine. Plusieurs mécanismes peuvent être responsable de cette diminution, comme une sortie active des protéines en réponse à un stress, la séquestration cytoplasmique des protéines dans les agrégats qui empêchent le retour au sein du noyau, et donc un défaut de renouvellement nucléaire ou encore une perturbation du transfert nucléocytoplasmique en réponse à la désorganisation de l'ultrastructure cellulaire. Cette perte de fonctions nucléaires est à l'origine d'un dérèglement du métabolisme des ARN cibles de TDP-43 (Kraemer *et al*., 2010 ; Polymenidou *et al*., 2011 ; Wu LS *et al*.2012 ; Iguchi *et al*., 2013 ; Yang C *et al*., 2014). Un dérèglement des ARNm codant pour les chaines légères de neurofilaments (*NFL*) participerait à la désorganisation de l'architecture du cytosquelette retrouvée au sein des motoneurones (Strong *et al*., 2007). De même, une anomalie de l'expression des gènes *ATG7* (autophagy related 7), *TFEB* (transcription factor EB) et *HDAC6* (histone deacetylase 6) serait en faveur du dépassement des voies d'homéostasie et de réponse au stress (Kim SH *et al*., 2010). Enfin, un défaut d'expression des gènes *IL6* (interleukine 6) et *GRN* (granuline) participerait à l'activation de la neuroinflammation (Lee S *et al*., 2015). Aussi, la déplétion nucléaire de TDP-43 entraîne une perte de la répression de l'épissage de ses ARN cibles, ce qui conduit à l'inclusion de séquences introniques non conservées dans l'ARN mature, appelées "exons cryptiques". L'inclusion de ces exons crytpiques peut déstabiliser les ARNm et provoquer l'apparition d'un codon stop prématuré, comme c'est le cas pour UNC13A et STMN2 (Brown *et al*., 2022 ; Melamed *et al*., 2019), ou produire occasionnellement des protéines cryptiques non fonctionnelles comme pour HDGFL2 (Calliari *et al*., 2024). L'apparition d'un codon stop sur les ARNm entraine une déplétion de protéines spécifiques, comme UNC13A cruciale pour les fonctions synaptiques, ou Stathmine 2 qui joue un rôle essentiel dans la croissance des neurites. La production de protéines crytpiques quant à elle modifie ses interactions avec d'autres protéines *et al*tère ses fonctions physiologiques entrainant à la fois une perte de fonction physiologique de ces protéines, et un gain de fonction crytpique.

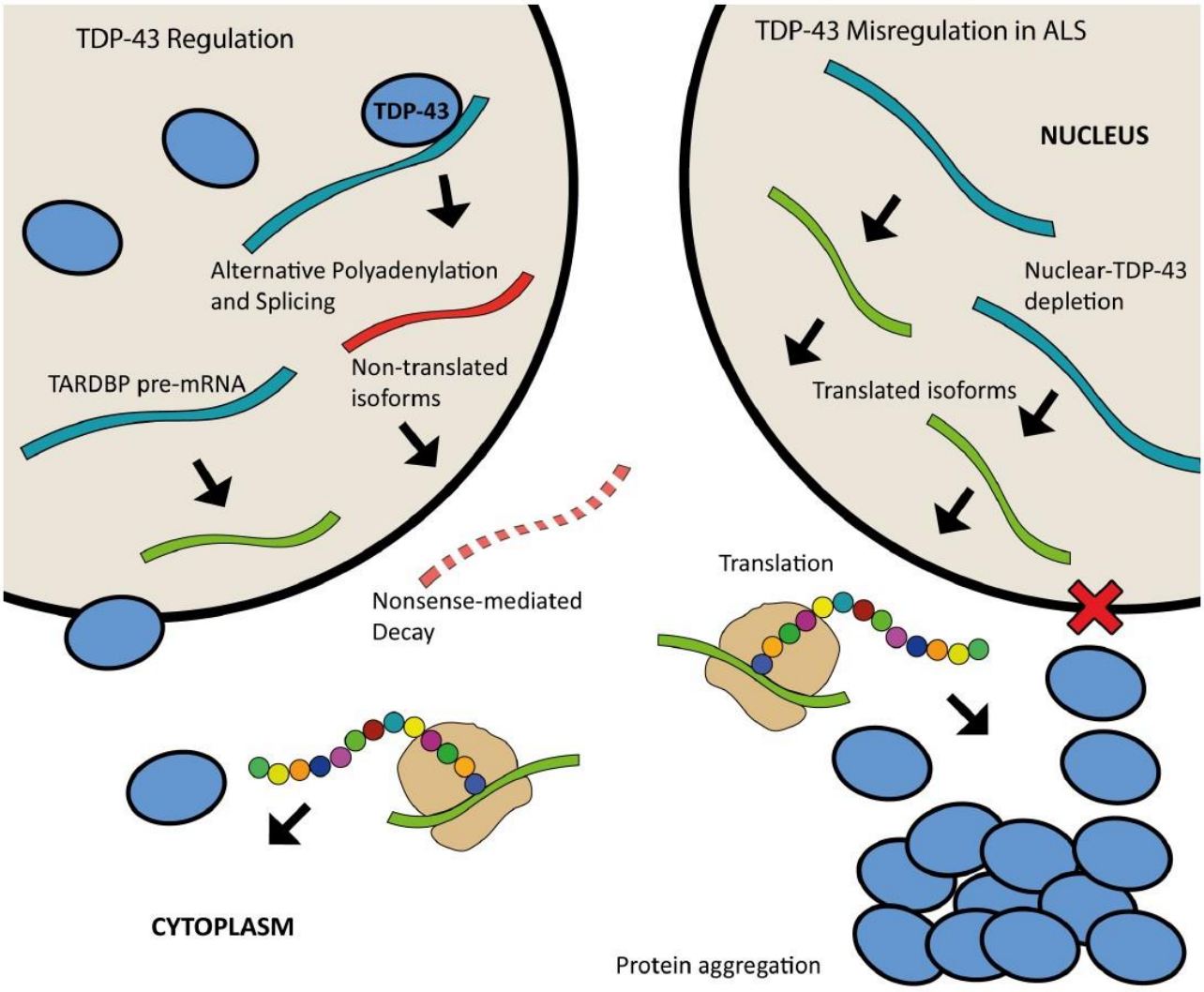


Figure 7 Représentation schématique des mécanismes d'autorégulation de la protéine TDP-43. *Lorsqu'elle est en excès dans le noyau, la protéine TDP-43 se lie à la région du 3'UTR de son propre pré-ARNm, ce qui entraîne une polyadénylation et un épissage alternatifs ; cela produit des transcrits d'ARNm matures qui sont soumis à une désintégration médiée par le non-sens. A l'inverse, en quantité insuffisante elle ne pourra pas se lier sur le 3'UTR de son propre ARNm, empêchant sa répression par épissage alternatif et entrainant la synthèse de nouvelles protéines. En condition pathologique, la perte d'expression nucléaire de TDP-43 entraine une surproduction de la protéine. (Schéma issu de Mejzini et al., 2019).*

Enfin, la protéine TDP-43 régule sa propre expression par un phénomène de rétrocontrôle négatif. La délocalisation cytoplasmique de la protéine entraine donc une perte du pool nucléaire de TDP-43, qui par conséquent ne peut plus réprimer son expression (Ayala *et al*., 2011 ; White *et al*., 2018). Il en résulte donc une surexpression cytosolique de cette dernière par perte de son autorégulation qui entretient les mécanismes neurotoxiques (Figure 7). En effet, il a été démontré qu'une déplétion nucléaire de TDP-43 induit une augmentation de la quantité d'ARNm TARDBP cytoplasmique (Koyama *et al* 2016). Ainsi, au même titre que le gain de fonction toxique médié par les agrégats cytoplasmiques, la perte de fonction nucléaire fait partie des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA (Figure 6).

2.2.3. Propagation de la pathologie

La propagation des agrégats pathologiques de TDP-43 au sein des cellules, ainsi que dans l'ensemble du système nerveux central (SNC), semble être médiée par un mécanisme « prion-like ». Ce mécanisme implique la transmission d'une conformation alternative de la protéine TDP-43 aux protéines TDP-43 natives environnantes via son domaine prion-like (Furukawa *et al*., 2011 ; Guo *et al*., 2011 ; Nonaka *et al*., 2013). De ce fait, les protéines environnantes ayant acquis la nouvelle conformation s'agrègeraient à leur tour, participant à la formation d'inclusions cytoplasmiques pathologique dans le cytoplasme des motoneurones. Ce processus de propagation « de proche en proche » est crucial pour comprendre la progression de la maladie dans le SNC. L'hypothèse suggère que les agrégats de TDP-43 se transmettent non seulement au sein d'une cellule mais également aux cellules voisines. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette propagation intercellulaire.

L'une des hypothèses repose sur le relargage post-apoptotique du contenu cytoplasmique. Les cellules mourantes libèrent leur contenu, y compris les agrégats de TDP-43, dans le compartiment extracellulaire. Ces agrégats peuvent alors être captés par les cellules voisines ou diffuser dans le liquide cérébrospinal (LCS) pour atteindre des zones plus distales du SNC (Smith *et al*., 2015). Cependant, cette méthode de propagation reste indirecte et dépendante du processus apoptotique. Une autre hypothèse suggère une transmission plus directe via des microvésicules, des exosomes ou des nanotubes (Feiler *et al*., 2015 ; Iguchi *et al*., 2016, Ding *et al*., 2015). Les protéines TDP-43 anormales peuvent être encapsulées dans des vésicules extracellulaires, qui sont ensuite libérées dans l'espace extracellulaire. Ces vésicules peuvent fusionner avec des cellules voisines ou être transportées sur de plus longues distances dans le SNC. En effet, des études ont montré que des vésicules extracellulaires enrichies en protéines TDP-43 ont été retrouvées dans le sang et le LCS de patients atteints de SLA, suggérant leur rôle potentiel dans la propagation de la pathologie (Irwin *et al*., 2024 ; Chatterjee *et al*., 2024).

Ce modèle de propagation « prion-like » est soutenu par des observations cliniques et neuropathologiques. En effet, le schéma de propagation séquentielle des agrégats pathologiques dans le cerveau des patients atteints de SLA suit un modèle de diffusion progressive, similaire à ce qui est observé dans d'autres maladies à prions (Brettschneider *et al*., 2013 ; Jucker and Walker, 2013). Les inclusions de TDP-43 apparaissent d'abord dans les neurones moteurs corticaux, puis se propagent aux neurones moteurs de la moelle épinière et du tronc cérébral, suivant un schéma de propagation antérograde et rétrograde. Des études sur des modèles animaux ont également contribué à renforcer ce mode de propagation. Ainsi, l'injection de

fibrilles de TDP-43 dans le cortex moteur primaire de modèles murins a permis d'induire une propagation antérograde de protéines TDP-43 pathologiques le long des axones du tractus pyramidal (Ding *et al*., 2021). Ces résultats suggèrent que l'agrégation de TDP-43 peut se propager à travers les voies axonales, contribuant à la dégénérescence neuronale le long des circuits moteurs.

De plus, il est intéressant de noter que la propagation « prion-like » n'est pas exclusive à la protéine TDP-43. D'autres protéines impliquées dans la SLA, comme la protéine SOD1, ont également été suggérées pour suivre un mécanisme similaire de propagation (McAlary *et al*., 2019, Mielke *et al*., 2024). Ceci soulève la possibilité que le mécanisme prion-like soit un processus commun à plusieurs formes de neurodégénérescence, impliquant une variété de protéines pathologiques. La propagation de proche en proche des agrégats est donc un processus clé dans l'évolution de la maladie, et une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques pour limiter la progression de la SLA.

2.2.4. Génétique de la SLA, pistes physiopathologiques

Comme nous l'avons évoqué précédemment, bien que minoritaires, des formes familiales de SLA (fSLA) liées à des antécédents familiaux existent. Quatre principaux gènes causaux ont été identifiés, et sont mutés dans plus de la moitié des fSLA et environ 10% des cas sporadiques : *SOD1, C9ORF72, TARDBP, FUS*. Ces gènes sont systématiquement séquencés lors d'un diagnostic moléculaire de patients SLA. Ces mutations, apportent des éléments d'orientation précieux dans la compréhension des formes sporadiques.

a) Mutations du gène *SOD1*

Le gène *SOD1* a été le premier et est longtemps resté le seul gène associé à la SLA après sa découverte en 1993 (Rosen *et al*., 1993). Des agrégats de la protéine SOD1 ont été retrouvés en immunohistochimie (IHC) dans la moelle de patients porteurs de mutations du gène *SOD1* (Shibata *et al*., 1996). Il est responsable de 15% à 30% des cas de fSLA et 2% des cas de sSLA (Zou *et al*., 2017) (Figure 8A). Sa transmission est autosomique dominante, quelques rares situations récessives ont été rapportées. Le gène *SOD1* code pour la Super Oxyde Dismutase 1, une métalloenzyme ubiquitaire abondante dans le cytoplasme également retrouvée dans l'espace intermembranaire des mitochondries. De ce fait, elle est impliquée dans les mécanismes de défense contre le stress oxydant en participant à l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (McCord et Fridovich, 1969).

Plus de 180 variants *SOD1* ont été décrits et sont répartis sur tout le gène (Yamashita et Ando, 2015). Une corrélation génotype-phénotype a été observée avec des variants associés à une forme agressive d'évolution rapide, ou à l'inverse des variants associés à une progression lente avec des durées d'évolutions pouvant aller au-delà de 20 ans (Yamashita et Ando, 2015). Les mécanismes pathologiques sous-jacents restent incertains. L'hypothèse d'une perte de fonction a été émise, des études ayant démontré une diminution d'activité enzymatique associée à des mutations de *SOD1* (Deng *et al*., 1993). Cette hypothèse été remise en cause par les modèles de souris transgéniques KO *SOD1* qui ne présentaient pas de phénotype particulier (Reaume *et al*., 1996). L'hypothèse d'un gain de fonction toxique a été proposé à travers l'induction d'un mauvais repliement de la protéine par les mutations de *SOD1*, ce changement conformationnel conférant un

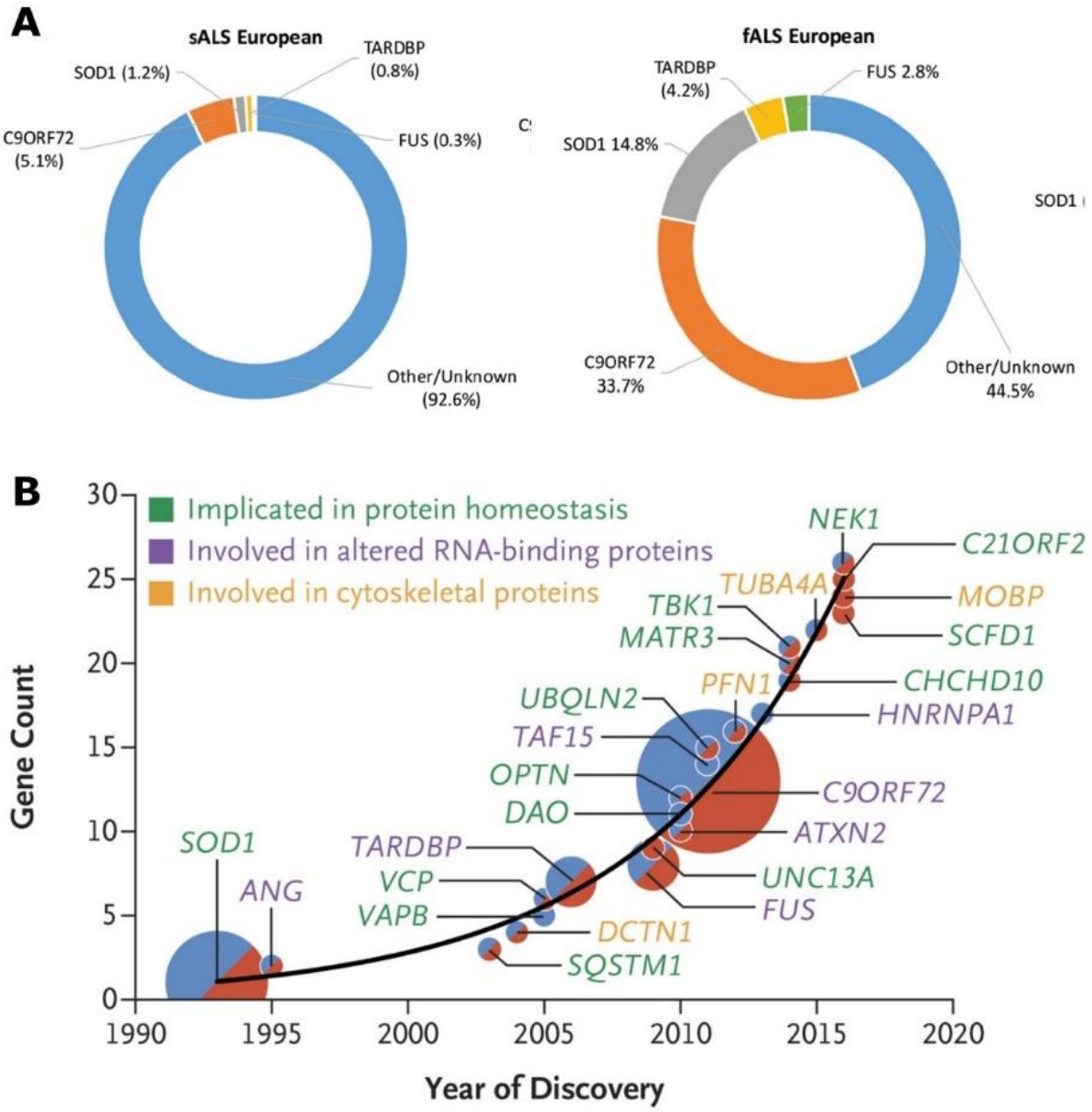


Figure 8 Prévalence des mutations génétiques dans la SLA. *(A) Représentation de la prévalence des mutations des principaux gènes (SOD1, FUS, C9ORF72, TARDBP) dans les formes familiales et sporadiques de SLA dans la population européenne (issu de Mejzini et al., 2019). (B) Gènes impliqués dans la SLA découverts depuis 1990. La taille de chaque cercle reflète la proportion de tous les cas familiaux de SLA associés à ce gène. Les cercles bleus indiquent les gènes associés uniquement aux formes familiales, les cercles rouges indiquent les gènes associés uniquement aux formes sporadiques, et les cercles à moitié bleus et à moitié rouges indiquent les gènes associés à la fois aux formes sporadiques et familiales (graphique issu de Brown et al-Chalabi, 2017).*

gain de fonction toxique (Gurney *et al*., 1994). Cette hypothèse est supportée par la présence d'agrégats de protéines SOD1 au sein des neurones du SNC des patients et est aujourd'hui communément admise. De plus, le caractère prion-like de la protéine SOD1 suggéré par sa capacité à transmettre une forme mal repliée aux protéines SOD1 normales appuie cette toxicité (Mielke *et al*., 2024).

b) Mutations du gène *C9ORF72*

En 2011, la répétition d'un hexanucléotide $(G_4C_2)_n$ dans la région non codante du cadre de lecture ouvert 72 du chromosome 9, *C9ORF72* a été identifiée chez des patients atteints de formes familiales de SLA (DeJesus-Hernandez *et al*., 2011 ; Renton *et al*., 2011). Chez les sujets sains, la taille de l'expansion hexanucléotidique est comprise entre 2 et 24, elle est considérée comme pathologique au-delà de 30, mais la majorité des patients présentent plusieurs centaines de ces répétitions (DeJesus-Hernandez *et al*., 2011 ; Babić Leko *et al*., 2019). C'est la cause génétique la plus fréquente des fSLA puisqu'elle représente 35 à 40% des cas et elle est également retrouvée dans 5 % des sSLA (Figure 8A) (Balendra & Isaacs, 2018, Zou *et al*., 2017). La transmission est autosomique dominante avec une pénétrance qui semble liée à l'âge puisqu'elle est estimée à 0% avant l'âge de 35 ans, environ 50% à l'âge de 60 ans, et près de 100% à 80 ans (Murphy *et al*., 2017).

Physiologiquement, C9ORF72 semble jouer un rôle dans l'architecture et l'expression génique, dans la distribution des protéines, ainsi que dans la régulation de l'inflammation et de l'autophagie (Smeyers *et al*., 2021). En pathologie, l'implication des mutations de *C9ORF72* dans la SLA est complexe et semble combiner à la fois des mécanismes d'haplo-insuffisance et de gain de fonction toxique. D'une part, une haplo-insuffisance induite par une méthylation anormale entrainant une diminution de l'expression de la protéine C9ORF72 a été suggérée comme un mécanisme potentiel (Waite *et al*., 2014). Cependant, des études ont démontré que cette diminution d'expression à elle seule n'est probablement pas suffisante pour induire la pathologie (Koppers *et al*., 2015). D'autre part, des mécanismes de gain de fonction toxique ont été proposés. Les transcrits de *C9ORF72* contiennent un grand nombre de répétitions riches en guanines, susceptibles de former des structures secondaires. Ces structures peuvent séquestrer les RNA Binding Proteins (RBP), les empêchant de se lier à leurs cibles physiologiques (Fratta *et al*., 2012). De plus, une partie de ces transcrits est soumise à une traduction non-ATG (RAN), conduisant à la production de protéines composées de répétitions dipeptidiques anormales. Ces protéines peuvent former des inclusions neuronales dans le SNC et contribuer à la pathogenèse de la maladie (Gendron *et al*., 2014 ; Swaminathan *et al*., 2018). Ainsi, la physiopathologie liée à *C9ORF72* dans la SLA est probablement le résultat d'une combinaison de ces mécanismes, où l'haplo-insuffisance et le gain de fonction toxique contribuent conjointement au développement de la maladie.

c) Mutations du gène *TARDBP*

A ce jour environ 70 mutations du gène *TARDBP* ont été recensées, dont la grande majorité sont situées sur l'exon 6 qui code pour le domaine LCD (Buratti, 2015 ; Sreedharan *et al*., 2008 ; Kabashi *et al*., 2008). La mutation faux-sens A382T est la mutation la plus fréquente observée à la fois chez les patients fSLA et sSLA (Pesiridis *et al*., 2009). Il est estimé que les mutations de *TARDBP* sont impliquées dans 4% des cas familiaux et 1% des cas sporadiques (Figure 8A) (Lattante *et al*., 2013 ; Millecamps *et al*., 2010 ; Müller *et al*., 2018). Les mutations de *TARDBP*, par leur localisation sur la partie C-terminale, entrainent une tendance accrue

à l'agrégation, une délocalisation cytoplasmique anormale, une altération de la stabilité de la protéine, une résistance aux protéases, et la modification des interactions protéiques. Des mutations dans les RRM ont été reportées chez des patients et perturbent la capacité de liaison de la protéine TDP-43 avec des acides nucléiques (Buratti 2015).

d) Mutations du gène *FUS/TLS*

Des mutations du gène *FUS/TLS* (FUsed in Sarcoma/Translocated in LipoSarcoma) ont été identifiées en 2009 (Kwiatkowski *et al*., 2009 ; Vance *et al*., 2009) comme étant responsables de formes familiales de SLA. Les fSLA induites par des mutations sur le gène *FUS/TLS* sont à transmission autosomique dominante et représentent 4% des formes familiales et moins d'1% des formes sporadiques (Figure 8A) (Valdmanis *et al*., 2009). Le gène *FUS/TLS* code pour la protéine FUS, qui est proche de TDP-43 en termes de structure et de fonctions. FUS est aussi une RBP ubiquitaire nucléaire jouant un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes et notamment la transcription, l'épissage, le transport et la régulation de la traduction d'ARNm (Ratti et Buratti, 2016), mais elle régule des ARN cibles différents de ceux de TDP-43 (Lagier-Tourenne *et al*., 2012). Comme pour TDP-43, en condition pathologique la protéine FUS forme des agrégats cytoplasmiques dans les motoneurones de la moelle épinière de patients, sans pour autant retrouver la présence d'agrégats de TDP-43 associés (Vance *et al*., 2009).

Actuellement, plus de 120 mutations ont été identifiées sur ce gène, parmi elles un nombre important de mutations sont localisées dans le NLS ce qui induit une redistribution de la protéine FUS dans le cytoplasme (Vance *et al*., 2013). Les autres mutations sont retrouvées dans les domaines riches en glycine et arginine, dans le domaine prion-like et dans le 3'UTR (Shang and Huang, 2016). Il est difficile de statuer sur les mécanismes pathologiques qui conduisent ces mutations à engendrer la maladie. Certaines hypothèses fonctionnelles avancent une perte et d'autre un gain de fonction. Les hypothèses sur une perte de fonction reposent sur le fait que la délocalisation cytoplasmique de la protéine l'empêche d'exercer ses fonctions physiologiques nucléaires. A l'inverse, d'autres hypothèses défendent un gain de fonction toxique induit par les agrégats cytoplasmiques menant à la mort progressive et sélective des motoneurones (Sharma *et al*., 2016 ; Vance *et al*., 2013).

e) Autres gènes impliqués dans la SLA

Si les gènes *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* et *C9ORF72* représentent plus de la moitié des cas de fSLA, et 10% des cas de sSLA, les analyses moléculaires chez de grandes cohortes de patients atteints de SLA ont conduit à la découverte de variants génétiques rares associées à la SLA dans de nombreux autres gènes (Figure 8B). Ces mutations ont été principalement retrouvées dans les gènes qui influencent le métabolisme de l'ARN, l'homéostasie des protéines et la dynamique du cytosquelette. Chacun des gènes identifiés représentent moins d'1% des cas de fSLA, et leur implication en pathologie n'est pas évidente à étudier en raison du faible nombre de patients touchés par ces mutations. Parmi ces gènes, nous pouvons citer *TBK1* impliqué dans l'autophagie et l'immunité innée (Oakes *et al*., 2017), *VCP* impliqué dans la dégradation des protéines, l'autophagie et la fusion membranaire (Johnson *et al*., 2010), *DCTN1* impliqué dans la dynamique axonale et du cytosquelette (Münch *et al*., 2004), *PFN1* dans la polymérisation du cytosquelette (Wu *et al*., 2012), *CHMP2B* dans le transport des

protéines (Cox *et al*., 2010), *ATXN2* dans le métabolisme des ARN (Elden *et al*., 2010) ou encore *CCNF* impliqué dans le cycle cellulaire (Williams *et al*., 2016) (Figure 8B).

2.2.5. Autres pathologies liées à TDP-43

Plusieurs maladies neurodégénératives présentent une pathologie de la protéine TDP-43 désormais collectivement désignées sous le nom de « protéinopathies liées à TDP-43 » (Kwong *et al*., 2008).

a) Dégénérescence Lobaire Fronto-Temporale (DLFT)

La dégénérescence lobaire fronto-temporale est un syndrome clinique caractérisé par des déficits progressifs du comportement, des fonctions exécutives et du langage. La neurodégénérescence affecte la partie antérieure des lobes frontaux et/ou temporaux, responsables de troubles du comportement, des troubles de la prise d'initiative et du traitement des émotions, ainsi que du langage. Trois principaux types de DLFT ont été identifiés, DLFT-Tau qui représente 35 à 50% des cas, DLFT-FUS impliquée dans environ 10% des cas, et DLFT-TDP-43 qui représente environ 50% des cas de DLFT. Il est important de noter que 15 % des patients atteints de DLFT développent une SLA, alors que des signes d'atteinte du second motoneurone peuvent être présents chez 30 à 40 % des patients, ce qui est comparable à la fréquence des changements cognitifs et comportementaux dans la SLA (Burrell *et al*., 2016). Cinq grands sous-types de DLFT-TDP-43 (types A, B, C, D et E) sont reconnus sur la base des caractéristiques de la pathologie cytoplasmique ou intranucléaire au niveau cortical. La génétique de la DLFT-TDP-43 se confond en partie avec celle de la SLA, les expansions hexanucléotidiques du gène *C9ORF72* représentant 25 à 40 % des cas familiaux de DLFT (Burrell *et al*., 2016). Aussi, des mutations dans les gènes *GRN*, *C9ORF72*, *VCP*, *CHMP2b* et *TARDBP* sont plus spécifiques à la DLFT-TDP-43 (Sellami *et al*., 2020).

b) Encéphalopathie TDP-43 liée à l'âge à prédominance limbique (LATE)

L'encéphalopathie TDP-43 liée à l'âge à prédominance limbique (LATE), a été définie récemment en 2019 (Nelson *et al*., 2019). Il s'agit d'un trouble neurologique observé chez des sujets âgés, généralement de plus de 80 ans, qui présentent des symptômes proches de ceux de la maladie d'Alzheimer avec des troubles de la mémoire. Les caractéristiques pathologiques reposent sur la présence d'agrégats TDP-43 cytoplasmiques dans le système limbique principalement (Nelson *et al*., 2019), en l'absence de pathologie Tau et Beta amyloïde propres à la maladie d'Alzheimer. Des mutations dans cinq gènes ont été associées au LATE : *GRN*, *TMEM106B*, *ABCC9*, *KCNMB2* et *APOE*. Près de 20% des cerveaux autopsiés après 80 ans présentent des caractéristiques pathologiques de LATE, et 15 à 20% des patients ayant été diagnostiqués cliniquement pour une maladie d'Alzheimer sont finalement apparentés à une LATE sur le plan pathologique.

c) Protéinopathie TDP-43 dans les autres pathologies neurodégénératives

Des agrégats TDP-43 ont été rapportés chez près de la moitié des patients atteints de maladie d'Alzheimer (Matej *et al*., 2019), posant la question d'une protéinopathie TDP-43 concomitante. De même, des études ont également démontré la présence d'agrégats de TDP-43 dans la maladie de Parkinson (Markopoulou *et al*., 2008) et dans la maladie de Huntington (Schwab *et al*., 2008). Toutefois, aucun lien direct entre TDP-43

et ces maladies n'est formellement admis à ce jour, l'observation de pathologies concomitantes augmentant considérablement en fréquence avec l'âge des patients (Journé *et al*., 2019).

Dans ce manuscrit nous nous intéresseront uniquement à la Sclérose Latérale Amyotrophique, les autres protéinopathies liées à TDP-43 ne seront pas étudiées ni développées.

3. Modéliser la SLA en recherche, un enjeu majeur

Pour comprendre les mécanismes pathologiques impliqués dans la SLA et développer de nouveaux traitements, il est essentiel de créer des modèles représentatifs de la maladie. Pour cela, des modèles *in vitro* et *in vivo*, visant à reproduire les caractéristiques de la SLA et à étudier ses processus sous-jacents ont été développés et ont permis d'avancer sur la compréhension de la pathologie. Cependant, malgré ces avancées, les modèles existants restent insuffisants pour capturer toute la complexité de la maladie.

3.1. Modèles *in vitro*

Parmi les modèles *in vitro*, plusieurs lignées cellulaires neuronales et motoneuronales sont le plus classiquement utilisées en recherche sur la SLA : les cellules Neuro-2a issues de neuroblastome murin, les cellules SH-SY5Y issues d'un neuroblastome humain, et la lignée hybride NSC-34 produite par fusion de motoneurones embryonnaires murins avec des cellules de neuroblastome de souris. Les lignées primaires de fibroblastes de peau humaine issues de patients atteints de SLA ont également été utilisées étant donné leur origine embryonnaire commune avec les neurones, mais leur utilisation n'est pas toujours pertinente puisqu'ils ne reproduisent pas en condition standard les lésions pathologiques observées au niveau du SNC des patients (Codron *et al*., 2018 ; Woo *et al*., 2023).

De nombreux modèles de surexpression de la protéine TDP-43 ont été utilisés *in vitro* pour induire l'agrégation cytoplasmique retrouvée chez les patients. Parmi ces modèles des lignées surexprimant TDP-43 sauvage (WT) ou mutée par des transfections stables ou transitoires ont été générées. Parmi ces modèles nous pouvons citer les transfections de TDP-43-ΔNLS dans des cellules HEK293 induisant une expression cytoplasmique abondante de la protéine TDP-43 (Charif *et al*., 2020) ou la formation d'agrégats cytoplasmiques insolubles (Winton *et al*., 2008). La transfection de TDP-43-ΔNES induit à l'inverse la formation d'agrégats nucléaires insolubles dans des cellules de rein embryonnaire humain QBI-293 (Winton *et al*., 2008). Enfin, la transfection de TDP-43-ΔNLS, TDP-43^{G348C} et TDP-43 WT couplés à la GFP dans des cellules SH-SY5Y et HeLa entrainent un haut niveau d'expression cytoplasmique de TDP-43, qui semblent être protecteur contre a formation de granules de stress (Besnard-Guérin, 2020).

Plus récemment, l'utilisation de modèles de cellules souches dérivées de patients a été développée dans la recherche sur la SLA ; plusieurs études ont en particulier travaillé à générer des motoneurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC). La capacité à reprogrammer des iPSC offre des avantages évidents pour générer des cellules somatiques spécifiques d'un patient, qui portent le même patrimoine génétique, y compris les mutations qui peuvent contribuer au processus de la maladie (Takahashi *et al*., 2007). Les neurones moteurs dérivés d'iPSC ont été utilisés principalement pour étudier les variants de *TARDBP*,

C9ORF72, *SOD1* et *FUS* à partir de patients porteurs de ces mutations (Lee et Huang, 2017). Par exemple, des iPSC différenciés en motoneurones et astrocytes de TDP-43^{M337V} ont été générés, ayant permis de mettre en évidence une vulnérabilité cellulaire sélective aux inhibiteurs de PI3K, une augmentation des protéines TDP-43 insolubles aux détergents, et que les astrocytes TDP-43^{M337V} présentent une augmentation de TDP-43 sans présenter d'effets néfastes pour la survie des neurones en co-culture (Bilican *et al*., 2012 ; Serio *et al*., 2013 ; Nishimura *et al*., 2014). Aussi, des iPSC dérivées en neurones à partir d'un patient portant la mutation TDP-43^{A90V} ont démontrés une localisation cytoplasmique de la protéine TDP-43 ainsi qu'une diminution totale des niveaux protéiques de TDP-43 (Zhang *et al*., 2013). Ou encore des iPSC différenciées en motoneurones SOD1^{D90A} ont permis d'identifier que la protéine SOD1 mutée se lie à au 3'UTR de l'ARNm NF-L, le déstabilise, et qu'il en résulte la formation d'agrégats et inclusions de neurofilaments (Chen *et al*., 2014). Des équipes ont également tenté d'utiliser les iPSC pour modéliser la forme sporadique de la maladie. Actuellement, une seule étude fait état de l'isolement et de la caractérisation de motoneurones dérivés d'iPSC provenant de cas de SLA sporadique. Cette étude montre que dans des conditions de culture basale, les motoneurones de patients atteints de SLA sporadique ont intrinsèquement une propension plus élevée à développer des agrégats intranucléaires de TDP-43, même en l'absence de stress (Burkhardt *et al*., 2013). Bien que ces résultats soient encourageants, ils ne reproduisent pas les agrégats cytoplasmiques pathologiques retrouvés chez les patients. Aussi, les cellules souches pluripotentes générées par les iPSC peuvent également être différenciées en d'autres types de cellules, telles que les astrocytes et la microglie, ce qui peut contribuer à l'étude des mécanismes pathologiques de la SLA dans différents environnements cellulaires.

S'appuyant sur les propriétés prion-like de la protéine TDP-43, des modèles cellulaires novateurs voient le jour ces dernières années. Plusieurs études *in vitro* utilisant du LCS ou des lysats de cerveaux issus de patients SLA ou DFT-TDP ont été publiés. Ces études ont démontré que la protéine TDP-43 insoluble issue de patients SLA et DFT-TDP pouvait former des inclusions intracellulaires dans la lignée SH-SY5Y (Nonaka *et al*., 2013), dans des neurones corticaux primaires de souris (Feiler *et al*., 2015), dans les cellules HEK293 et NSC-34 (Smethurst *et al*., 2016) et dans des cellules HEK293 exprimant TDP-43 WT (Laferrière *et al*., 2019). Une autre étude a démontré la capacité du LCS issus de patients SLA et DFT à induire ces agrégats dans des cellules U251 -MG (lignée humaine de glioblastome multiforme) (Ding *et al*., 2015).

Des modèles *in vitro* plus élaborés ont été mis au point permettant l'étude des interactions entre différents types cellulaires pour comprendre la maladie et mettre au point de nouveaux traitements. Parmi les modèles 3D *in vitro* élaborés, on peut citer : les cultures de motoneurones en 3D (Scarian *et al*., 2022), des modèles de co-culture en 3D de neurones avec d'autres types cellulaires (astrocytes, microglie) (Johnson et Maragakis, 2022), des hydrogels 3D pour mimer les propriétés mécaniques des tissus (Chooi *et al*., 2022) ou encore des organoïdes cérébraux (Tamaki *et al*., 2023). Si ces modèles ont été développés pour étudier la pathogenèse et la progression de la maladie au plus proche des processus neurodégénératifs impliqués dans la SLA et sont de réels atouts pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, leur utilisation est pour le moment restreinte vu les contraintes techniques qu'ils nécessitent pour leur mise en place.

3.2. Modèles *in vivo*

Les modèles rongeurs ont été largement utilisés dans la recherche sur la SLA depuis que les premiers modèles de souris portant des mutations sur le gène *SOD1* ont été produits en 1994 (Gurney *et al*., 1994). Depuis de nombreuses lignées de rongeurs *SOD1* ont été générées ces 25 dernières années, et développent généralement une maladie du motoneurone à l'âge adulte, qui rappelle la maladie humaine, avec des caractéristiques telles que l'installation d'une paralysie progressive sévère associée à une perte de poids, l'agrégation de la protéine SOD1, la mort cellulaire excitotoxique des neurones, les réactions neuroinflammatoires et l'altération de la biologie des oligodendrocytes (Philips and Rostein, 2015). Si ces modèles ont été pertinents pour découvrir les mécanismes pathologiques dans la SLA, ils ne reflètent pour autant qu'une mineure partie de la pathologie compte tenu de la faible proportion de SLA induites par des mutations de *SOD1* chez les patients (15% à 30% des cas de fSLA et 2% des cas de sSLA).

Des modèles rongeurs modélisant l'expansion de la répétition hexanucléotidique C9ORF72 ont également été mis au point. Un modèle de souris *C9ORF72* exprimant 66 répétitions dans le SNC, médié par un virus adéno-associé, a été développé, et les souris ont présenté des symptômes histopathologiques et cliniques de la SLA, y compris des déficits moteurs (Chew *et al*., 2015).

Des modèles de rongeurs *FUS* ont été générés, notamment des modèles de knock-out, de knockdown et de surexpression des protéines FUS sauvages et mutées. Bien qu'ils fournissent des indices sur les pathomécanismes de la SLA liée à FUS, aucun modèle à ce jour n'a été en mesure de reproduire les caractéristiques neuropathologiques observées chez l'Homme (Nolan *et al*., 2016).

La souris « wobbler » est un autre modèle de souris qui a largement été utilisé dans la recherche sur la SLA, notamment pour tester des thérapies potentielles. La souris wobbler est apparue spontanément dans une souche C57BL/Fa et a été décrite pour la première fois par Falconer en 1956 (Falconer, 1956). Ces souris présentent des caractéristiques phénotypiques similaires à celles de la SLA humaine, notamment une faiblesse musculaire, des défauts de motricité et une perte marquée de neurones moteurs. Les motoneurones de la souris Wobbler partagent de nombreuses caractéristiques décrites dans la SLA humaine, notamment un dysfonctionnement mitochondrial, une altération du transport axonal, une excitotoxicité corticale, des agrégats de protéines positifs à l'ubiquitine et une agrégation des neurofilaments (Moser *et al*., 2013). La pathologie TDP-43 chez la souris wobbler ressemble à celle observée dans la SLA humaine sporadique, avec notamment des taux élevés de TDP-43, une distribution anormale dans le cytoplasme, la présence de fragments C-terminaux et la colocalisation avec des inclusions positives à l'ubiquitine (Dennis et Citron, 2009). Le variant responsable de ce phénotype a été découvert en 2005, il s'agit d'une mutation ponctuelle dans le gène *VPS54* (Schnmitt-John *et al*., 2005). Cependant, aucun variant lié à la SLA dans le gène humain homologue n'a encore été décrit, limitant l'utilisation de ce modèle dans la recherche sur la SLA.

Il existe une 20^{aine} de modèles murins associés à des mutations du gène *TARDBP* (Liu *et al*., 2013). Certains de ces modèles ont été générés pour tester l'hypothèse de la perte de fonction de TDP-43. Les souris homozygotes KO pour *TARDBP* ne sont pas viables (Kraemer *et al*., 2010, Sephton *et al*., 2010 ; Wu *et al*., 2010), de même que les KO inductibles chez la souris adulte (Chiang *et al*., 2010) reflétant le rôle majeur de

TDP-43 pour la viabilité cellulaire et le développement, mais ne permettant pas l'étude de l'impact de sa perte d'expression. Des délétions hétérozygotes de *TARDBP* ont alors été générées chez des souris, qui présentent certes un déficit moteur global, mais pas de dégénérescence motoneuronale ni de réduction des niveaux protéiques de TDP-43 (Kraemer *et al*., 2010).

Des modèles animaux permettant d'étudier le gain de fonction toxique de TDP-43 ont également été générés. Pour cela, des modèles de surexpression de TDP-43 WT ou de variants TDP-43 ont été créés dans différentes espèces (C. elegans, zebrafish, souris), et reproduisent tous un phénotype neurodégénératif plus ou moins complet (Kabashi *et al*., 2010 ; Liachko *et al*., 2010 ; Stallings *et al*., 2010). Un modèle de souris transgéniques surexprimant une mutation de TDP-43^{M337V} présente un déficit moteur accompagné d'inclusions d'ubiquitine (Xu *et al*., 2011). Un autre modèle murin transgénique inductible a été généré, et ne repose cette fois-ci pas sur des mutations retrouvées chez les patients, mais sur une délétion du signal d'import nucléaire (NLS) de la protéine TDP-43 humaine. La force de ce modèle repose sur l'induction d'agrégats cytoplasmiques de TDP-43 accompagnés d'une perte nucléaire, une atrophie cérébrale, une dénervation des muscles, une perte motoneuronale et un défaut moteur progressif conduisant à la mort de l'animal. Il a également été montré que ces anomalies sont réversibles après arrêt de l'induction de la délétion du NLS, avec une récupération possible des animaux après plusieurs mois (Walker *et al*., 2015).

Des modèles murins transgéniques exprimant la protéine TDP-43 WT humaine ont également été générés, mais les résultats diffèrent. Certaines études ne démontrent pas de phénotype moteur et présentent une pathologie de la moelle épinière légère (quelques neurones avec marquage ubiquitine positif, et légère astrogliose) (Stallings *et al*., 2010), tandis que d'autres modèles de surexpression de la protéine TDP-43 sauvage humaine dans des souris transgéniques ont démontrés une fragmentation de la protéine aboutissant à la production de CTF de 25 et 35 kDa qui sont caractéristiques de la pathologie humaine (Wils *et al*., 2010).

À l'heure actuelle, la majorité des modèles animaux et cellulaires utilisés pour étudier la SLA reposent sur des mutations génétiques connues liées à la SLA, sur les gènes *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, ou *C9ORF72*. Alors que les modèles développés à partir de ces mutations sont particulièrement utiles pour étudier les formes familiales de SLA, ces modèles ne sont qu'incomplètement représentatifs des formes sporadiques. Récemment, des équipes ont tenté de se rapprocher de la sSLA en tentant d'induire la pathologie TDP-43 chez des modèles animaux en utilisant les propriétés prion-like de la protéine (Tableau 1). L'administration de liquide cérébrospinal (LCS) issus de patients atteints de SLA par infusion intraventriculaire chez des souris transgéniques qui expriment la protéine TDP-43 WT humaine a permis d'obtenir un phénotype moteur ainsi que des inclusions TDP-43 intraneuronales, une désorganisation des neurofilaments et une neuroinflammation (Mishra *et al*., 2020). Des études similaires ont été réalisées à partir d'injections de fibrilles de protéine FUS humaine chez des souris ayant induit une pathologie similaire à celle observée chez les patients atteints de SLA et DFT liée à FUS (Vasquez-Sanchez *et al*., 2024). Dans cette continuité, des injections intracérébrales d'extraits protéiques issus de patients atteints de DFT liée à TDP-43 ont permis de reproduire la pathologie chez des souris transgéniques, sans toutefois permettre d'observer un phénotype moteur *ante-mortem* (Porta *et al*., 2018). De même, une étude du même groupe a démontré que des souches de protéines TDP-43 pathologiques issues de différents sous-types de patients DLFT-TDP-43 induisaient des agrégats spécifiques à chaque souche

Tableau 1 Induction de la pathologie TDP-43 in vivo par un mécanisme prion-like dans différentes études.

Etude	Modèle murin utilisé	Mode d'administration	Echantillon biologique administré	Résultats obtenus
Porta *et al.*, 2018	CamKIIa-hTDP-43_{NLSm}, rNLS8, CamKIIa-208 et souris non transgéniques B6C3HF1	Injection stéréotaxique intracérébrale unique (thalamus, hippocampe, néocortex)	Protéines Sarkosyl-insolubles issues de cerveau de patient atteint de DLFT-TDP-43 familiale avec mutation du gène *GRN*	Induit une pathologie TDP-43 *de novo* qui se propage dans le cerveau. Agrégats cytoplasmiques de pTDP-43 (et hTDP-43) dans les neurones, (rares dans les souris non transgéniques). Pas de phénotype moteur.
Mishra *et al.*, 2020	Souris transgéniques $hTDP43^{WT}$ et NFL-HA-mRFP1-RPL10a	Perfusion chronique intracérébroventriculaire par pompes miniosmotiques (15 jours)	Echantillons groupés de LCS de patients atteints de SLA sporadique	Dysfonctionnement moteur et cognitif, protéinopathie cytoplasmique de TDP-43, anomalies des neurofilaments et neuroinflammation.
Zhang *et al.*, 2021	Souris transgéniques $Atg5^{+/-}$ et non transgéniques C57BL/6	Injection stéréotaxique unique dans le cortex moteur (couche V), ou la moelle épinière cervicale (C7)	Fibrilles préformées de TDP-43 (PFFs) (à partir de protéine TDP-43 recombinante commerciale)	Niveaux élevés de pTDP-43 dans le tractus pyramidal des souris $Atg5^{+/-}$; dysfonctionnement du motoneurone inférieur pour souris injectées dans le cortex moteur, dysfonctionnement du motoneurone supérieur pour les souris injectées en position cervicale.
Ding *et al.*, 2021	Souris transgénique $hTDP\text{-}43^{WT}$	Injection stéréotaxique unique dans le cortex moteur primaire (caudal ou latéral)	Fibrilles préformées de TDP-43 (PFFs) (à partir de protéine TDP-43 recombinante commerciale)	Localisation cytoplasmique de pTDP-43 dans les neurones proches du site d'injection, puis propagation au cortex moteur bilatéral, tractus pyramidal et motoneurone inférieur ; dysfonctionnement moteur et déficit cognitifs ainsi que troubles de la déglutition.
Porta *et al.*, 2021	Souris transgéniques CamKIIa-hTDP-43_{NLSm}	Injection stéréotaxique unique intracérébrale (hippocampe dorsal et cortex sus-jacent)	Protéines TDP-43 sarkosyl-insolubles issues de cerveaux de patients DLFT-TDP-43 types A, B, C et E	Induction d'une pathologie TDP-43 de distribution morphologique et subcellulaire distincte en fonction des souches utilisées (type A et B : agrégats ronds et sphériques ; type E : agrégats filamenteux).

utilisée, avec en particulier une toxicité supérieure des extraits issus de patients atteints de type A et B en comparaison aux types C et E (Porta *et al*., 2021), déjà observé *in vitro* (Laferrière *et al*., 2019 ; De Rossi *et al*., 2021). Plus récemment, des études d'injection intracérébrales de fibrilles recombinantes préformées (PFFs) de TDP-43 chez des souris transgéniques $Atg5^{+/-}$ et $hTDP\text{-}43^{WT}$ ont induit un déficit moteur, des agrégats cytoplasmiques de pTDP-43 avec une propagation de la pathologie au sein du cerveau dans le temps (Zhang *et al*., 2021 ; Ding *et al*., 2021).

Enjeux et problématiques de la thèse

Les problématiques dans la recherche sur la SLA sont multiples. La SLA est une maladie neurodégénérative complexe avec une présentation clinique variée, suggérant des mécanismes sous-jacents diffèrent d'un patient à l'autre, compliquant la compréhension globale de la maladie et l'émergence de pistes thérapeutiques. De plus, les modèles *in vitro* et *in vivo* actuels ne reproduisent qu'incomplètement cette complexité humaine, ce qui ajoute aux difficultés de compréhension de la maladie et à l'identification de cibles thérapeutiques.

Ce travail de thèse tente de répondre à ces problématiques en approfondissant notre compréhension des mécanismes impliqués et, dans cette optique, de travailler à la mise au point de nouveaux modèles plus représentatifs de la pathologie sporadique.

La première partie de mon travail de thèse a porté sur la dynamique de la protéine TDP-43, reconnue comme un acteur central, dans des conditions physiologiques en utilisant des techniques de microscopies résolutives novatrices. L'étude de la localisation physiologique de TDP-43 dans différentes lignées cellulaires nous a conduits à la découverte d'une nouvelle localisation intracellulaire de la protéine au sein du centrosome. Ces résultats ont ouvert de nouvelles perspectives pour étudier son implication dans cet organite. Nous avons rencontré des obstacles techniques pour poursuivre nos travaux sur son implication en pathologie.

En réponse aux enjeux actuels et aux difficultés techniques auxquelles nous avons fait face, la deuxième partie de cette thèse s'est focalisée sur la mise au point d'un modèle murin se rapprochant de la pathologie sporadique de la SLA. Si effectif, ce modèle pourrait permettre une étude des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie (comprenant la poursuite de nos travaux sur la dynamique intracellulaire de la protéine TDP-43, en particulier de sa fraction centrosomale) et l'identification de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.

Ce travail vise à combler certaines limites actuelles auxquelles la communauté scientifique et médicale est confrontée dans la recherche sur la SLA en apportant des outils et des connaissances qui pourraient accélérer le développement de traitements efficaces pour cette maladie.

Tableau 2 Caractéristiques cliniques des patients atteints de SLA et des témoins des échantillons biologiques utilisés.

Culture primaire de fibroblastes de peau (hSF)						
	Sexe	Age à la biopsie	Durée de la pathologie (mois)	Evolution clinique	Score ALSFRS-R*	Mutation
Ctrl_1	M	52	-	-	-	-
Ctrl_2	F	46	-	-	-	-
sSLA_1	F	54	6	Rapide	31/48	-
sSLA_2	F	62	24	Classique	40/48	-
sSLA 3	M	66	144	Lente	38/48	-
fSLA_1	M	53	70	NC	NC	$TARDBP^{G348C}$
fSLA_2	F	62	36	NC	NC	$TARDBP^{A382T}$

Abréviations : ALSFRS-R = ALS Functional Rating Scale-Revised, fSLA = Sclérose latérale amyotrophique familiale, sSLA = Sclérose latérale amyotrophique sporadique, NC = non communiqué.

Matériel et Méthodes

1. Culture cellulaire

1.1. Entretien

Les fibroblastes de peau humaine (hSF) ont été obtenus à partir de biopsies de sujets sains et de patients atteints de SLA sporadique et familiale après obtention d'un consentement écrit (Tableau 2). Les fibroblastes témoins et de patients atteints de sSLA ont été obtenus après du CHU d'Angers. Les fibroblastes porteurs de la mutation TARDBP^{G348C} ont été obtenus auprès de l'hôpital Erasme (Bruxelles, Belgique) et ceux portant la mutation TARDBP^{A382T} ont été obtenus auprès du National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) human cell and data repository. Les lignées commerciales ont été obtenues chez différents fournisseurs (ATCC, Tebubio, Cell line services).

Les fibroblastes primaires ont été cultivés dans du milieu DMEM F-12 (P04-41250, Dutscher) supplémenté par 1/3 d'AmnioMAX (17 001 074, Thermo Fisher) en présence de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, P40-37500B, Dutscher), 1 % d'uridine (U3003, Sigma) et 1 % de pyruvate (11 360 039, Thermo Fisher). Les lignées cellulaires HeLa (carcinome cervical humain), U87 MG (glioblastome humain) et NSC-34 (lignée hybride obtenue par fusion de motoneurones présents dans la moelle épinière d'embryons murins avec des cellules de neuroblastome de souris) ont été cultivées dans du DMEM 4,5 g/L de glucose (P04-03500, Dutscher), supplémenté de 10 % de SVF et de 2 mM de glutamine (X0550-100, Dutscher). Les cellules SH-SY5Y (neuroblastome humain) ont été cultivées dans du DMEM 4,5 g/L de glucose avec 10% de SVF, 2 mM de glutamine, 1% d'uridine et 1% de pyruvate. Les cellules Neuro-2a (neuroblastome murin) ont été cultivées dans du EMEM (P04-08049, Dutscher) supplémenté avec 10% de SVF, 1% d'acides aminés non essentiels (NEAA, P08-32100, Dutscher), 2 mM de glutamine et 1% de pyruvate. Les cellules lymphoblastiques humaines KE-37 ont été cultivées dans du milieu RPMI supplémenté avec 10 % de SVF en présence de pénicilline-streptomycine (1 000 unités/ml et 1 000 µg/ml, respectivement HyClone). Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans des flasques T25 et maintenues dans une atmosphère humidifiée (95 % d'air, 5 % de CO2) à 37 °C. Les expériences ont été menées sur des cellules avec des numéros de passage similaires, allant de 6 à 20, afin d'éviter les artefacts dus à la sénescence.

1.2. Culture des cellules sur lamelles

Pour toutes les expériences qui ont nécessité de la microscopie, les cellules ont été déposée sur des lamelles en plaque 6 puits ou 12 puits. Pour cela, les cellules ont été trypsinées dans les flasques de cultures, puis ensemencées à raison de 100 000 cellules par puits pour une plaque 6 puits sur une lamelle de 22 mm de diamètre dégraissée dans 2 mL de milieu de culture. Pour les plaques 12 puits les cellules ont été ensemencées à 50 000 cellules par puits sur une lamelle de 18 mm de diamètre dégraissée avec 1 mL de milieu de culture. Les plaques ont été replacées à l'incubateur à 37°C (95 % d'air, 5 % de CO2) toute la nuit avant d'être utilisées le lendemain en fonction de l'expérience réalisée (traitements, transfections, fixation pour microscopie, etc…).

Tableau 3 Références et dilutions des anticorps utilisés.

Anticorps primaires	**Espèce**	**Fournisseur**	**Référence**	**Dilution**
Anti-TDP-43 polyclonal	Lapin	Proteintech	10782-2-AP	IF : 1/1000 WB : 1/5000
Anti-TDP43 (Recombinant monoclonal)	Lapin	Abcam	ab109535	IF : 1/750
Anti-TDP-43 (C-terminal) Polyclonal	Lapin	Proteintech	12892-1-AP	IF : 1/1500 WB : 1/1000
Anti-TDP-43 (human specific) monoclonal	Souris	Proteintech	60019-2-Ig	IF : 1/12 500 WB : 1/1000
Anti-TDP-43 monoclonal	Souris	Abcam	ab57105	IF : 1/6000
Anti-péricentrine monoclonal	Souris	Abcam	ab28144	IF : 1/5000
Anti-péricentrine monoclonal	Lapin	Abcam	ab220784	IF : 1/5000
Anti-centrine (clone 20H5 ZooMAb®) monoclonal	Souris	Sigma	ZMS1054	IF : 1/5000
Anti-γ-tubuline monoclonal	Souris	Sigma	T5326	IF : 1/5000 WB : 1/5000
Anti-γ-tubuline polyclonal	Lapin	A.-M. Tassin	-	NC
Poly E (GT335) monoclonal	Souris	C. Janke gift	-	IF : 1/ 1000
CTR453 monoclonal	Souris	M. Bornens gift	-	NC
CoraLite®488 Anti-CEP164 polyclonal	Lapin	Proteintech	CL488-22227	IF : 1/1000
Anti-lamine B1 monoclonal	Souris	Abcam	ab8982	WB : 1/1000
Anti alpha-Tubuline monoclonal	Souris	Sigma	T9026	IF : 1/1000
Anti-ataxin 2 monoclonal	Souris	Proteintech	68316-1-Ig	IF : 1/100
Anti-p150 (Dynactin) monoclonal	Souris	BD Biosciences	610473	IF : 1/1000
Anti-VCP monoclonal	Souris	Proteintech	60316-1-Ig	IF : 1/100
Anti-cyclophiline A (PPIA) monoclonal	Souris	Proteintech	67880-1-Ig	IF : 1/1000
Anti-CHMP2B polyclonal	Lapin	Proteintech	12527-1-AP	IF : 1/50
Anti-cycline F polyclonal	Lapin	Abcam	ab203117	IF : 1/100
Anti-PFN1 polyclonal	Lapin	Sigma	P7749	IF : 1/100
Anti-TLS/FUS monoclonal	Lapin	Abcam	ab124923	IF : 1/1000
Anticorps secondaires	**Espèce**	**Fournisseur**	**Référence**	**Dilution**
Alexa Fluor 488 anti-souris IgG	Chèvre	Thermo Fisher	A11001	IF : 1/10 000
Alexa Fluor 532 anti-souris IgG	Chèvre	Thermo Fisher	A11002	IF : 1/10 000
Alexa Fluor 647 anti-souris IgG	Chèvre	Thermo Fisher	A21235	IF : 1/10 000
Alexa Fluor 488 anti-lapin IgG	Chèvre	Thermo Fisher	A11008	IF : 1/10 000
Alexa Fluor 532 anti-lapin IgG	Chèvre	Thermo Fisher	A11009	IF : 1/10 000
Alexa Fluor 647 anti-lapin IgG	Chèvre	Thermo Fisher	A21245	IF : 1/10 000
Alexa Fluor 790 anti-souris IgG	Chèvre	Abcam	ab186695	WB : 1/10 000
Alexa Fluor 680 anti-souris IgG	Chèvre	Abcam	ab186694	WB : 1/10 000
Alexa Fluor 790 anti-lapin IgG	Chèvre	Abcam	ab186697	WB : 1/10 000
Alexa Fluor 680 anti-lapin IgG	Chèvre	Abcam	ab186696	WB : 1/10 000

1.3. Traitements

En vue d'induire la formation d'agrégats cytoplasmiques de TDP-43, différents traitements ont été testés sur les fibroblastes de peau humaine ainsi que sur les lignées, SH-SY5Y, HeLa, U87. Après avoir été ensemencées en plaque avec lamelles de microscopie pendant 24 heures, les cellules ont été traitées avec les conditions suivantes :

- Acide éthacrynique (E4754, Sigma) pendant 5 heures avec une gamme de concentration de 20 à 100 µM,
- Roténone (R8875, Sigma) pendant 24 à 48 heures avec une gamme de concentration de 1 à 10 mM,
- Arsénite de sodium (S7400, Sigma) pendant 24 heures avec une gamme de concentration de 1 à 5 mM,
- 2,5 µM de MG132 (M8699, Sigma) pendant 24 heures,
- Nocodazole (M1404, Sigma) pendant 2 heures avec une gamme de concentration de 5 à 10 mg/mL
- Exposition chronique (24, 48, 72 heures) avec 10% de liquide cérébrospinal issu d'un patient atteint de SLA dans le milieu de culture.

1.4. Immunofixation et immunomarquages

Les cellules sur lamelles et les coupes histologiques de tissus ont été fixées 6 minutes au méthanol absolu (20847.295, VWR) conservé à -20°C pour qu'il soit froid au moment de la fixation ou 10 minutes au paraformaldéhyde 4% (P6148, Sigma) à température ambiante. Puis la lamelle a été rincée 3 fois au PBS 1X (P04-53500, Pan Biotech) avant d'être incubée pendant 20 min à température ambiante sous agitation avec une solution de PBS contenant 5% d'albumine de sérum bovin (BSA, A6003 Sigma) pour la saturation des sites aspécifiques et 1% de Triton X-100 (T9284, Sigma) pour la perméabilisation des membranes (PBS-BSA-T). Les lamelles ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires d'intérêts selon la dilution optimale (références et dilutions utilisées dans le Tableau 3) sous agitation à 4°C durant une nuit. Le lendemain matin, l'échantillon a été rincé 3 fois au PBS1X puis incubé 2 heures à température ambiante sous agitation à l'obscurité avec une solution d'anticorps secondaires dilués à 1/10 000 dans du PBS-BSA-T. Ensuite l'échantillon a de nouveau été lavé 3 fois avec du PBS1X puis incubé 10 min avec du Hoechst (H3570, Thermo Fisher) puis de nouveau rincé 3 fois au PBS1X. Les lamelles ont ensuite été montées sur des lames de microscopie avec une goutte de milieu de montage Fluoromount-G (Invitrogen).

1.5. Transfection de plasmides

Des plasmides codant pour la protéine TDP-43 couplée à la GFP (TDP-GFP référence RG210639 chez Origene) et pour la centrine couplée à la RFP (Centrine-RFP Plasmid #26753 chez Addgene) ont été utilisés.

1.5.1. Amplification des plasmides

Afin de constituer un stock des deux plasmides utilisés, une amplification par des bactéries compétentes puis une extraction à l'aide du kit « Monarch Plasmid Miniprep » (New Angland Biolabs) ont été réalisées.

1.5.2. Transformation bactérienne

A J0, la transformation bactérienne a été réalisée en mélangeant entre 20 et 30 ng de plasmide avec 30 µL de bactéries compétentes StellarTM (Takara Bio), puis incubés 10 minutes sur glace. Puis un choc thermique a été réalisé pendant 45 secondes à 42°C puis replacé sur glace pendant 10 minutes. Ensuite 200 µL de SOC medium (Takara Bio) à 37°C ont été ajouté aux bactéries transformées puis placé dans un incubateur à 37°C pendant 1 heure. Puis 75 µL de cette suspension bactérienne ont été étalés en gradient sur une boite de pétri contenant un milieu de sélection à base d'agar (15g/L), de luria broth medium (25g/L) et d'ampicilline (50µg/mL, Sigma). La boite a été incubée à 37°C pendant une nuit.

1.5.3. Sélection des clones et amplification en milieu liquide

A J+1, les bactéries ayant intégré le plasmide ont acquis la résistance à l'ampicilline et ainsi pu se développer sur le milieu de sélection. Les colonies présentes sur la gélose ont donc été isolée à l'aide d'un inoculateur et mises en culture en milieu liquide de luria broth (LB) à 25g/L avec de l'ampicilline (50 µg/mL) à 37°C sous agitation à 200 RPM pendant une nuit supplémentaire (une colonie pour 20 mL de milieu LB).

1.5.4. Extraction des plasmides

A J+2, les plasmides ont été extraits à l'aide du kit « Monarch Plasmid Minipep » (New England Biolabs). Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 10000G pendant 5 minutes, puis le surnageant a été éliminé. Le culot bactérien a été resuspendu dans 200 µL de tampon B1. 200 µL de tampon B2 ont été ajoutés puis incubés 3 minutes à température ambiante. Puis 400 µL de tampon B3 ont été ajoutés et la solution a été délicatement homogénéisée jusqu'à ce qu'elle soit devenue jaune. Les tubes ont été centrifugés à 13000G pendant 5 minutes, puis les surnageants ont été récoltés et déposés sur des colonnes fournies dans le kit contenant une membrane de silice, placées dans des tubes de collection. Les colonnes ont été centrifugées à 13000G pendant 1 minute puis les tubes de collection ont été vidés. Puis 200 µL de tampon de lavage 1 ont été ajoutés par colonne, centrifugées 1 minute à 13000G et les tubes de collection vidés. Cette étape a été répétée avec 400 µL de tampon de lavage 2. Puis les colonnes ont été séchées grâce à une centrifugation à sec de 2 minutes à 13000G puis laissées à l'air libre sur la paillasse 5 minutes de plus. Les colonnes ont été placées dans un nouveau tube de collection propre, puis 30 µL d'eau ultrapure ont été déposés dans chaque colonne pour élution par centrifugation 1 min à 13000G. Les plasmides ont ainsi été élué de la membrane de silice et récupérés dans les tubes de collection. La concentration des plasmides ainsi extraits a été mesurée au spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Fischer).

1.5.5. Transfection des plasmides

Les cellules HeLa et SH-SY5Y ont été transfectées ou co-transfectées à l'aide de l'agent de transfection Avalanche-Omni (EZ Biosystems). Un mix de transfection a été réalisé comme suit : 200 µL de milieu de culture sans SVF avec entre 0,5 et 1,5 µg de plasmide, et 1 µL/µg de plasmide d'Avalanche-Omni. Le mix de transfection a été vortexé avec insistance puis a reposer 20 minutes à température ambiante. Puis le mix de transfection a été ajouté dans chaque puit au goutte à goutte puis homogénéisé par mouvements circulaires. Les cellules ont ensuite été replacées dans l'incubateur à 37°C. Des gammes de transfections ont été réalisées pour les plasmides TDP-GFP et Centrine-RFP, entre 0,5 et 1,5 µg de plasmide et pendant 24 à 48 heures. L'efficacité de transfection et la concentration de plasmide adéquate a été déterminée à l'aide de l'Incucyte S3

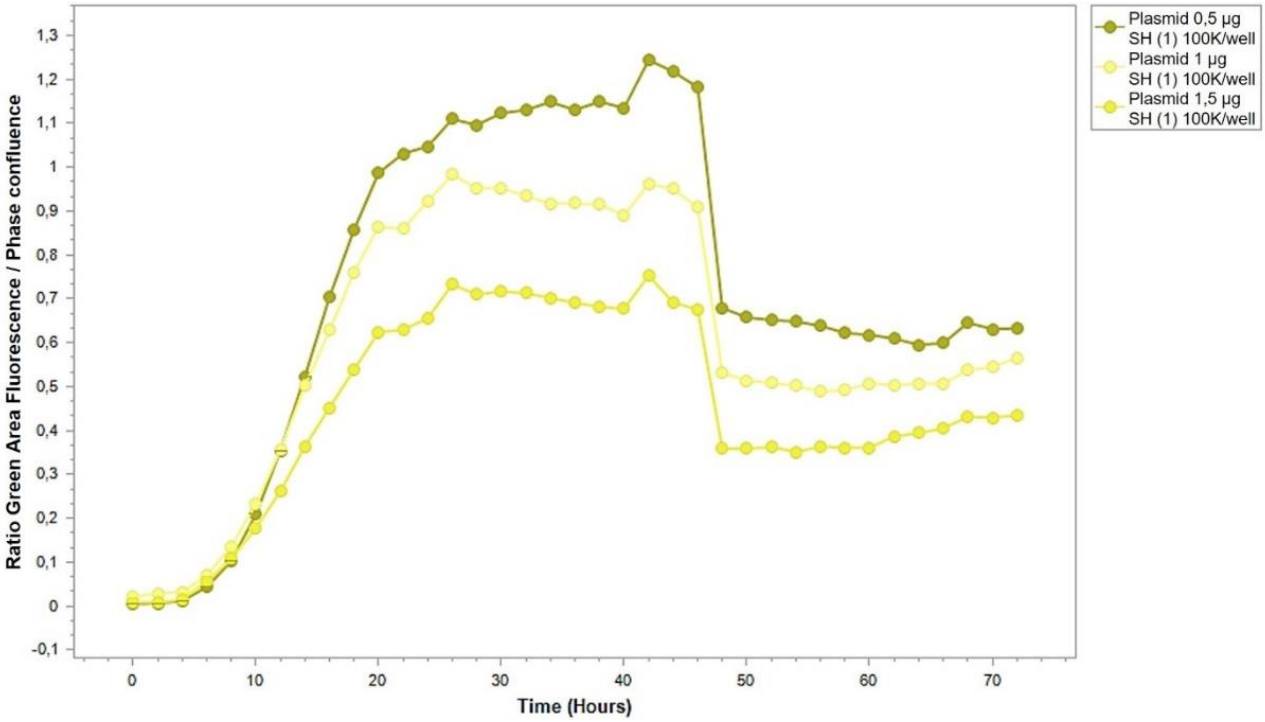


Figure 9 Evaluation de l'efficacité de transfection de cellules par Incucyte.

(Sartorius) qui a permis l'acquisition d'images des cellules en contraste de phase et en fluorescence. Grâce au logiciel « Incucyte Software », le ratio de l'aire de fluorescence sur l'aire totale occupée par les cellules a été réalisé et a permis de déterminer que l'efficacité de transfection était meilleure à 48 heures avec 0,5 µg de plasmide (Figure 9). Les transfections et co-transfection ont de ce fait été réalisées à 48 heures avec 0,5 µg de plasmide TDP-GFP et 0,5 µg de plasmide Centrine-RFP. Afin de tenter de former des agrégats cytoplasmiques de TDP-43, la surexpression de TDP-43 a été réalisée par transfection d'une gamme de 3 à 10 µg du plasmide TDP-GFP.

1.6. Purification de centrosomes

La purification de centrosome a fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe du Dr Anne-Marie Tassin, qui a mis au point cette technique au sein de son laboratoire, et pour laquelle Monsieur Logan Greibill, doctorant sous la direction du Dr Tassin a réalisé les purifications présentées dans ce travail.

Les centrosomes ont été isolés à partir de cellules KE-37 comme décrit par Gogendeau *et al.*, 2015. Les cellules ont été prétraitées pendant 1 h avec du nocodazole ($2x10^{-7}$ M) et de la cytochalasine D ($2x10^{-6}$ M). Les cellules ont ensuite été lavées dans du PBS et remises en suspension dans 8 % de saccharose dans du PBS dilué 10 fois avant la lyse des cellules dans un tampon de lyse (1 mM HEPES, 0,5 mM $MgCl_2$, 0,5 % NP40, 1 mM de fluorure de phénylméthanesulfonyle et des antiprotéases). Après centrifugation à 4000 RPM, le surnageant a été filtré à travers un filet en nylon, réajusté à 10 mM HEPES et traité avec de la DNAse et de la benzonase. Les centrosomes concentrés ont été déposés sur un gradient discontinu de saccharose (70%, 50% et 40%) dans un tube SW32Ti et centrifugés à 25 000 RPM pendant 1 h 15 min. Les fractions ont ensuite été collectées et analysées pour leur pureté en utilisant un anticorps anti-γ-tubuline, l'anticorps monoclonal CTR453 qui réagit spécifiquement avec le matériel péricentriolaire (don du Dr Bornens) et du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, D8417) pour colorer la contamination par l'ADN.

Les fractions de protéines solubles et insolubles au Triton X-100 ont été préparées comme suit : Les cellules KE37 ont été lavées dans du PBS et lysées dans un tampon PHEM (45 mM PIPES, 45 mM HEPES, 10 mM EGTA, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride ajusté à pH 6,8) contenant 1% de Triton X-100 et des inhibiteurs de protéase. Les protéines insolubles ont été centrifugées à 300 G, solubilisées dans un tampon d'échantillonnage SDS-PAGE (Laemmli, 1970), puis chauffées pendant 5 minutes. Les protéines solubles ont été précipitées avec 9 volumes de méthanol à 4°C pendant 1 heure et culottées. Le culot a été remis en suspension dans le même volume de tampon d'échantillon que celui utilisé pour les protéines insolubles.

1.6.1. Western blot sur centrosome purifiés

Les fractions solubles et insolubles au Triton X-100 ainsi que la fraction centrosomale ont été analysées sur un gel SDS-PAGE de 10% d'acrylamide/bis-acrylamide. Les gels ont été transférés sur des membranes de nitrocellulose à l'aide d'un dispositif de transfert semi-sec (Bio-Rad). Les membranes ont été recouvertes d'anticorps primaires : anticorps polyclonal de lapin anti-TDP-43 (10782-2-AP, 1:5000), anticorps polyclonal de lapin anti-TDP-43 (C-terminal) (12892-1-AP, 1 : 1000), anticorps monoclonal anti-TDP-43 (spécifique à l'homme) de souris (60019-2-Ig, 1:1000), anticorps monoclonal anti-γ-tubuline de souris (T5326, 1:5000) et anticorps monoclonal anti-lamine B1 de souris (ab8982, 1:1000). Les membranes ont ensuite été lavées dans du PBS et incubées avec des anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris conjugués à la peroxydase (Sigma),

Tableau 4 Caractéristiques cliniques des patients atteints de SLA et des témoins des échantillons biologiques utilisés.

Histologie et extraction de protéines insolubles						
	Sexe	Age à l'autopsie	Prélèvement après le décès (heures)	Durée de la pathologie (mois)	Forme de début	Echantillon biologique utilisé
Ctrl_3	M	64	24	-	-	Extraction protéines insolubles (Cortex frontal)
sSLA_4	M	62	5	14	Bulbaire	Histologie (Cortex frontal et moelle)
sSLA_5	M	76	29	60	Spinale	Extraction protéines insolubles (Cortex frontal)
sSLA_6	F	69	32	48	Bulbaire	Extraction protéines insolubles (Cortex frontal)
sSLA_7	M	59	-	37	Spinale	Liquide cérébrospinal

Abréviations : ALSFRS-R = ALS Functional Rating Scale-Revised, fSLA = Sclérose latérale amyotrophique familiale, sSLA = Sclérose latérale amyotrophique sporadique, NC = non communiqué.

puis révélées et imagées par chimiluminescence à l'aide du ChemiDoc (Bio-Rad). La quantification de l'intensité de la luminescence a été réalisée avec le logiciel Image Lab (Bio-Rad). Les références des réactifs et des anticorps sont détaillées dans le Tableau 3.

1.6.2. Immunofluorescence sur centrosome purifiés

Les centrosomes isolés ont été fixés avec du méthanol pendant 6 minutes à -20°C et immunomarqués avec des anticorps primaires : anticorps monoclonal anti-TDP-43 de souris (spécifique de l'homme) (60019-2-Ig, 1:2000) et anticorps polyclonal anti-γ-tubuline de lapin. Les centrosomes ont été lavés dans du PBS et incubés avec des anticorps secondaires conjugués Alexa Fluor (Invitrogen, 1:1000) pendant 90 minutes à température ambiante. La microscopie à immunofluorescence a été réalisée avec un microscope inversé motorisé (TCS SP8, Leica Microsystems) équipé d'une diode UV (ligne 405) et de deux diodes laser (lignes 488 et 552) pour l'excitation, d'un objectif Plan-Apochromat CS2 à immersion dans l'huile de grossissement 63×/ouverture numérique 1,4 et de deux détecteurs PMT. Le logiciel LAS X (Leica Microsystems) a été utilisé pour l'acquisition. Les piles Z ont été générées à partir de sections optiques prises à des intervalles de 0,3 µm. Les piles d'images ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ.

2. Histologie

Les échantillons biologiques de cerveau et de moelle épinière humains utilisés dans ces travaux ont été obtenus auprès du centre de ressources biologiques (CRB) des maladies neurodégénératives de l'hôpital universitaire d'Angers. Quatre patients atteints de SLA et un sujet témoin ont été sélectionnés parmi les sections histologiques archivées. Au moment de l'autopsie les échantillons ont été plongés 30 secondes dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide lors de l'autopsie puis conservés au sec à -80°C. Des échantillons de cortex frontal, de moelle épinière cervicale, thoracique et lombaire ont été utilisés. Les caractéristiques cliniques des patients et des témoins sont présentées dans le Tableau 4.

2.1. Coupes histologiques de cerveau et moelle épinière

Des échantillons de cortex frontal et de corne antérieure de moelle épinière en position cervicale cryoconservés ont été utilisés pour l'imagerie. Les échantillons de tissus ont été cryo-sectionnés à -20°C en des coupes de 10 µm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat Leica CM3050 S (Leica Biosystems, Wetzlar, Allemagne). Chaque coupe congelée a été récupérée sur lamelle en verre de 22 mm2 (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Allemagne) et séchée à l'air pendant 45 min avant d'être immunofixée puis immunomarquée.

2.2. Extractions de protéines insolubles

Les extractions de protéines insolubles ont été réalisées à partir de cortex frontal d'un sujet sain et de deux patients atteints de SLA. Le protocole d'extraction a été adapté de Porta *et al*., 2018 comme suit et toutes les étapes ont été réalisées sur glace ou à 4°C.

Tableau 5 Composition des tampons utilisés pour l'extraction de protéines insolubles.

Tampon	Concentration	Composé
High Salt Buffer **(HS)**	10 mM	Tris-HCl (T3253, Sigma)
	0,5 M	NaCl (S/3161/53, Fisher Chemical)
	2 mM	EDTA (E6758, Sigma)
	10 % (poids : volume)	Sucrose (S9378, Sigma)
	1 mM	Dithiothréitol (DTT) (D0632, Sigma)
	1 X	Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher)
High Salt Buffer Triton X-100 **(HS-TX)**	10 mM	Tris-HCl
	0,5 M	NaCl
	2 mM	EDTA
	10 % (poids : volume)	Sucrose
	1 mM	Dithiothréitol (DTT)
	1 X	Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher)
	1 %	Triton X-100
High Salt Buffer Triton X-100 20% sucrose **(HS-TX 20% sucrose)**	10 mM	Tris-HCl
	0,5 M	NaCl
	2 mM	EDTA
	20 % (poids : volume)	Sucrose
	1 mM	Dithiothréitol (DTT)
	1 X	Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher
	1 %	Triton X-100
High salt buffer contenant 2 % de sarcosyl **(HS-2% sarkosyl)**	10 mM	Tris-HCl
	0,5 M	NaCl
	2 mM	EDTA
	10 % (poids : volume)	Sucrose
	1 mM	Dithiothréitol (DTT)
	1 X	Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher
	2 %	N-Lauroylsarcosine sodium salt (J60040, Thermo Scientific)

Du cortex frontal cryoconservé a été lysé avec des Potter dans du tampon HS-TX (5 mL de tampon/g de tissu). Une partie de l'homogénat a été prélevée nommée fraction « ST(HS-TX) » et le reste a été ultracentrifugé à 150 000G 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été mis de côté et nommé fraction « HS-TX ». Le culot a été resuspendu par sonication dans du tampon HS-TX-20% sucrose (5 mL de tampon/g de tissu) pour éliminer la myéline par flottaison, puis ultracentrifugé à 150 000G 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été mis de côté et nommé fraction « Myéline ». Le culot a été resuspendu par sonication dans du tampon HS-2% sarkosyl (5 mL de tampon/g de tissu). Une partie de la suspension a été prélevée nommée « Pré-2% sark », puis le reste a été ultracentrifugé à 150 000G 30 minutes à 22°C. Le surnageant a été mis de côté et nommé fraction « 2% sark-soluble ». Le culot a été resuspendu par sonication dans du PBS 1X (5 mL de tampon/g de tissu), puis ultracentrifugé à 100 000G 30 minutes à 15°C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu par sonication dans du PBS 1X (5 mL de tampon/g de tissu), puis ultracentrifugé à 100 000G 30 minutes à 15°C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu par sonication dans du PBS 1X filtré (0,1 mL de PBS/g de tissu) et donne la fraction Sark-insoluble. La composition des tampons utilisés est reportée dans le Tableau 5.

3. Biochimie

3.1. Dosage de protéines

Le dosage de protéines des échantillons obtenus par extraction de protéines insolubles a été réalisé avec le kit « Pierce™ BCA Protein Assay Kit » (Thermo Scientific). Une gamme étalon de BSA a été préparée aux concentrations suivantes : 0,125 µg/µL, 0,250 µg/µL, 0,5 µg/µL, 1 µg/µL, 2 µg/µL. 10 µL des points de la gamme étalon et des échantillons à doser ont été déposés en triplicat dans une plaque 96 puits. Une solution de révélation a été réalisée en diluant 1/50ème de solution A dans la solution B. 200 µL de solution de révélation a été ajoutée dans chaque puits et la plaque a été incubée 30 minutes à 37°C. L'absorbance à 562 nm a été mesurée à l'aide du CLARIOstar Plus (BMG Labtech). La concentration des échantillons a été calculée en fonction de l'absorbance de la gamme étalon.

3.2. Western blot

La technique du Western Blot a été utilisée pour caractériser les fractions obtenues lors de l'extraction de protéines insolubles à partir de cortex frontal de sujet sain et de patient atteint de SLA.

3.2.1. Préparation des échantillons

Une solution de Laemmli (1610747, BioRad) avec 10% de β-mercaptoéthanol (M6250, Sigma) a été préparée. Pour chaque échantillon, 40 µg de protéines ont été dilués avec ¼ de la solution Laemmli et β-mercaptoéthanol et le volume final a été ajusté jusqu'à 32 µL avec un mélange d'antiprotéases et antiphosphatases (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher). Les échantillons ont ensuite été dénaturés 5 minutes à 95°C.

3.2.2. Migration par électrophorèse

Les échantillons ainsi qu'un marqueur de taille (Ladder Protein PageRuler, Thermo Scientific 26619) ont été déposés dans les puits d'un gel d'électrophorèse pré-coulé (gels Tris-Glycine 4-20%, XP04200BOX Invitrogen). La migration par électrophorèse des protéines a été réalisée à 100V pendant 20 minutes puis 140V pendant 1h30 dans du tampon d'électrophorèse à l'aide d'un générateur (PowerPac Universal Power Supply, BioRad).

3.2.3. Transfert des protéines sur membrane

Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (IB23002, Invitrogen) à l'aide du dispositif de transfert de gel iBlot 2 (IB21001, Invitrogen) à 25V pendant 7 minutes.

3.2.4. Incubations et révélation

Les membranes ont été saturées par incubation pendant 2 heures sous agitation à température ambiante dans une solution de 50 % de TBS 1X (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH =7,6) et 50% de Intercept Blocking Buffer TBS (927-80001, LICORbio). Après trois rinçages dans du TBS 1X, la membrane a été incubée avec une solution d'anticorps primaires (90% TBS-Tween (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, 0,1% Tween 20, pH =7,6) + 10% de Intercept Blocking Buffer TBS + anticorps primaire selon dilution) toute la nuit sous agitation à 4°C. La membrane a ensuite été rincée trois fois dans du TBS-Tween, puis incubée avec une solution d'anticorps secondaires (90% TBS-Tween + 10% Intercept Blocking Buffer TBS + anticorps secondaire dilution 1/10 000) pendant 2 heures sous agitation à température ambiante. Après deux rinçages au TBS-Tween et un rinçage au TBS 1X, la membrane a été révélée par fluorescence grâce à l'imageur Odyssey Fc (LICORbio), et analysées par le logiciel Image Studio Ver 2.1. Les références et dilutions des anticorps primaires et secondaires utilisés sont listés dans le Tableau 3.

4. Imagerie

4.1. Microscopie à fluorescence conventionnelle

Pour la microscopie à fluorescence, les lames de microscopies préalablement montées ont été observées sur un microscope inversé à champ large Nikon Eclipse Ti-E (Nikon Instruments, Europe) équipé d'un objectif à immersion dans l'huile 100X (CFI Plan Apo 100X, Nikon), d'une lentille x1,5 et d'une caméra monophotonique Evolve 128TM EMCCD 512 × 512 imaging array, 16 × 16 µm pixels (Photometrics). Les acquisitions ont été réalisées à 25°C dans une chambre de chauffe obscure (Okolab NA) sur une table anti-vibrations. Les acquisitions ont été réalisées à l'aide du logiciel MetaMorph 7.7 (Molecular Devices).

4.2. Microscopie à fluorescence haute- et super-résolution

4.2.1. Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF)

La microscopie TIRF repose sur le phénomène de réflexion totale interne qui se produit lorsque la lumière passe d'un milieu avec un indice de réfraction (IR) n1 (comme le verre) à un milieu moins dense avec un indice de réfraction n2 (comme l'eau ou le cytoplasme d'une cellule) sous un angle d'incidence supérieur à un certain angle critique. Lorsque la lumière atteint la surface de contact sous cet angle, elle est totalement

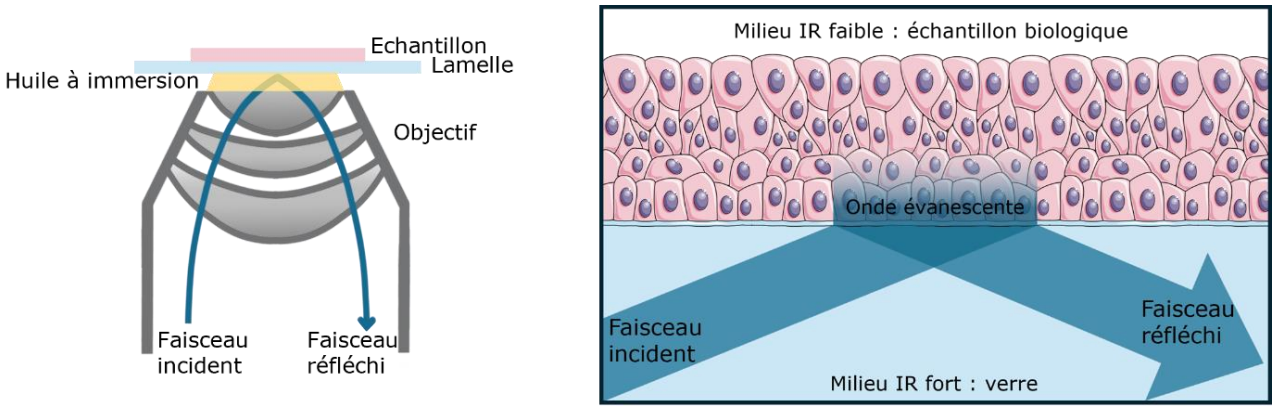


Figure 10 Principe de la microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence).

réfléchie à l'interface et ne pénètre pas dans le milieu moins dense. Il en résulte la formation d'une onde évanescente à l'interface qui pénètre faiblement dans le milieu moins dense (Figure 10). Cette onde évanescente décroit exponentiellement en intensité avec la distance par rapport à la surface de contact. La profondeur de pénétration de l'onde évanescente est typiquement de l'ordre de 100 à 200 nm (contre 800 nm en microscopie confocale), ce qui signifie que seules les molécules situées très près de la surface sont excitées et fluorescentes. Ceci a pour conséquence de réduire massivement le bruit de fond tout en conservant une excellente résolution spatiale. Cette technique d'imagerie nécessite un montage différent de la microscopie à fluorescence classique.

Pour réaliser les acquisitions en microscopie TIRF, les lamelles contenant les cellules immunofixées et immunomarquées ont été montées sur une lame avec une cavité centrale concave (Paul Marienfeld GmbH&Co) remplie de 50 µL de PBS 1X. L'excès de tampon a été soigneusement essuyé et la lamelle couvre-objet a été scellée avec une colle silicone à deux composants (Twinsil®, Picodent). Après un séchage de 10 minutes, le dispositif a été placé sur la platine d'un microscope inversé motorisé NIKON ECLIPSE Ti-E (Nikon Instruments Europe) équipé d'un objectif CFI SR APO TIRF 100× ON1.49, d'un système Perfect Focus, d'un module TIRF ILas2 (Roper Scientific) et d'une caméra monophotonique Evolve 128TM EMCCD 512 × 512 imaging array, 16 × 16 µm pixels (Photometrics). Les acquisitions ont été réalisées à 25°C dans une chambre de chauffe obscure (Okolab NA) sur une table anti-vibrations. La microscopie TIRF 2D et 3D multicanaux a été réalisée à l'aide du logiciel Metamorph 7.7 (Molecular Devices).

4.2.2. Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)

La résolution est la capacité d'un système optique à distinguer deux objets. La résolution est intrinsèquement limitée par la diffraction de la lumière qui induit une dispersion des ondes lumineuses lorsqu'elles passent à travers une ouverture. Il en résulte que l'image d'une source lumineuse (Figure 11a) à travers une ouverture donne un point lumineux plus large de plusieurs centaines de nanomètres aux contours flous auréolés de plusieurs cercles concentriques de plus faible intensité, appelé tache d'Airy (Figure 11a'). Selon un principe établi en 1873 par Ernst Abbe, il est impossible pour un microscope optique conventionnel (microscope en épifluorescence et microscope confocal) de distinguer deux structures lumineuses ponctuelles séparées par une distance inférieure à la moitié de la longueur d'onde de la lumière émise, soit environ 250 nm dans le spectre visible (Figure 11B).

Pour contourner cette limite technologique, de nouvelles techniques de microscopie dites super-résolutives ont vu le jour ces dernières années (Sigal *et al*., 2018 ; Schermelleh *et al*., 2019) et ont valu le prix Nobel de chimie aux Docteurs Eric Betzig, Stefan Hell et William Moerner en 2014. Parmi ces techniques, le STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) est basé sur la localisation de molécules uniques. Le STORM utilise des fluorochromes organiques photoconvertibles qui ont la capacité d'être activés (allumés) et désactivés (éteints) de manière répétée. Les fluorochromes sont ainsi activés de manière aléatoire (stochastique) par un faisceau d'excitation laser en champ large à haute intensité. Ceci induit un clignotement des fluorochromes au cours du temps, ce qui permet une séparation des tâches d'Airy de chaque fluorochrome (Figure 11C). Les tâches d'Airy apparaissent comme des points lumineux diffus isolés et chaque point correspond à une seule molécule fluorescente. Le centre de chaque point lumineux est déterminé en utilisant

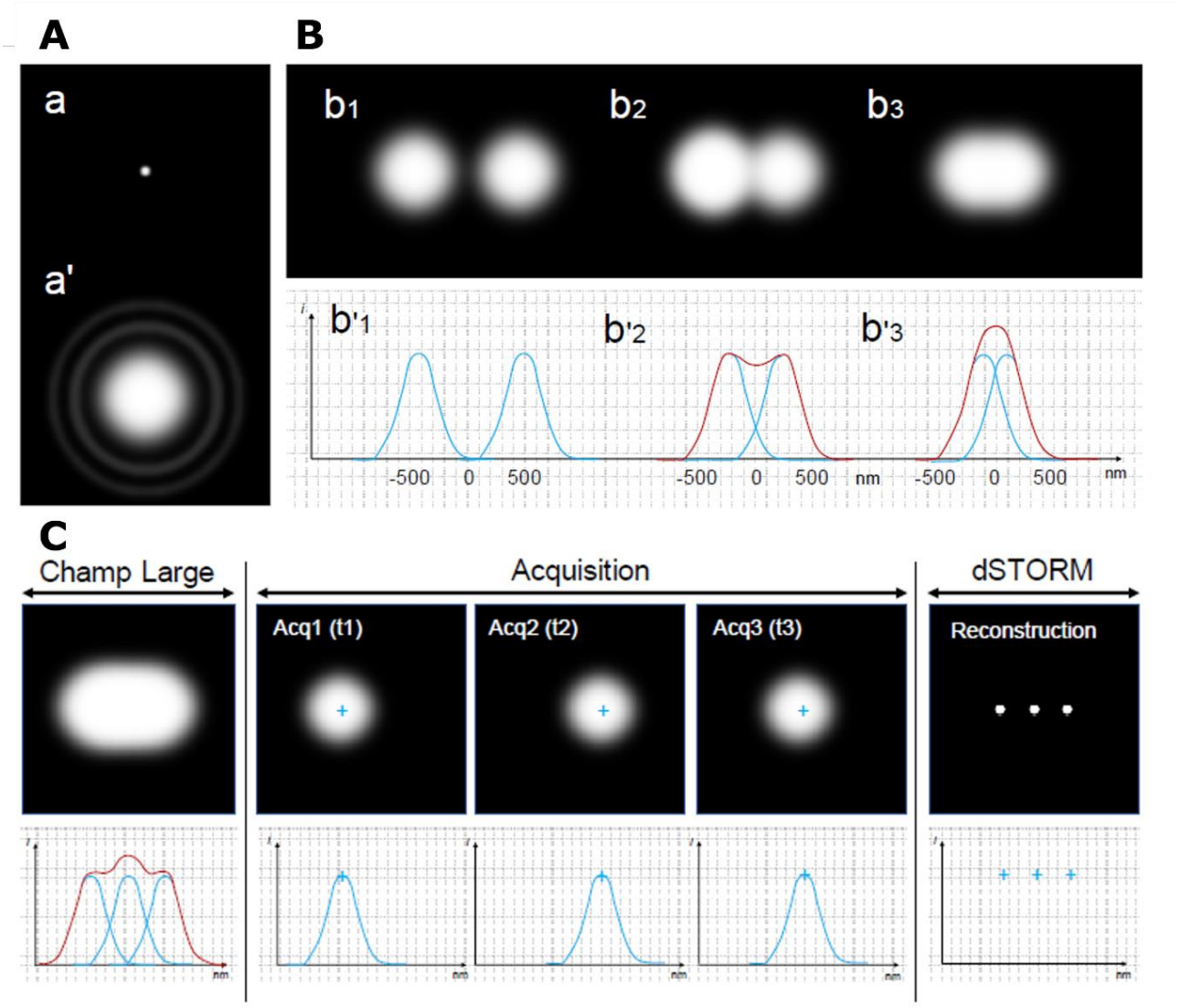


Figure 11 Principe de diffraction de la lumière et microscopie STORM. *(A) Source lumineuse (a) et son image (a') par conséquence de la diffraction des photons émis. (B) Illustration du principe d'Ernst Abbe qui dicte que deux sources lumineuses séparées d'une distance inférieure à 250nm sont impossibles à distinguer quel que soit le système optique utilisé. (C) L'image d'une structure marquée par 3 fluorophores en microscopie conventionnelle (Champ Large) est la somme des aires d'Airy de ces derniers, ne permettant pas de les distinguer s'ils sont trop rapprochés. Lors d'une acquisition STORM, les fluorochromes passent dans un état de clignotement permettant de séparer leurs aires d'Airy dans le temps (t1, t2, t3). (Acquisition). Le centre de chaque aire, correspondant à la localisation de la molécule fluorescente, est déterminé par fit gaussien (croix bleue) et marqué par un pixel sur une image de reconstruction. La répétition des acquisitions (Acq1, Acq2, Acq3) permet de s'assurer de détecter toutes les molécules fluorescentes afin d'obtenir d'une image super-résolue (reconstruction) en utilisant le principe du pointillisme. i : intensité. nm : nanomètres. (Issu de P. Codron, 2019).*

des méthodes de calcul basées sur l'ajustement gaussien (Figure 11C). Ce processus d'activation, d'imagerie et de localisation précise est répété des milliers de fois. À chaque cycle, différentes molécules sont activées et localisées. En accumulant les positions précises de toutes les molécules au cours de nombreux cycles, une image de super-résolutive est reconstruite. Le STORM permet ainsi de distinguer deux molécules individuellement même si elles sont très proches les unes des autres avec une résolution de l'ordre de 20 nm.

Pour réaliser les acquisitions en microscopie STORM, les lamelles supportant l'échantillon (cellules ou coupes histologiques) immunofixées et immunomarquées ont été montées sur une lame avec une cavité centrale concave (Paul Marienfeld GmbH&Co) remplie de 50 µL de tampon oxydoréducteur (Nanoscopy Smart Kit, Abbelight) et scellées avec une colle silicone à deux composants (Twinsil®, Picodent). Après un séchage de 10 minutes, le dispositif a été placé sur la platine d'un microscope inversé motorisé NIKON ECLIPSE Ti-E (Nikon Instruments Europe) équipé d'un objectif CFI SR APO TIRF 100× ON1.49, d'un système Perfect Focus, d'un module TIRF ILas2 (Roper Scientific) et d'une caméra monophotonique Evolve 128TM EMCCD 512 × 512 imaging array, 16 × 16 µm pixels (Photometrics). Les acquisitions ont été réalisées à 25°C dans une chambre de chauffe obscure (Okolab NA) sur une table anti-vibrations. La puissance d'excitation des laser 647 nm ou 568 nm a ensuite été augmentée (de 50 à 100 mW devant la lentille de l'objectif) pour induire le clignotement des fluorophores. Le gain d'émission de la caméra a été réglé sur une amplification élevée afin d'optimiser le rapport signal/bruit. Les images ont été acquises avec un temps d'intégration de 30 ms par image. Le nombre total d'acquisition pour chaque séquence a été adapté à la densité de marquage (5000 à 10 000 images). La position centrale des fluorophores a été déterminée par l'ajustement d'une fonction gaussienne 2D à l'aide du logiciel WaveTracer (Roper Scientific). Imaris 8.0 (Bitplane, Zurich, Suisse) a été utilisé pour le traitement et l'analyse des images (mesures de longueur et de volume, coefficient de Pearson).

5. Acquisition et traitement d'images

5.1. Metamorph

Le logiciel MetaMorph 7.7 (Molecular Devices) a été utilisé pour toutes les acquisitions d'images : images de fluorescence classiques, TIRF 2D et 3D, STORM.

5.2. Huygens

Certaines acquisitions ont été réalisées par un scan en Z, de quelques 10^{aines} de plans, espacées de pas de 100nm. Les signaux obtenus ont été traités à l'aide du logiciel Huygens (Scientific Volume Imaging, Pays-Bas) par déconvolution en prenant en compte les caractéristiques optiques du système. Le logiciel utilise des algorithmes pour corriger la diffraction de la lumière ce qui permet d'améliorer le rapport signal sur bruit et la résolution des images.

5.3. Image J

Le logiciel ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA) a été utilisé pour le traitement des acquisitions et notamment pour assigner une couleur à chaque acquisition en noir et blanc, pour superposer les canaux et créer les images composites, et pour intégrer les échelles des images. Le module SURFF (Super-Resolution Radial Fluctuations) a été utilisé en complément de l'analyse de certaines images des images STORM (https://github.com/HenriquesLab/NanoJ-SRRF).

5.4. Imaris

Le logiciel Imaris 8.0 (Bitplane, Zurich, Switzerland) a été utilisé pour la modélisation des surfaces en 3D grâce au module Iso-Surface, pour la mesure de longueurs et de volumes, pour le calcul du coefficient de colocalisation de Pearson, et pour la reconstruction des images STORM.

6. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 8.0 (GraphPad Software, USA). La normalité des données a été testée avec le test de Shapiro-Wilk. L'homoscédasticité a été testée avec le test de Fischer. Pour les données qui suivaient la loi normale et dont les variances étaient égales, une Anova 1 voie a été utilisées pour comparer plus de deux groupes. Pour les données qui ne suivaient pas la loi normale et/ou dont les variances n'étaient pas égales, des tests non paramétriques ont été utilisés. Pour comparer deux groupes le test de Mann-Whitney a été utilisé, pour comparer trois groupes ou plus, le test de Kruskal-Wallis a été utilisé. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque la p-value était inférieure à 0,05.

7. Analyse *in silico* : utilisation des bases de données et outils de prédiction

7.1. RNAct

Pour l'étude de l'interaction de TDP-43 avec des ARN, le logiciel RNAct (Lang *et al*., 2019 ; tartaglialab, Italie) a été utilisé. RNAct est un logiciel dédié à la prédiction des interactions entre protéines et ARN chez plusieurs organismes modèles, notamment l'humain, la souris et la levure. Le logiciel fonctionne en combinant des données expérimentales et des algorithmes de prédiction pour fournir des vues globales de l'interactome protéine-ARN. Les données expérimentales proviennent principalement de techniques comme RIP-Seq et CLIP-Seq, qui permettent de capturer les ARN associés à des protéines spécifiques. Couplé à ces méthodes, RNAct utilise des algorithmes de prédiction comme catRAPID. Ces algorithmes calculent les prédispositions d'interaction basées sur des caractéristiques physico-chimiques et structurelles des protéines et des ARN, permettant de prédire les sites de liaison et la force des interactions potentielles. Le logiciel permet de rechercher des interactions spécifiques entre des paires protéine-ARN, ou explorer des bases de données préexistantes contenant des milliards d'interactions possibles. Le logiciel a été utilisé pour étudier l'interaction de la protéine TDP-43 avec 11 ARN localisés au centrosomes par Zein-Sabatto et Lerit (2021); Saffieddine *et al*., (2021); Chouaib *et al*., (2020).

7.2. BioGRID

Pour recenser toutes les protéines qui interagissent avec TDP-43, la base de données BioGRID (Biological General Repository for Interaction Datasets) a été utilisée. BioGRID est une base de données publique exhaustive qui archive et diffuse des données sur les interactions génétiques et protéiques provenant d'un large éventail d'organismes modèles et humains. Actuellement, elle recense plus d'1,4 million d'interactions, répertoriées à partir de plus de 57 000 publications scientifiques.

8. Etude *in vivo* : Evaluation des effets de protéines insolubles issues de cerveau de patient atteint de SLA chez la souris

8.1. Etude *in vivo*

8.1.1. Design expérimental

38 souris C57BL/6J de 8 mois (Janvier Labs) ont été utilisé. Les souris ont été réparties en 3 groupes expérimentaux (12 souris par groupe ; 6 mâles et 6 femelles), un groupe contrôle négatif (ayant reçu des injections de PBS 1X, un groupe contrôle sain (ayant reçu les injections de protéines insolubles issues de sujet non atteint de pathologie neurodégénérative (Ctrl_3, données cliniques Tableau 4), et un groupe expérimental (ayant reçu les injections de protéines insolubles issues d'un patient atteint de SLA (sSLA_5, données cliniques Tableau 4)). Les groupes étaient composés à moitié d'individus mâles et à moitié d'individus femelles car la SLA touche les deux genres chez l'Homme. Les animaux ont été pesés deux fois par semaines avant les injections et tests comportementaux pendant toute l'étude. Les animaux ont reçu une administration intrathécale de la solution correspondante pour chaque groupe par semaine sous anesthésie pendant 8 semaines. Pendant les 8 semaines d'injections, puis pendant les 4 semaines de repos qui ont suivies, les performances motrices des animaux ont été mesurés, ainsi que les performances cognitives en semaine 10. A la fin des 12 semaines de l'étude, la moitié des animaux ont été sacrifiés par décapitation pour les analyses biochimiques, et l'autre moitié par perfusion cardiaque de PFA 4%. Les cerveaux et les moelles épinières ont été prélevés en vues des analyses biologiques.

8.1.2. Hébergement

Les animaux ont eu une période d'acclimatation minimale de 5 jours avant le début de l'étude dans les locaux de Porsolt après livraison par le fournisseur. Les souris ont été hébergées dans une animalerie de niveau de biosécurité 2 et regroupées dans des cages ventilées individuellement (NEXGEN MOUSE IVC, Allentown, 77600 Bussy-Saint George, France). Un enrichissement par nidification a été fourni (tube stérile, coton stérile et bois stérile). L'éclairage artificiel était allumé 12 heures par jour entre 7h00 et 19h00, avec une température ambiante contrôlée de 22 ± 2°C et des taux d'humidité enregistrés. Les animaux avaient un accès libre à la nourriture (Code A04 - SAFE, 89290 Augy, France) et à l'eau. L'alimentation et la litière de bois ont été analysées par les fournisseurs pour en déterminer la composition et les niveaux de contaminants. Des analyses bactériennes et chimiques de l'eau ont été effectuées régulièrement par des laboratoires externes. Ces analyses incluent la détection d'éventuels contaminants (pesticides, métaux lourds et sous-produits de nitrates).

8.1.3. Points limites

Une perte de poids corporel supérieure à 10 % par rapport au poids initial correspond au stade précoce de la maladie. Une perte de poids corporel comprise entre 10 et 20 % correspond au stade tardif de la maladie. Une perte de poids corporel supérieure à 20 % par rapport au poids initial de l'animal pendant deux mesures consécutives est considérée comme le stade terminal. Une sédation marquée pendant les périodes de vigilance, une hypothermie persistante (< 35,5 °C), un refus de manger et de boire, des troubles de la marche (manque d'équilibre) ou une détresse évidente des animaux ont été considérés comme des critères d'évaluation. Lorsqu'au moins une de ces conditions a été remplie, les souris ont été anesthésiées et sacrifiées selon le mode de mise à mort prévue pour le groupe de l'individu. Les animaux ayant été sacrifiés pour des raisons éthiques ont été soumis à une collecte de tissus lorsque cela était possible.

8.1.4. Injections

Avant chaque administration, les souris ont été placées sous anesthésie à l'isoflurane (5% pour l'induction et 2% pour le maintien). Les administrations intrathécales ont été effectuées sous une hotte à flux laminaire. Les extraits de protéines insolubles issus de patients atteints de SLA, de sujet non atteint de maladie neurodégénérative ou la solution de PBS ont été administrés par voie intrathécale à l'aide d'une seringue Hamilton (volume maximum de 10 µL par injection en bolus). Chaque souris a reçu l'équivalent de 60 µg de protéines insolubles par injection. L'aiguille de la seringue a été placée dans l'espace intervertébral L5-L6. Le réflexe de la queue a été observé lorsque l'aiguille est insérée dans l'espace intervertébral lombaire et pour valider le placement de l'aiguille. À la fin de l'injection, les souris ont été placées dans une cage sur une plaque chauffante et surveillées jusqu'à leur réveil. Ensuite, les souris ont été replacées dans leur cage d'hébergement.

8.1.5. Tests comportementaux

Les fonctions motrices et cognitives des souris ont été évaluées par des tests comportementaux réalisés sous une hotte à flux laminaire de la semaine 1 à la semaine 9. Ensuite, les mesures ont été réalisées dans des conditions standard de la semaine 10 à la semaine 12.

a) Rotarod

Les performances motrices des souris ont été évaluées la semaine 1, la semaine 3 et une fois par semaine de la semaine 5 à la semaine 12 à l'aide du test du Rotarod (Ugo Basile : modèle 7650). Une session d'habituation des animaux au test a été réalisée 24 heures avant la première administration intrathécale, puis une session de test pour évaluer les performances de base a été effectuée au moins 2 heures après la période d'habituation. Les performances motrices ont ensuite été testées après les administrations intrathécales comme suit. Les souris ont été placées sur une tige (diamètre = 3 cm) tournant à une vitesse de 18 tours par minute. Le nombre d'animaux qui sont tombés de la tige dans les 3 minutes a été compté et les temps de chute ont été enregistrés (maximum : 3 minutes).

a) Wire hang test

Pour évaluer la force musculaire des animaux, le test du Wire Hang a été utilisé. La souris a été placée sur le dessus d'un couvercle de cage standard qui est ensuite secoué doucement pour inciter la souris à s'agripper aux barreaux, puis inversé pendant 120 s. Le couvercle a été surélevé de 10 à 15 cm au-dessus d'une litière douce. Trois essais consécutifs ont été effectués avec une période de repos de 5 minutes entre chaque essai. La latence de chute du couvercle de la cage a été mesurée. Les souris ont été testées quelques jours avant la première administration intrathécale, puis la semaine 1, la semaine 3 et une fois par semaine de la semaine 5 à la semaine 12.

b) Y-maze test

La mémoire spatiale à court terme des souris a été évaluée à l'aide du test du Y-maze. Le labyrinthe en Y est constitué de trois bras identiques construits en plexiglas gris opaque (35×8×14cm) placés à des angles de 120° les uns par rapport aux autres. Pendant la phase d'exploration, les souris ont été placées à l'extrémité du bras de départ et ont été autorisées à explorer les deux premiers bras du Y pendant 5 minutes. L'accès au troisième bras du labyrinthe (nouveau bras) était bloqué par une porte opaque. Ensuite, les souris sont transférées dans leur cage d'origine pendant 2 minutes. Puis les souris ont été replacées dans le bras de départ et ont pu explorer les trois bras du labyrinthe après que la porte du 3ème bras n'a été retirée pendant 5 minutes. Chaque session (exploration et test) a été enregistrée sur vidéo et le comportement des animaux a été analysé à l'aide d'un système de suivi vidéo (EthoVision, Noldus). Le temps total passé et la distance totale parcourue dans chaque bras ont été mesurés (l'entrée dans le bras est définie comme l'entrée des quatre pattes dans le bras). Le pourcentage du temps passé et de la distance totale parcourue dans le nouveau bras (précédemment fermé pendant la phase d'exploration) ont été calculés et utilisés comme mesure de la mémoire spatiale à court terme. Le test a été réalisé au cours de la semaine 10.

8.1.6. Sacrifice

À la fin du protocole, tous les animaux ont été sacrifiés selon deux méthodes. La moitié des animaux de chaque groupe a été sacrifié par décapitation en vue d'analyses biochimiques, et l'autre moitié a été sacrifié par perfusion cardiaque de PFA 4% pour les analyses histologiques. Pour les animaux destinés aux analyses histologiques, les souris ont été anesthésiées par isoflurane et perfusées par voie transcardiaque avec du sérum physiologique hépariné suivi de paraformaldéhyde à 4 %. Pour chaque animal, le cathéter a été inséré dans le cœur. Une incision a été pratiquée dans le ventricule gauche et le cathéter a été placé dans l'artère aortique. L'oreillette droite a été coupée afin d'éliminer le sang lors de la perfusion. Les animaux destinés aux analyses biochimiques, ont été décapités sous anesthésie à l'isoflurane.

8.1.7. Prélèvements biologiques

Pour les souris destinées aux études biochimiques ayant été mises à mort par décapitation, le cerveau a rapidement été retiré du crâne et le cortex frontal (entre 100 et 200 mg) de chaque hémisphère a été disséqué, rincé dans une solution saline physiologique, pesé et placé dans des flacons séparés pré-étiquetés et congelés aussitôt dans l'azote liquide. Les flacons ont été conservés en position verticale à environ -70°C et à l'abri de la lumière jusqu'à l'analyse. De la même façon la moelle épinière a été rapidement prélevée et séparée

en trois parties (moelle cervicale, moelle thoracique et moelle lombaire). Les trois parties ont été rincées dans du sérum physiologique, pesées et placées dans des flacons distincts pré-étiquetés et congelées à l'azote liquide.

Pour les animaux destinés aux analyses histologiques sacrifiés par perfusion cardiaque de PFA 4%, les cerveaux entiers ont été prélevés ainsi que la moelle épinière coupée en trois sections comme décrit ci-dessus. Chaque échantillon a été placé dans du paraformaldéhyde à 4 % pendant 24 heures. Ensuite, les cerveaux et chaque section de moelle épinière ont été rincés 3 fois dans du PBS et ont été conservés dans du PBS avec de l'azide (0,01%) jusqu'à l'inclusion dans la paraffine.

8.2. Etude *ex vivo*

8.2.1. Analyses histologiques

Pour les analyses histologiques, les cerveaux fixés au PFA 4% ont été inclus en paraffine, puis des coupes coronales de 4 µm d'épaisseur ont été réalisées au niveau frontal, 2 mm en avant du Bregma (AP = +2 mm, Paxinos et Franklin). Les 3 segments de moelle épinière (cervicale, thoracique et lombaire) fixés au PFA ont été coupés en 3 sections transversales espacées de 300 µm avant d'être inclus en paraffine. Puis des coupes transversales de 4 µm d'épaisseur des 3 sections des 3 segments ont été réalisées.

L'immunomarquage a été effectué automatiquement à l'aide d'une plateforme Ventana Ultra (Roche Diagnostics) et de réactifs spécifiques. Brièvement, la révélation de l'antigène a été effectuée à pH6 et pH8 et les anticorps primaires ont été incubés à 37°C pendant 1 heure. La détection a été effectuée à l'aide du système Omnimap (Roche). Les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline pour l'identification des noyaux. Les images de l'ensemble du tissu ont ensuite été acquises à l'aide de la plateforme VS 200 (Olympus®).

Partie I : Etude de la dynamique de TDP-43 en condition physiologique

1. Introduction : TDP-43, une protéine de liaison à l'ARN

Comme il a été évoqué précédemment, la protéine TDP-43 est une protéine de liaison à l'ARN (RNA binding protein = RBP). Les RBP sont des protéines qui possèdent la capacité de se lier à l'ARN simple ou double brin, formant ainsi des complexes ribonucléoprotéiques (RNP). Les RBP jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes, notamment à travers l'épissage, le clivage, la polyadénylation, la stabilisation, le transport ou la traduction des ARNs avec lesquels elles interagissent. Etant donné l'importance de ces protéines dans des fonctions cellulaires essentielles, un dysfonctionnement des RBP peut-être à l'origine de pathologies neurodégénératives (Kinoshita *et al*., 2021), immunitaires (Hashimoto et Kishimoto, 2022), néoplastiques (Pereira *et al*., 2017) ou encore génétiques (Gebauer *et al*., 2021). De plus, les étapes de régulation de l'expression des gènes intervenant dans différents compartiments cellulaires, les fonctions régulatrices des RBP dépendent de leur localisation subcellulaire.

Ces dernières années, la présence de RBP au niveau du centrosome des cellules a suscité un intérêt croissant car des ARNm et des ribosomes ont été identifiés au niveau de cet organite (Zein-Sabatto et Lerit, 2021 ; Saffieddine *et al*., 2021; Chouaib *et al*., 2020). Le centrosome est un organite sans membrane (MLO) et il constitue le principal centre d'organisation des microtubules (MTOC) dans les cellules humaines, contrôlant la forme, la polarité, le trafic, la motilité, la ciliogénèse et le cycle cellulaire (Bornens, 2020). Les RBP s'associent à des ARNm pour former un complexe ARN/protéine appelé ribonucléoprotéine (RNP). Ces RNP vont pouvoir transporter les ARNm vers la matrice péricentriolaire (PCM) le long des microtubules et faciliter leur traduction locale (Lashkevich et Dmitriev, 2021). En effet, les ARNm des protéines centrosomales sont pris en charge par des RBP formant ainsi des RNP qui seront acheminées vers le centrosome par un mécanisme actif le long des microtubules grâces à des moteurs moléculaires tels que les dynéines et les kinésines. Une fois localisés et ancrés au centrosome, la machinerie traductionnelle est recrutée pour permettre la traduction des ARNm centrosomaux (Buxbaum *et al*., 2014). Un certain nombre de protéines centrosomales sont traduites localement de cette façon, comme la péricentrine qui est une protéine structurale de la PCM qui joue un rôle crucial dans l'ancrage des microtubules (Sepulveda *et al*., 2018). La traduction locale permet la synthèse de protéines directement sur leur site d'activité, et c'est un mécanisme permettant une réponse rapide et ciblée aux besoins cellulaires. La traduction locale est donc essentielle pour les fonctions du centrosome et les processus cellulaires qui en dépendent. Au vu du rôle essentiel des RBP dans la traduction locale des protéines, et la protéine TDP-43 étant une RBP, nous avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait être localisée au niveau du centrosome avec une fonction propre au niveau de cet organite et des conséquences pathologiques en cas de dérégulation.

2. Objectif

Afin de répondre à notre hypothèse, l'objectif de cette première partie a été d'étudier la localisation de TDP-43 au niveau du centrosome en condition physiologique, en combinant différentes approches biochimiques, et microscopiques à haute- et super-résolution. Ces techniques de microscopie super-résolutives ont été mises en place au sein de notre laboratoire et nous ont permis par le passé de définir avec un niveau de détail sans précédent la structure des inclusions pathologiques retrouvées dans le cerveau de patients atteints de pathologies neurodégénératives (Codron *et al.*, 2020 ; Vovard *et al.*, 2024 ; respectivement Annexe 3 et 4).

3. Résultats

3.1. Localisation de la protéine TDP-43 par microscopie à fluorescence en condition physiologique

3.1.1. Immunomarquages avec différents anticorps anti-TDP-43

Afin d'étudier la présence de TDP-43 au sein du centrosome en condition physiologique, nous avons dans un premier temps effectué des immunomarquages dirigés contre la protéine TDP-43 et la péricentrine, une protéine du centrosome, dans des fibroblastes humains (hSF : human skin fibroblasts). Les résultats en microscopie à fluorescence à haute résolution TIRF ont démontré une localisation physiologique nucléaire de TDP-43, mais également au niveau d'un corpuscule périnucléaire qui co-localisait avec la péricentrine. Cette colocalisation n'a pu être observée que dans les cellules où le centrosome ne se superposait pas au noyau (Figure 12A). De plus, nous avons observé que lorsque les cellules étaient fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% à 4°C, nous retrouvions cette colocalisation en moyenne dans 49,5% des cellules, contre 97% de colocalisation dans les cellules ayant été fixées au méthanol à -20°C (Figure 12B). La fixation au méthanol favorise donc l'observation de cette colocalisation avec une différence significative de $p=0,0159$ ($n=5$, test de Mann-Whitney).

Afin de nous assurer que cette observation n'était pas due à une reconnaissance croisée ou aspécifique de l'anticorps utilisé, nous avons reproduit ces résultats avec 5 références d'anticorps anti-TDP-43 différents (Tableau 6, Figure 13A), et un anticorps anti-phospho-TDP-43 de différents fournisseurs, produits chez différentes espèces, et ciblant différents épitopes de la protéine (Figure 13B). Ces observations nous ont permis de conclure que TDP-43 était localisée au niveau du centrosome en condition physiologique sur lignée primaire, avec des conditions de fixation et d'observation dédiées (fixation au méthanol couplée à la microscopie haute-résolution).

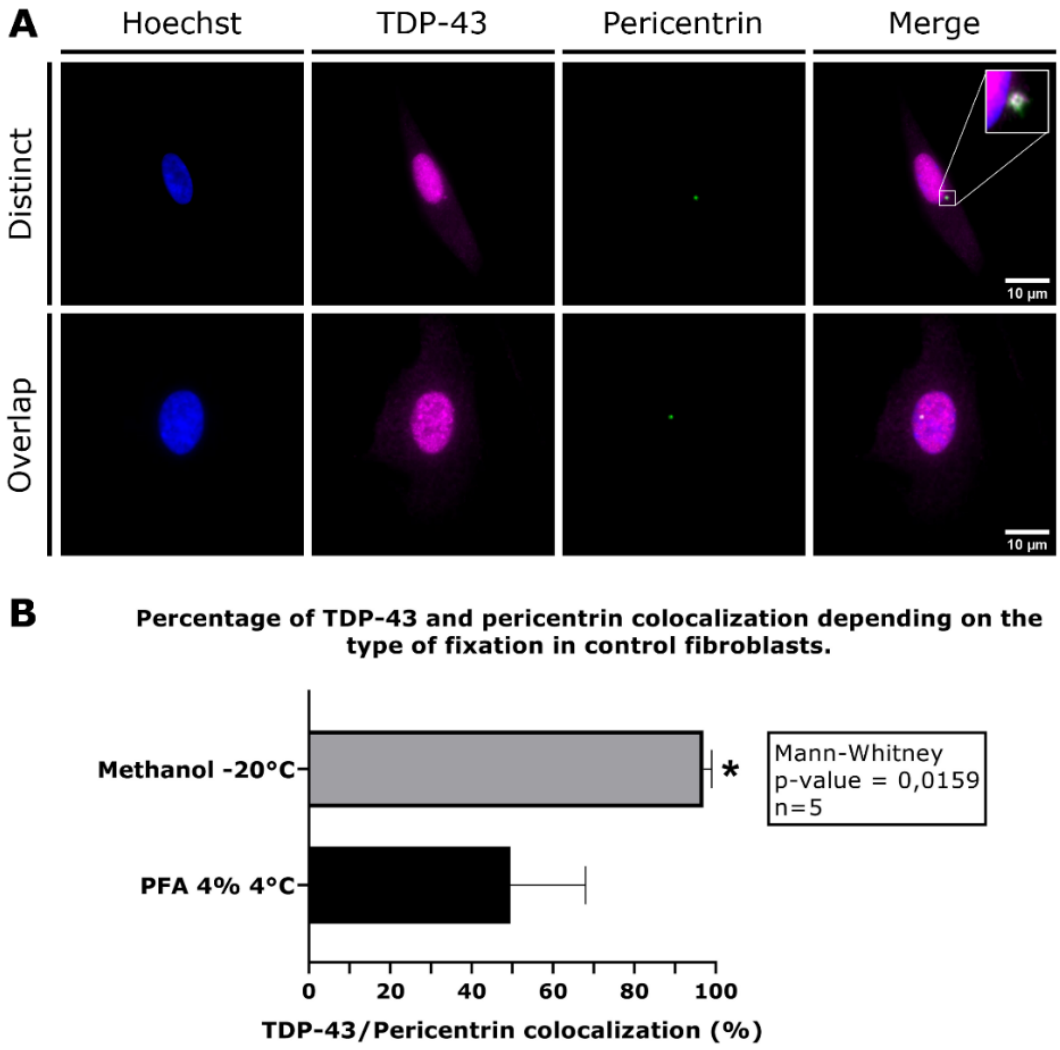


Figure 12 Colocalisation de TDP-43 et de la péricentrine dans des fibroblastes contrôles. *(A) Images de microscopie TIRF (Total Internal Reflection) sur des fibroblastes de peau humains sains fixés et immunomarqués contre TDP-43 (mangenta) et la péricentrine (vert) montrant la colocalisation des deux signaux au sein du centrosome observable uniquement lorsque ce dernier ne se superpose pas au noyau. (B) Pourcentage de colocalisation de TDP-43 et de la péricentrine en fonction du type de fixation utilisé.*

Tableau 6 Référence des anticorps dirigés contre TDP-43 utilisés.

Cible	Espèce	Fournisseur	Référence
Anti-TDP-43 Polyclonal	Lapin polyclonal	Proteintech	10782-2-AP
Recombinant Anti-TDP43 antibody	Lapin monoclonal	Abcam	ab109535
Anti-TDP-43 (C-terminal) Polyclonal	Lapin polyclonal	Proteintech	12892-1-AP
Anti-TDP-43 (human specific) Monoclonal	Souris monoclonal	Proteintech	60019-2-Ig
Anti-TDP43 [2E2-D3]	Souris monoclonal	Abcam	ab57105
Anti-Phospho-TDP43 (Ser409/410) Polyclonal	Souris polyclonal	Proteintech	22309-1-AP

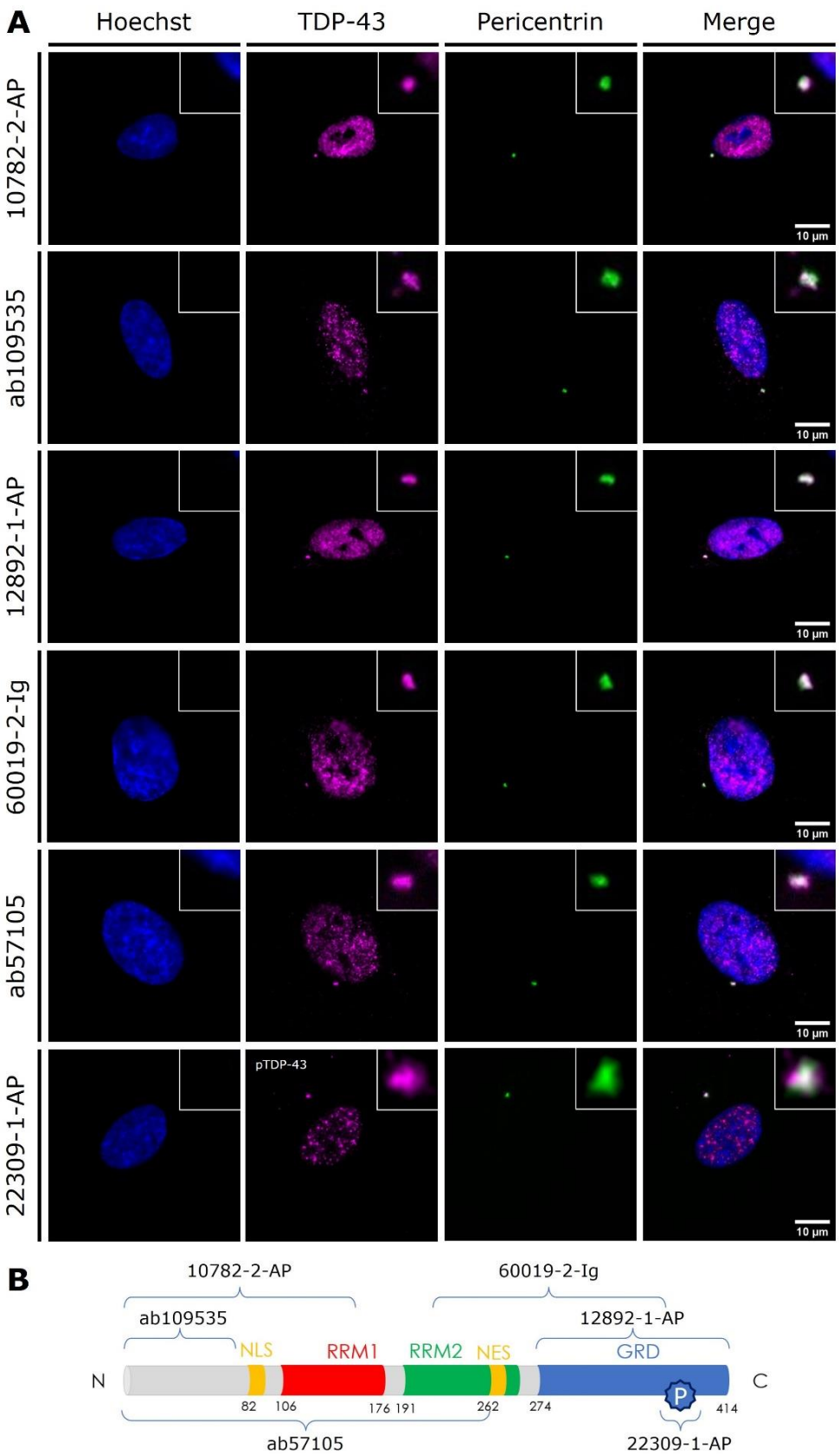


Figure 13 Colocalisation de TDP-43 et de la péricentrine avec différents anticorps dirigés contre TDP-43. *(A) Images de microscopie à réflexion interne totale (TIRF) sur des fibroblastes de peau humains fixés et immunomarqués contre TDP-43 ou phosphoTDP-43 avec différentes références (mangenta) et la péricentrine (vert) montrant la colocalisation des deux signaux. (B) Représentation schématique des immunogènes reconnus par les différentes références d'anticorps utilisés sur la séquence protéique de TDP-43.*

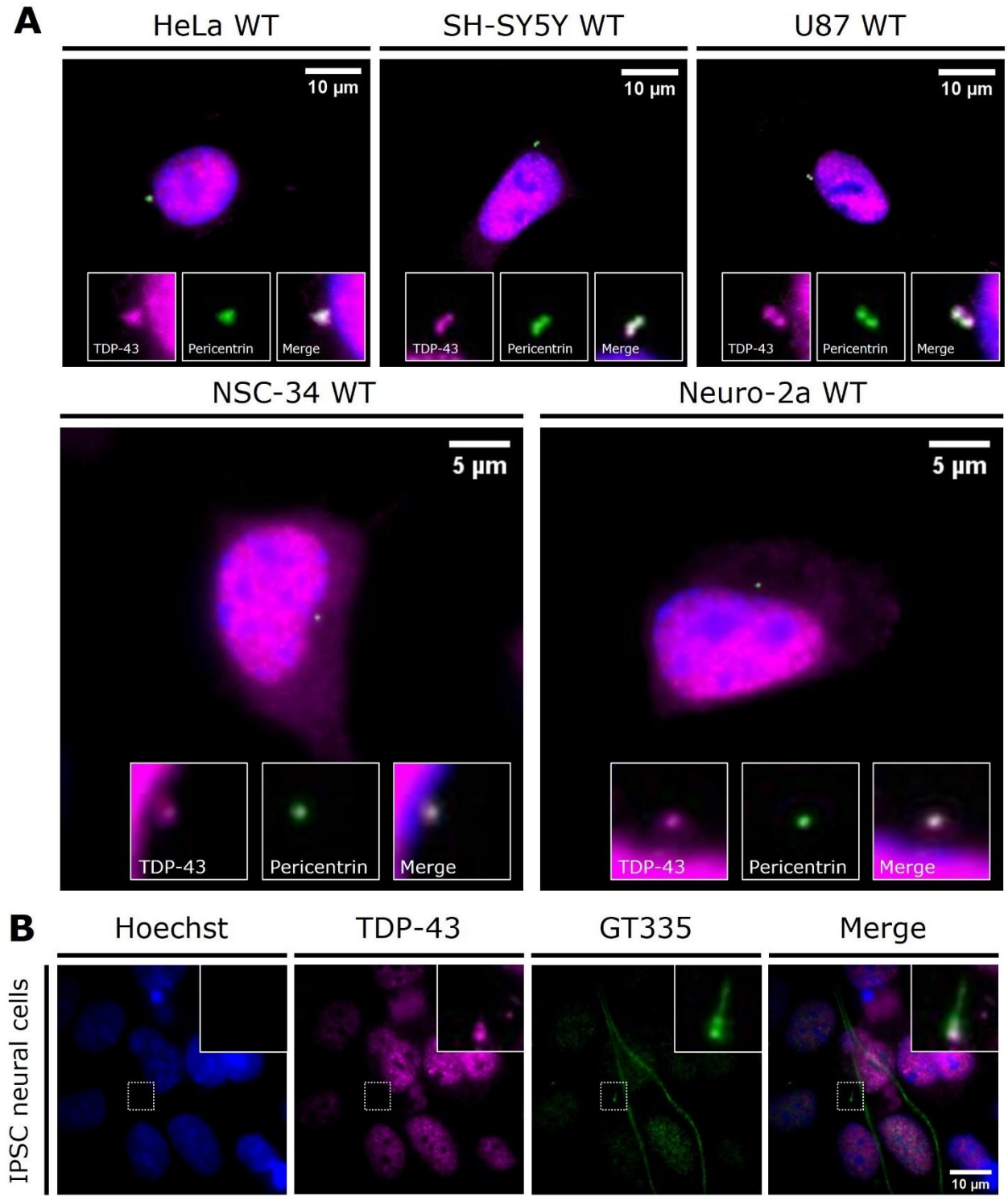


Figure 14 Colocalisation de TDP-43 au sein du centrosome dans différentes lignées cellulaires. (A) *Images de microscopie TIRF de cellules pseudo-neuronales HeLa, U87, SH-SY5Y, NSC-34 et Neuro-2a immunomarquées avec des anticorps dirigés contre TDP-43 (10782-2-AP) (magenta) et la péricentrine (vert), montrant une colocalisation des deux signaux lorsqu'ils sont fusionnés. (B) Images de microscopie à réflexion interne totale (TIRF) sur cellules souches pluripotentes induites différenciées en cellules neurales immunomarquées avec des anticorps dirigés contre TDP-43 (10782-2-AP) (magenta) et le cil primaire (GT335) (vert).*

3.1.2. Dans différentes lignées cellulaires couramment utilisées en neurosciences

Afin de nous assurer de la reproductibilité de nos résultats, nous avons ensuite étudié cette colocalisation avec la même approche en microscope à fluorescence haute résolution TIRF dans différentes lignées cellulaires couramment utilisées en recherche. En plus des fibroblastes de peau humaine, nous avons étudié cette association dans 5 lignées cellulaires : la lignée HeLa qui est une lignée de cellules épithéliales dérivées d'un adénocarcinome cervical humain, la lignée SH-SY5Y qui est dérivée d'un neuroblastome humain, la lignée U87 qui est dérivée d'un glioblastome humain, la lignée Neuro-2a dérivée d'un neuroblastome murin, et enfin la lignée hybride NSC-34 qui est produite par la fusion d'un neuroblastome murin avec des motoneurones primaires de moelle épinière d'embryons de souris. De cette façon, nous avons pu mettre en évidence la colocalisation de TDP-43 et de la péricentrine dans ces 5 lignées cellulaires pseudo-neuronales humaines et murines (Figure 14B). Nous avons également utilisé des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) obtenues à partir de fibroblastes humains puis différenciées en cellules neurales. Les neurones et cellules gliales matures expriment un cil primaire qui prend son origine au niveau du centrosome et qui joue un rôle essentiel dans l'intégration des signaux extracellulaires, la régulation de la différenciation neuronale, la migration et l'intégration synaptique, et sont impliqués dans le développement cérébral, les fonctions cognitives et certains processus pathologiques. De ce fait nous avons réalisé des co-immunomarquages de TDP-43 et du cil primaire (GT335) dans ces iPSC différenciées en cellules neurales nous ayant permis d'observer la présence de TDP-43 à la base du cil primaire de ces cellules, au niveau du centrosome où le cil prend son origine (Figure 14A). Ces résultats renforcent l'hypothèse que la protéine TDP-43 est localisée au sein du centrosome en condition physiologique.

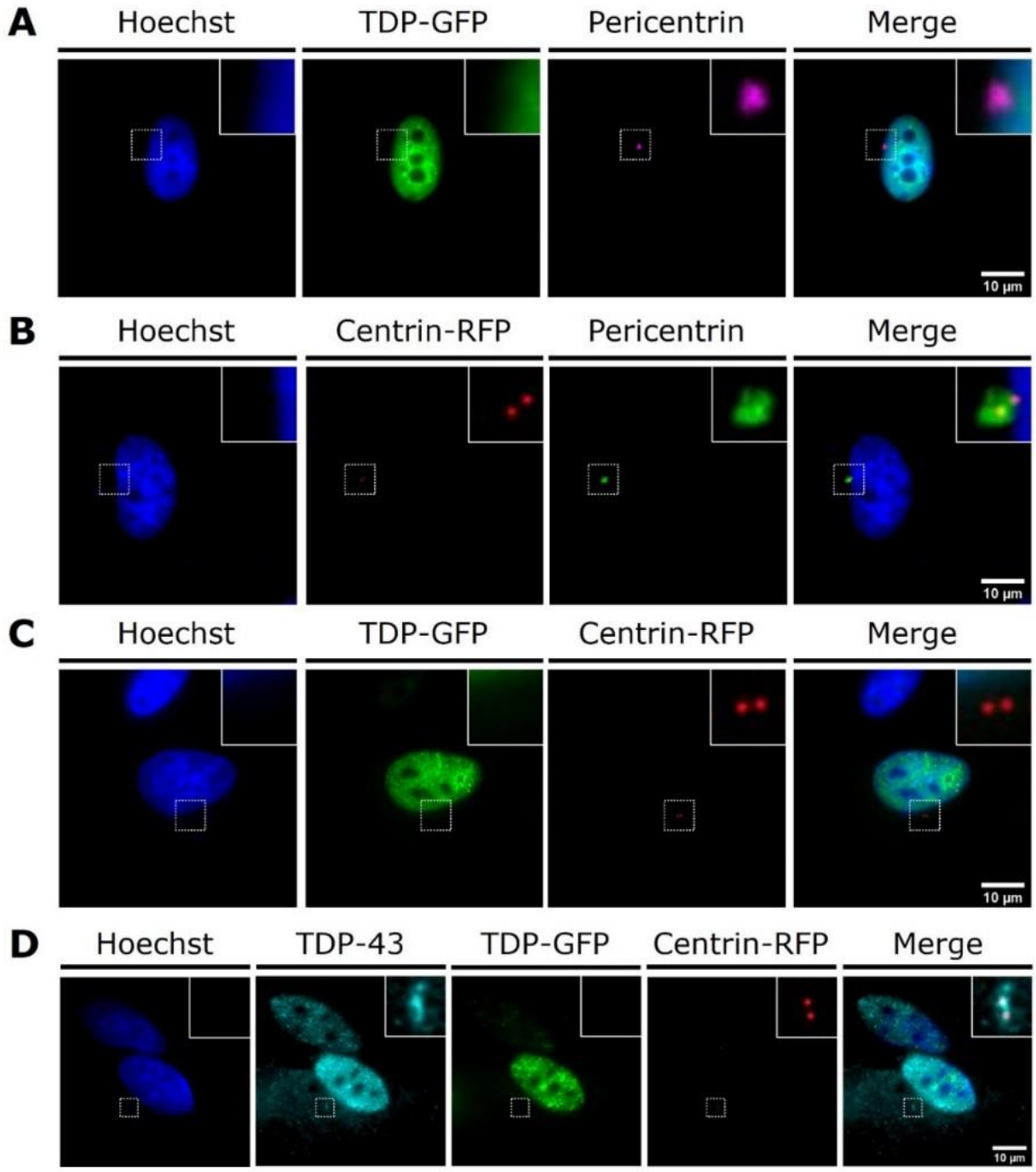


Figure 15 Transfection des plasmides TDP-GFP et Centrine-RFP dans des cellules HeLa. *Images de microscopie à fluorescence montrant la transfection du plasmide TDP-GFP (A), Centrin-RFP (B), ou la co-transfection de ces deux plasmides (C). (D) Co-transfection des plasmides TDP-GFP et Centrine-RFP associés à un immunomarquage de la protéine TDP-43, révélant la présence de la protéine endogène au sein du centrosome mais une absence de la forme exogène.*

3.1.3. Par transfection de plasmides

Nous avons ensuite cherché à confirmer cette localisation centrosomale de la protéine TDP-43 à l'aide d'une autre approche. Nous avons alors utilisé un plasmide codant pour la protéine TDP-43 couplée à la GFP (TDP-GFP) ainsi qu'un plasmide codant pour la centrine couplée à la RFP (Centrine-RFP). Ces plasmides ont dans un premier temps été transfectés séparément dans des cellules HeLa pour s'assurer de leur expression et de leur localisation physiologique, puis co-transfectés pour étudier la colocalisation de TDP-43 au sein du centrosome. La transfection du plasmide TDP-GFP nous a permis d'observer une fluorescence nucléaire de la GFP, traduisant une localisation nucléaire de la protéine TDP-43 produite, en accord avec sa localisation physiologique, mais ne nous a pas permis d'observer de corpuscule péri-nucléaire localisé au centrosome (Figure 15A). La transfection du plasmide Centrine-RFP a induit une fluorescence au niveau des deux centrioles du centrosome (Figure 15B), reflétant bien la localisation physiologique de la centrine, nous ayant permis de conclure que les deux plasmides étaient bien fonctionnels. La co-transfection des deux plasmides nous a permis d'observer une localisation nucléaire de TDP-43, mais sans colocalisation au niveau du centrosome avec le plasmide Centrine-RFP (Figure 15C). Enfin, lorsque les cellules ont été co-transfectées avec les plasmides TDP-GFP et Centrin-RFP, et que l'on a réalisé par la suite un immunomarquage contre la protéine TDP-43, nous avons bien observé le corpuscule péri-nucléaire de TDP-43 qui colocalisait avec la péricentrine, que nous n'avons pas retrouvé au niveau du signal de fluorescence de la GFP (Figure 15D). Ces résultats semblent suggérer que la protéine TDP-43 endogène est bien présente au sein du centrosome, mais que la transfection d'une forme exogène couplée à la GFP ne permet pas son recrutement, son expression ou sa détection au sein du centrosome. La GFP est une protéine relativement grande et son ajout peut entraîner des conséquences sur l'expression et la localisation de la protéine TDP-43. D'une part, l'ajout de la GFP peut entrainer des changements conformationnels entrainant un changement de la structure tridimensionnelle de la protéine native. Ces changements peuvent être responsables d'une absence de reconnaissance de la protéine par ses partenaires habituels, ou masquer des signaux de localisation ou des régions d'intérêt. Aussi, le couplage a une GFP peut entrainer un défaut de transport intracellulaire par un défaut de reconnaissance par les kinésines et dynéines, et ainsi entraver le transport intracellulaire de la protéine exogène. De plus, dans la construction utilisée ici, la GFP était couplée en région C-terminale de TDP-43, il est donc probable qu'elle interfère avec les interactions protéines-protéines normalement médiées par ce domaine et possiblement responsable de l'ancrage de la protéine TDP-43 au centrosome.

3.2. Etude de la localisation de TDP-43 sur centrosome isolé

Pour poursuivre l'étude la localisation centrosomale de la protéine TDP-43, nous avons combiné nos résultats à des approches spécifiques complémentaires. Pour se faire nous nous sommes rapprochés de l'équipe du Dr Anne-Marie Tassin à l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) CEA, CNRS, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, 91190 Gif sur Yvette, France. L'équipe du Dr Tassin est une équipe référente sur le centrosome et spécialiste renommée de la dynamique du cytosquelette, notamment des microtubules, et de son rôle crucial dans divers processus cellulaires. Son équipe mène des travaux de pointe visant à mieux comprendre les mécanismes moléculaires régulant la dynamique des microtubules, ainsi que leur implication dans des processus cellulaires fondamentaux et dans des pathologies humaines. Grâce à cette collaboration, nous avons pu bénéficier de l'expertise du Dr Tassin sur le centrosome, et notamment de leur savoir-faire sur

une technique mise au point au sein de leur laboratoire qui permet de purifier des centrosomes à partir de cellules en culture, permettant de réaliser différentes analyses sur centrosomes isolés. Monsieur Logan Greibill, étudiant en thèse sous la direction du Dr Tassin a ainsi pu collaborer avec nous sur ce projet au cours de sa thèse et est à l'origine des résultats obtenus sur centrosomes isolés.

3.2.1. Par microscopie à fluorescence

Des centrosomes ont été isolés à partir de cellules KE37, une lignée cellulaire lymphoblastoïde T humaine. Les centrosomes ainsi obtenus ont été déposé sur des lamelles de microscopie, fixés, puis immunomarqués contre la protéine TDP-43 et la ɣ-tubuline, une protéine centrosomale qui permet de marquer les centrosomes isolés. Les résultats en immunofluorescence nous ont permis d'observer une colocalisation de la protéine TDP-43 avec la ɣ-tubuline, ce qui nous a permis de détecter la présence de la protéine TDP-43 au sein de centrosomes isolés, et ce avec les différentes références d'anticorps anti-TDP-43 utilisés jusqu'à présent (Figure 16). La protéine TDP-43 semble donc être présente physiologiquement au sein du centrosome.

3.2.2. Par approche biochimique

Une fois la présence de TDP-43 détectée par imagerie au sein des centrosomes isolés, nous avons voulu combiner ces résultats à une approche biochimique. Ainsi, nous avons réalisé des Westerns Blots à partir des centrosomes purifiés. Les fractions insoluble (I), soluble (S) et centrosomes purifiés (CTR) sont représentée. Les Western blots ont révélés une bande de 43 kDa à l'aide de 3 anticorps anti-TDP-43 différents (10782-2-AP ; 12892-1-AP et 60019-2-Ig) au sein des fractions CTR, traduisant la présente de la protéine TDP-43 dans les centrosomes purifiés (Figure 17). Comme la protéine TDP-43 se trouve principalement dans le noyau, la contamination nucléaire dans les purifications de centrosomes a été évaluée en immunomarquant la Lamine B1, une protéine nucléaire. La protéine TDP-43 étant plus enrichie dans les fractions centrosomales que la Lamine B1, ceci qui indique que la contamination nucléaire est mineure et confirme bien la présence de TDP-43 au niveau du centrosome.

Les résultats de cette première partie nous ont permis de confirmer la présence de la protéine TDP-43 en condition physiologique dans différentes lignées cellulaire, en combinant plusieurs techniques. La combinaison de ces différentes approches nous a permis de démontrer une nouvelle localisation physiologique de la protéine TDP-43. Nous avons dédié la suite de ce projet à l'exploration de cette nouvelle localisation physiologique.

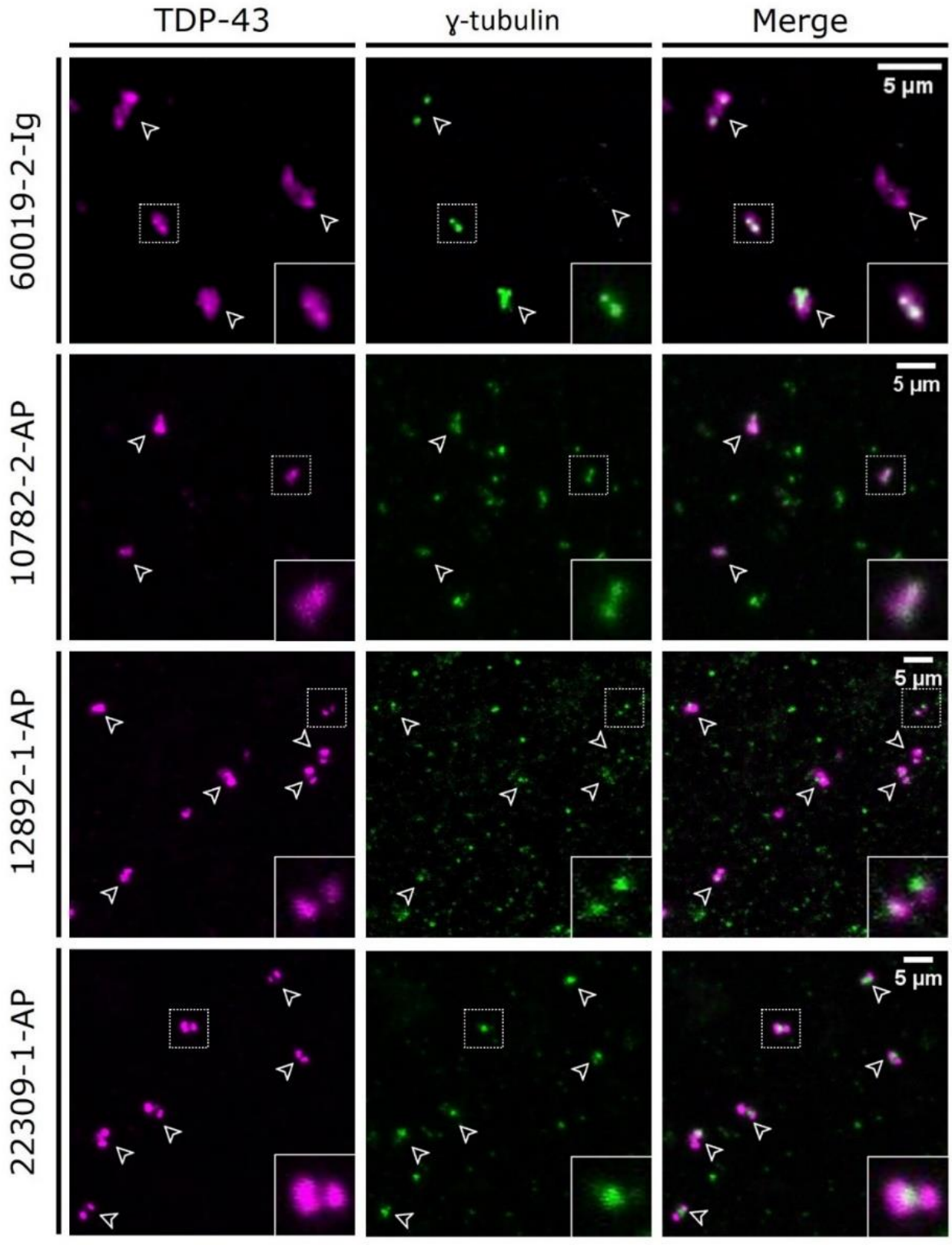


Figure 16 Présence de TDP-43 dans les centrosomes purifiés. *Images de microscopie à fluorescence de centrosome purifiés et immunomarqués avec différentes références d'anticorps dirigés contre TDP-43 (magenta) et la γ-tubuline (vert), montrant une colocalisation des deux signaux lorsqu'ils sont superposés.*

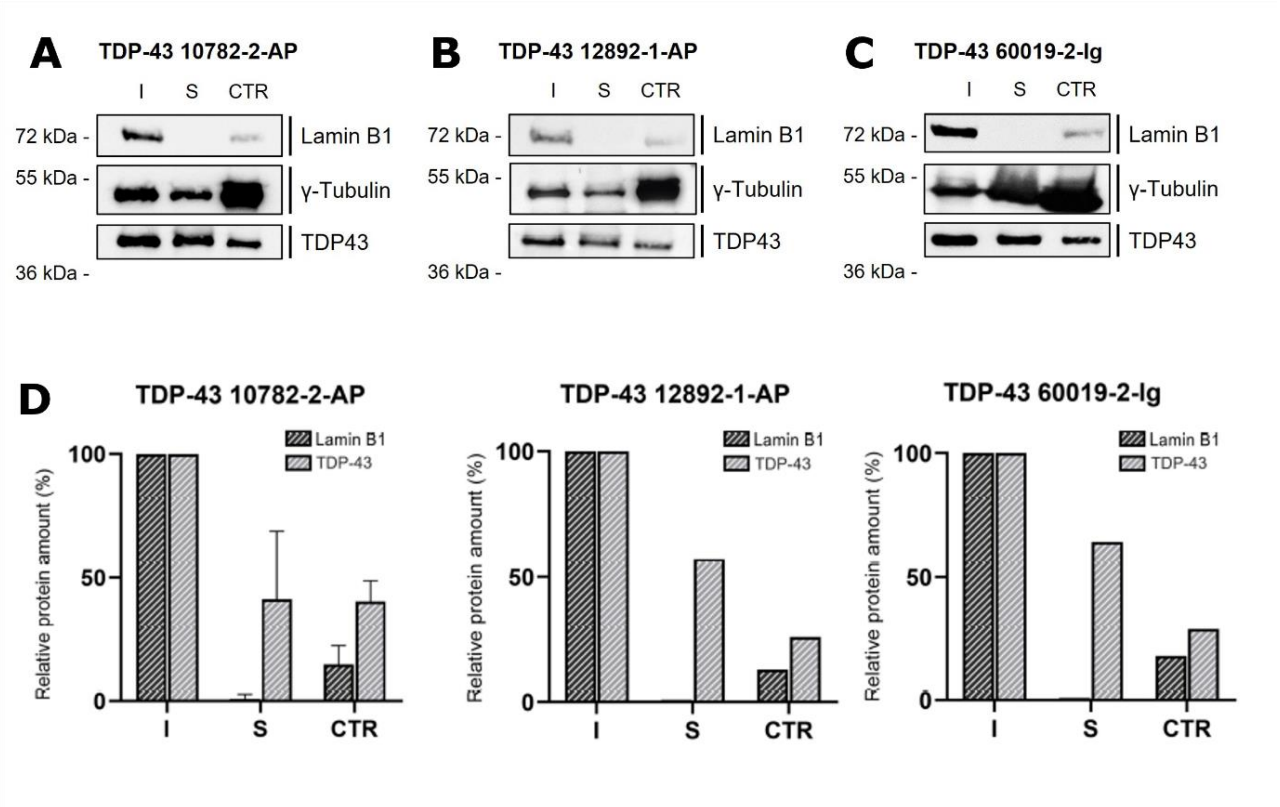


Figure 17 Western blot réalisés sur des cellules T-lymphoblastoïdes humaines KE-37 montrant un enrichissement de la protéine TDP-43 au sein des centrosomes purifiés. *Western blot utilisant des anticorps primaires contre TDP-43 (A) 10782-2-AP, (B) 12892-1-AP, (C) 60019-2-Ig, la γ-tubuline et la lamine B1. I = fraction insoluble ; S = fraction soluble ; CTR = fraction centrosomes purifiés. (D) Quantifications de l'intensité de la luminescence réalisées pour chaque anticorps (10782-2-AP : n=3, 12892-1-AP : n=1, 60019-2-Ig : n=1).*

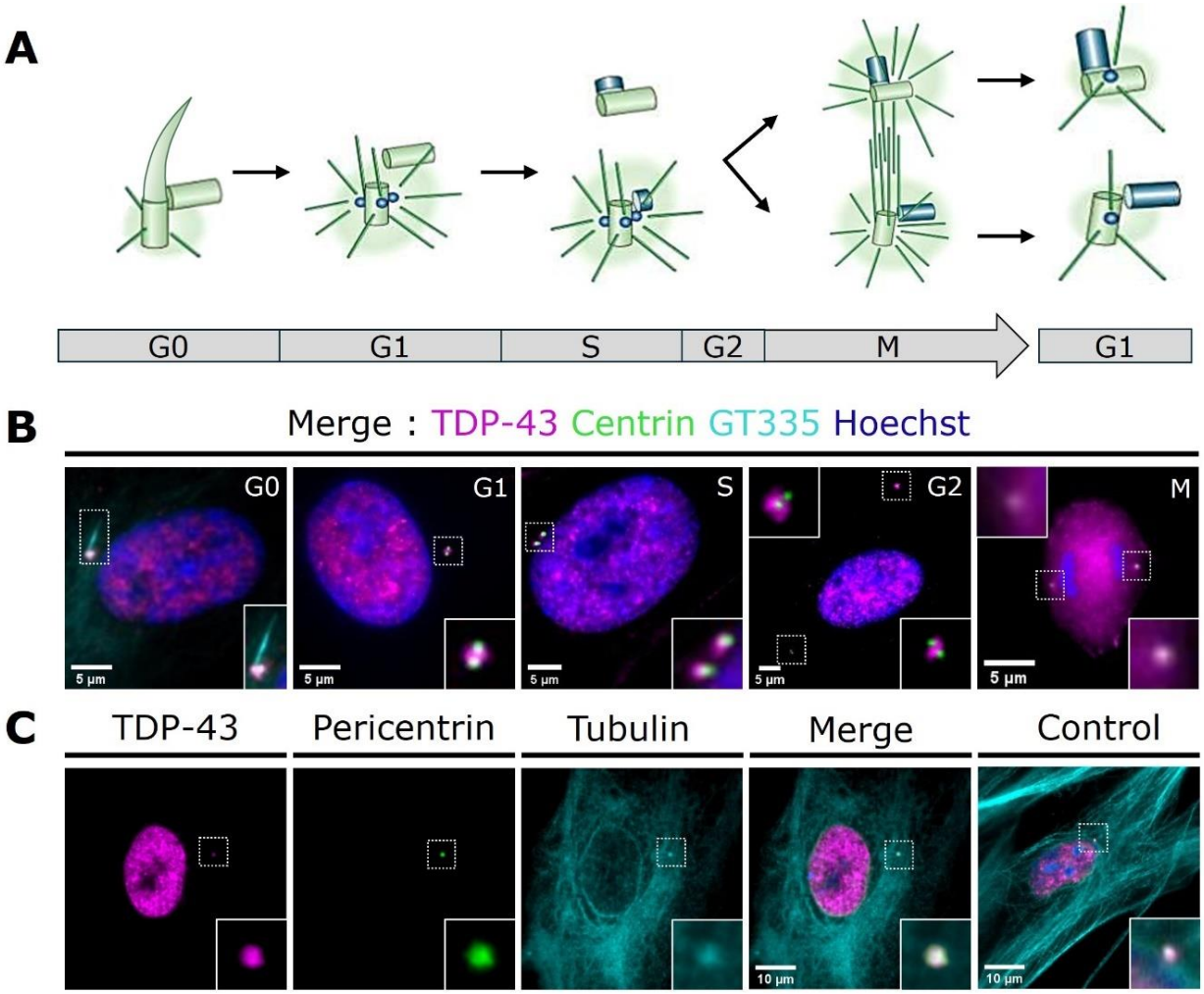


Figure 18 Influence du cycle cellulaire et du réseau de microtubules sur la présence de TDP-43 au sein du centrosome. *(A) Schéma du cycle de réplication du centrosome (adapté de Molecular Biology of the cell, 4th Edition). (B) Images de microscopie à réflexion interne totale (TIRF) sur fibroblastes de peau humaine saine fixés et immunomarqués contre TDP-43 (magenta), péricentrine (vert) et GT335 (cyan), montrant la présence de TDP-43 au centrosome dans toutes les phases du cycle cellulaire, y compris la mitose. (C) Images de microscopie TIRF sur fibroblastes de peau humaine après 2h de traitement au nocodazole (5mg/mL) induisant une dépolymérisation des microtubules comparé à la condition contrôle.*

3.3. Etude des facteurs pouvant influencer la localisation centrosomale de la protéine TDP-43

3.3.1. Le cycle cellulaire

Le centrosome est le principal centre organisateur des microtubules (MTOC), et de ce fait un acteur central du cycle cellulaire (Azimzadeh et Bornens, 2007). Il évolue au cours du cycle cellulaire pour permettre la duplication des centrioles et aboutir à la genèse d'une cellule fille. Pendant la phase de division cellulaire, les centrioles se séparent puis se dupliquent, et migrent aux pôles opposés de la cellule. Ils jouent un rôle essentiel dans la formation du fuseau mitotique, un réseau de microtubules nécessaires à la séparation des chromosomes lors de la mitose. Cette caractéristique du centrosome et de ses centrioles peut être exploitée en microscopie à fluorescence pour déterminer la phase du cycle cellulaire en observant la morphologie des centrosomes (Figure 18A). Nous avons utilisé cette approche pour étudier la colocalisation de TDP-43 au sein du centrosome tout au long des différentes phases du cycle cellulaire. La phase G0 du cycle cellulaire est une phase de quiescence caractérisée par l'expression d'un cil primaire, qui émane du centrosome et agit comme un senseur de l'environnement extracellulaire. Ce cil primaire est perdu au début du cycle cellulaire. Par le biais de co-immunomarquages de la protéine TDP-43, de la centrine (une protéine des centrioles) et du cil primaire (GT335) dans des fibroblastes en microscopie à réflexion interne totale (TIRF), nous avons observé une colocalisation de ces éléments tout au long du cycle cellulaire, y compris pendant la mitose (Figure 18B). Ces résultats suggèrent que la présence de TDP-43 au sein du centrosome est stable tout au long du cycle cellulaire.

3.3.2. Le réseau de microtubules

Le centrosome joue également un rôle central dans l'architecture du cytosquelette. Les microtubules rayonnent à partir du centrosome, fournissant un cadre structural à la cellule tout en participant au transport intracellulaire et à la morphologie cellulaire (Schatten, 2008). De plus, les microtubules servent de plateforme de recrutement pour les protéines et les ARNm au sein du centrosome, facilitant ainsi la traduction locale. Les centrioles du centrosome agissent comme des points d'ancrage pour l'organisation et la croissance directionnelle des microtubules. Par conséquent, le centrosome régule activement la dynamique du cytosquelette en coordonnant la formation, la stabilisation et la polarité des microtubules, contribuant ainsi au maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la cellule.

Dans cette optique, nous avons examiné l'impact d'une désorganisation du réseau de microtubules sur la localisation de TDP-43 au sein du centrosome. Pour ce faire, nous avons traité des fibroblastes pendant 2 heures avec 5 mg/mL de nocodazole, un agent induisant la dépolymérisation des microtubules. Ensuite, nous avons réalisé un co-immunomarquage de la protéine TDP-43, de la péricentrine (marqueur du centrosome) et de l'α-tubuline (marqueur des microtubules). Dans les cellules non traitées avec le nocodazole, un réseau de microtubules bien organisé était observable dans le cytoplasme. En revanche, chez les cellules traitées, les microtubules étaient dépolymérisés, ne présentant plus de structure clairement définie (Figure 18C). Malgré l'absence de réseau de microtubules fonctionnel, la présence de la protéine TDP-43 au sein du centrosome était toujours observée. Ces résultats suggèrent que le recrutement de la protéine TDP-43 au centrosome se produit

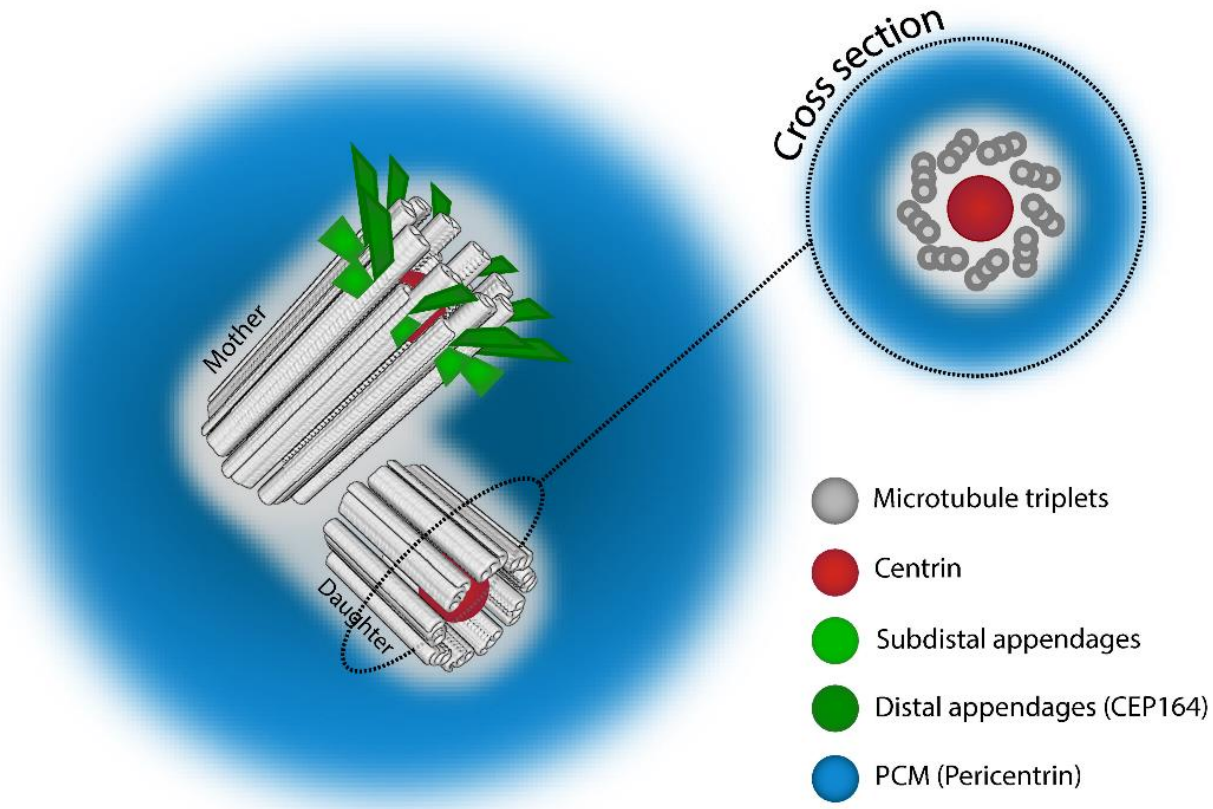


Figure 19 Schéma représentatif de la structure du centrosome. *Le centrosome est un organite sans membrane, il est composé de deux centrioles, eux-mêmes composés de 9 triplets de microtubules, la centrine est une protéine des centrioles et en fait un marqueur spécifique. Le centriole mère comporte une couronne d'appendices distaux à son extrémité, dont une des protéines de ces appendices est la protéine CEP164. Les centrioles sont entourés par une matrice péricentriolaire (PCM = pericentriolar matrix) composée de plus d'une centaine de protéine, dont la péricentrine qui est l'une des plus abondantes.*

de manière indépendante des microtubules, ne nécessitant pas un réseau de microtubules correctement formé et fonctionnel.

3.4. Etude de l'ultra-localisation de la protéine TDP-43 au sein du centrosome

Après avoir identifié, par le biais de différentes approches, une nouvelle localisation de la protéine TDP-43 au sein du centrosome, nous avons cherché à préciser son ultra-localisation à l'intérieur de cet organite. Le centrosome est un organite intracellulaire dépourvu de membrane, constitué de deux centrioles perpendiculaires. Ces centrioles sont composés de neuf triplets de microtubules. La partie distale du centriole mère présente des appendices distaux et subdistaux (Laporte *et al*., 2024 ; LeGuennec *et al*., 2021 ; Bowler *et al*., 2019). L'ensemble des centrioles est enveloppé par une matrice péricentriolaire (PCM) composée de plus d'une centaine de protéines (Figure 19).

3.4.1. Par microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)

Afin d'étudier la position de la protéine TDP-43 par rapport à ces différents éléments, nous avons sélectionné des marqueurs spécifiques de chaque région du centrosome : la péricentrine une protéine de la PCM, la centrine une protéine des centrioles, et CEP164 une protéine des appendices distaux. Nous avons réalisé des co-immunomarquages de la protéine TDP-43 avec ces différentes protéines sur des fibroblastes et observé les profils de colocalisation en microscopie TIRF. De cette façon, nous avons pu observer une absence de colocalisation de la protéine TDP-43 avec CEP164, une colocalisation partielle avec la centrine, et une colocalisation presque totale avec la péricentrine (Figure 20A).

Pour mesurer la colocalisation de ces différents éléments, nous avons utilisé le coefficient de colocalisation de Pearson, qui est une formule mathématique qui permet de calculer la superposition de deux pixels ou voxels. Après avoir déconvolué nos images, puis avoir reconstruit les surfaces en 3D grâce au logiciel Imaris (Figure 20B), nous avons mesuré le coefficient de Pearson, sur 25 acquisitions pour chaque marqueur. Le coefficient de Pearson donne un résultat allant de -1 pour une corrélation négative qui traduit une absence totale de colocalisation ou une localisation inverse, à 1 pour une corrélation positive soit une colocalisation parfaite des deux objets dans l'espace. Pour TDP-43 et CEP164 nous avons obtenu un coefficient de Pearson moyen de -0,125, traduisant bien une absence de colocalisation comme observé sur les images. Pour TDP-43 et la centrine, nous avons obtenu un coefficient de Pearson moyen de +0,424, reflétant la colocalisation partielle que nous pouvons observer par le chevauchement partiel des deux spectres de fluorescences et par la superposition à certains endroits des deux surfaces en 3D. Et pour TDP-43 et la péricentrine, nous avons obtenu un coefficient de Pearson moyen de +0,827, ce qui confirme bien une corrélation positive entre les deux éléments, et donc une colocalisation des deux protéines (ANOVA 1 voie, $p<0.001$) (Figure 20B). Ces résultats suggèrent que la protéine TDP-43 serait localisée au sein de la matrice péricentriolaire plutôt qu'au sein des centrioles et appendices distaux.

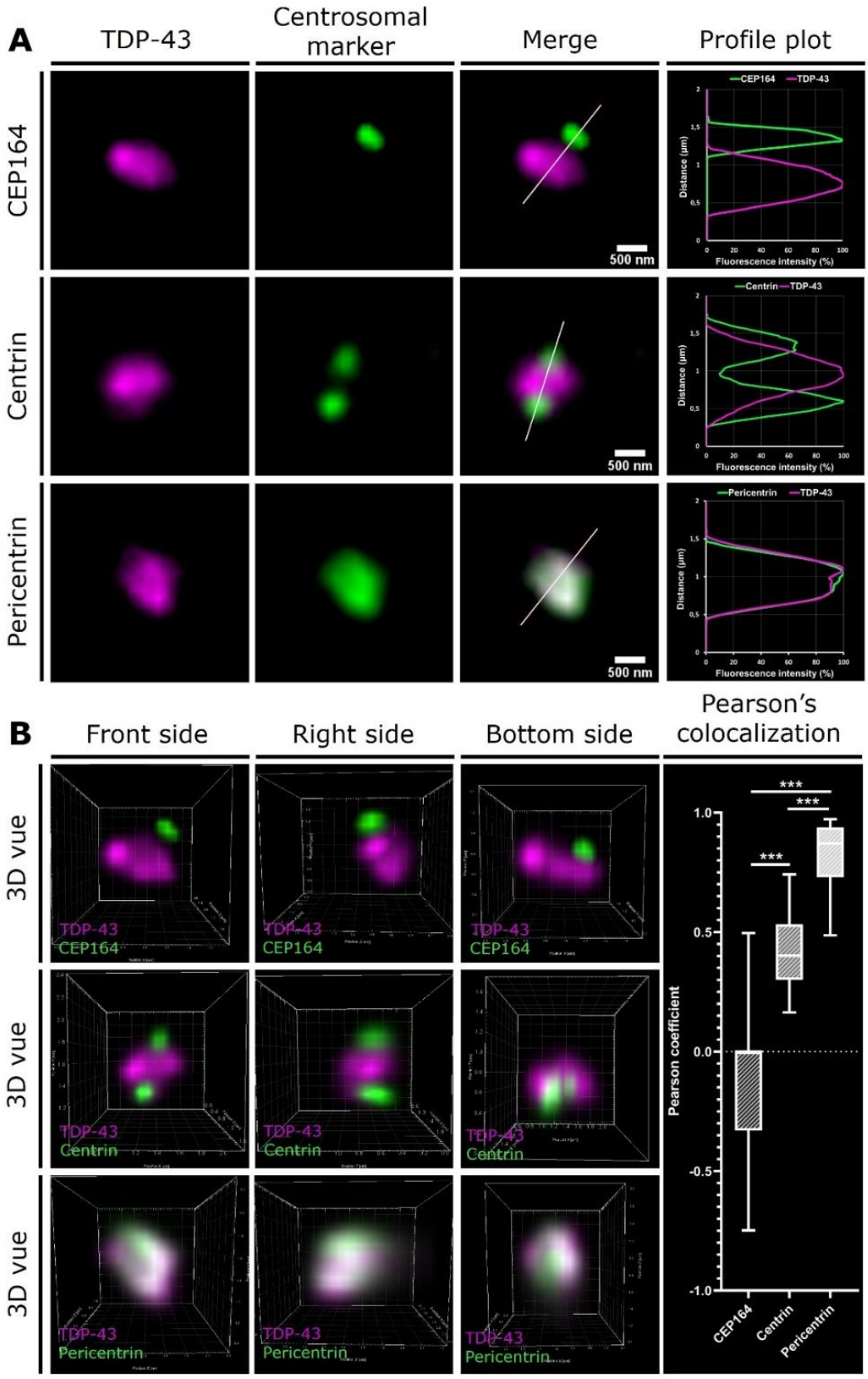


Figure 20 Ultra-localisation de la protéine TDP-43 au sein du centrosome en microscopie TIRF. *(A) Images de microscopie TIRF à fort grossissement du centrosome de fibroblastes de peau humaine saine fixés et immunomarqués contre TDP-43 (magenta), et différents marqueurs du centrosome (vert). Les profils d'intensité de fluorescence de chaque canal sont représentés à droite. (B) Représentation 3D des mêmes acquisitions ainsi que le coefficient de colocalisation de Pearson pour chaque marqueur (p<0,001).*

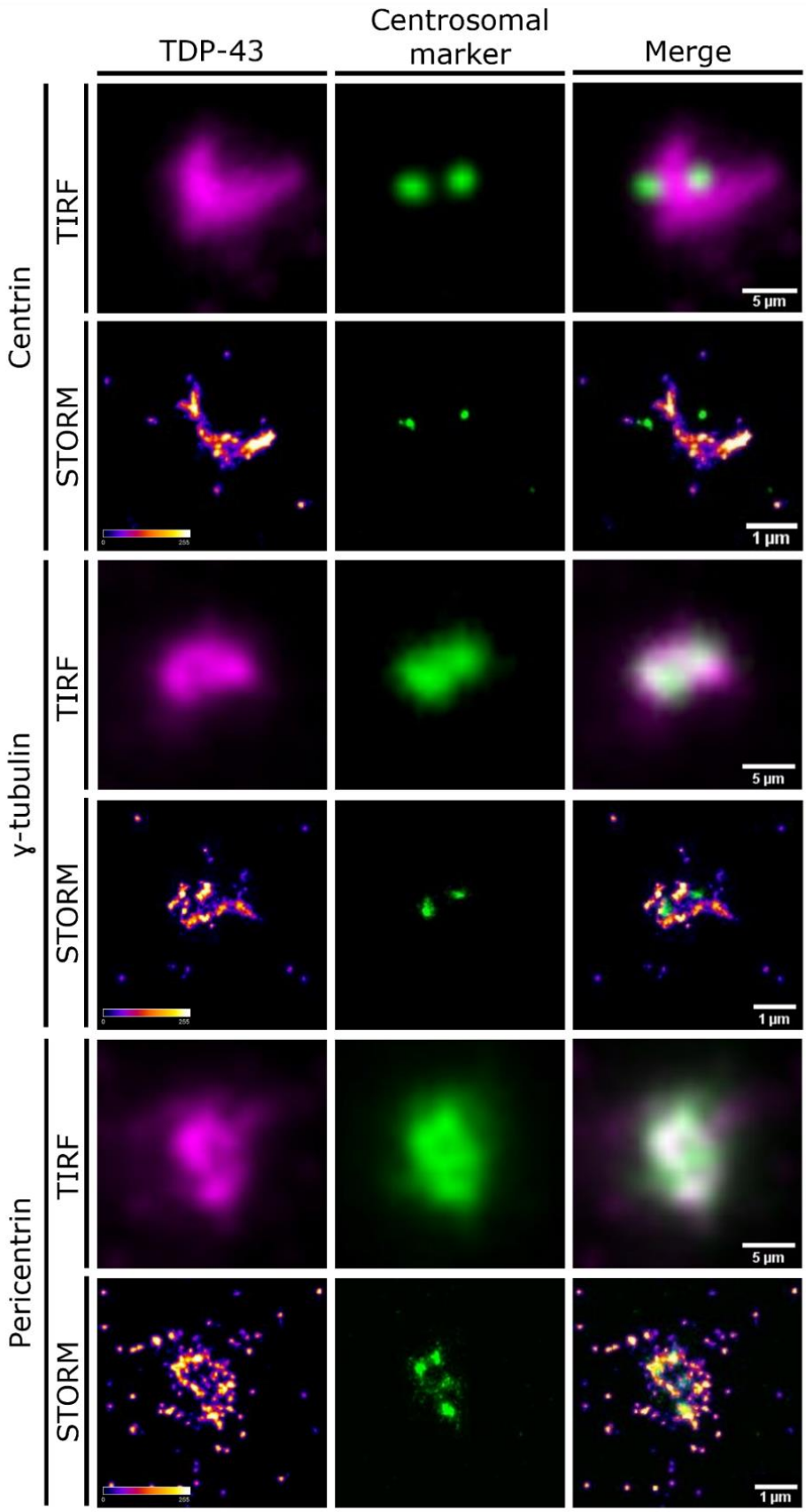


Figure 21 Ultra-localisation de la protéine TDP-43 en microscopie super-résolutive STORM. *Images de microscopie super résolutive STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) de fibroblastes de peau humaine saine fixés et immunomarqués contre TDP-43 (fire/magenta), et différents marqueurs du centrosome (vert) comparées aux mêmes acquisitions en microscopie TIRF.*

Tableau 7 ARNm centrosomaux interagissant avec TDP-43.

mRNA	Protein	Centrosomal localization	TDP-43 interaction
ASPM	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein	Safieddine *et al*., 2021 ; Chouaib *et al*., 2020	Lang *et al*., 2019 ; Van Nostrand *et al*., 2016
NUMA1	Nuclear mitotic apparatus prot1	Safieddine *et al*., 2021 ; Chouaib *et al*., 2020	Lang *et al*., 2019 ; Van Nostrand *et al*., 2016
PCNT	Pericentrin	Safieddine *et al*., 2021	Lang *et al*., 2019 ; Van Nostrand *et al*., 2016
CEP350	Centrosomal Protein 350	Safieddine *et al*., 2021	Lang *et al*., 2019 ; Van Nostrand *et al*., 2016

3.4.2. Par microscopie super-résolutive STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)

Pour confirmer cette ultra-localisation au sein de la PCM, nous avons réalisé des acquisitions en microscopie super résolutive à reconstruction optique stochastique (STORM). Cette technique de microscopie permet de définir la position de molécules uniques et ainsi d'observer la répartition des protéines TDP-43 par rapport aux protéines de péricentrine ou de centrine avec une meilleure résolution. Sur les acquisitions réalisées sur les co-immunomarquages de TDP-43 et de la centrine, nous avons observé les 2 centrioles qui sont représentés par 2 points bien distincts, au milieu et autour desquels se trouvent les protéines de TDP-43 sans colocalisation. Sur les acquisitions réalisées sur les co-immunomarquages de TDP-43 et de la péricentrine, nous avons observé la distribution des molécules de péricentrine au sein de la PCM, ainsi que la répartition des protéines TDP-43 au sein de cette matrice avec la colocalisation avec les molécules de péricentrine (Figure 21). Ces résultats confirment donc un enrichissement de TDP-43 au sein de la PCM du centrosome.

3.5. Analyse *in silico* et hypothèses fonctionnelles

Ces dernières années, plusieurs travaux ont rapportés la présence de RBP et ARNm localisés au centrosome. La présence de TDP-43 (une RBP) au sein de la PCM nous a donc incité à étudier l'interaction potentielle de TDP-43 avec des ARNm et protéines du centrosome.

3.5.1. Etude de l'interaction de TDP-43 avec des ARN localisés au centrosome

Plusieurs travaux ont récemment démontré la présence d'ARNm au sein du centrosome, mettant en lumière un phénomène de traduction locale des ARNm en protéines directement sur leur site de destination finale. Les ARNm ainsi que la machinerie traductionnelle seraient acheminés par un mécanisme de transport actif jusqu'au centrosome. Au total, 11 ARNm ont récemment été identifiés au sein du centrosome (Zein-Sabatto et Lerit, 2021; Saffieddine *et al*., 2021; Chouaib *et al*., 2020). Sachant que TDP-43 est une RNA-Binding Protein, nous avons cherché à savoir si elle pouvait interagir avec certains de ces ARNm. Pour cela nous avons utilisé le logiciel RNAct qui est conçu pour l'analyse des interactions entre les ARN et les protéines, et permet de prédire des sites de liaisons potentiels grâce à des algorithmes et s'appuie sur la littérature pour recenser les interactions déjà démontrées. De cette façon, nous avons pu identifier que TDP-43 interagit avec 4 des 11 ARNm centrosomaux récemment identifiés (Tableau 7). Ces interactions ont précédemment été démontrée par cross-linking et immunoprécipitation (Lang *et al*.,2019 ; Van Nostrand *et al*., 2016). Parmi ces ARNm centrosomaux avec lesquels la protéine TDP-43 interagit, est retrouvé celui de la péricentrine, constituant majeur de la matrice péricentriolaire, qui joue notamment un rôle dans la formation du réseau de microtubules (Sepulveda *et al*., 2018).

Le gène *ASPM* (abnormal spindle-like microcephaly-associated) code pour une protéine qui joue un rôle essentiel dans l'organisation et le regroupement des microtubules aux pôles du fuseau et nécessaire à la formation correcte des fuseaux mitotiques lors de la mitose et de la méiose (Zhong *et al.,* 2005). ASPM est un régulateur de l'extrémité négative (minus end) des microtubules, mais se localise aux pôles du fuseau mitotique lors de la mitose. De la même façon que pour la péricentrine, des ARNm codants pour ASPM ont été identifiés au sein du centrosome lors de la mitose, suggérant un recrutement pour une traduction locale des protéines

ASPM pour les localiser au sein du fuseau mitotique lors de la mitose (Sepulveda *et al.,* 2018 ; Zein-Sabatto et Lerit, 2021).

Le gène *NUMA1* code pour une protéine qui constitue un composant structurel de la matrice nucléaire. La protéine NuMa interagit avec les microtubules et joue un rôle dans la formation et l'organisation du fuseau mitotique pendant la division cellulaire (Silk *et al*., 2009). Comme pour ASPM, la distribution de NuMa est dépendante du cycle cellulaire, pendant l'interphase NuMA se situe dans le noyau mais se redistribue rapidement vers les centrosomes en cours de séparation au début de la mitose. En tant que composant centrosomal mitotique, NuMA est essentiel pour l'organisation et la stabilisation des pôles du fuseau pendant la mitose. De plus, les deux ARNm mitotiques (NuMa et ASPM) se localisent au centrosome avec des cinétiques différentes : ASPM se localise pendant toutes les phases mitotiques alors que NUMA1 ne se localise que pendant la prophase et la prometaphase (Saffieddine *et al*., 2021).

Enfin, *CEP350* code pour une protéine centrosomale du même nom qui joue un rôle essentiel dans la croissance des centrioles, dans l'ancrage des microtubules aux centrosomes (Yan *et al*., 2006) et pour l'intégrité du réseau de microtubules (Le Clech, 2008) ainsi que pour la ciliogenèse (Mojarad *et al*., 2017). Les ARNm de CEP350 sont localisés au centrosome pendant l'interphase et au début de la mitose, mais délocalisés aux stades mitotiques ultérieurs (Saffieddine *et al*., 2021).

Ces résultats suggèrent que la protéine TDP-43 pourrait être localisée au sein de la PCM du centrosome grâce à son interaction avec ces différents ARNm et/ou pour permettre leur traduction locale.

3.5.2. Etude de l'interaction de TDP-43 avec des protéines localisées au centrosome

En plus de se lier avec des ARN, TDP-43 a également la capacité d'interagir avec des protéines via son extrémité C-terminale. De ce fait, nous avons cherché à savoir si de la même façon qu'avec les ARNm, elle pouvait interagir avec des protéines du centrosome au vu de sa localisation au sein de la PCM. Pour identifier des partenaires protéiques, nous avons recensé toutes les protéines connues pour interagir avec TDP-43 à partir de la base de données BioGRID, 518 partenaires ont ainsi été listés, parmi lesquels nous en avons identifiés 16 qui ont été rapportés enrichis au centrosome (Tableau 8).

Fait remarquable, 7 de ces 16 protéines sont codées par des gènes dont les variants sont responsables de formes familiales de SLA/DLFT (*ATXN2, CCNF, CHMP2B, DCTN1, PFN1, PPIA* et *VCP*) et trois d'entre elles sont des kinases qui phosphorylent TDP-43 et sont associées à la neurodégénérescence (*CDC7, CSNK1δ* et *TTBK1/2*). Les six autres interactants centrosomaux de TDP-43 (*BRCA1, DDX3X, ELAVL1/HuR, EWSR1, GSK3β* et *HDAC6*) sont également impliqués dans les voies neurodégénératives de la SLA/DLFT. Enfin, nous avons découvert que quatre protéines codées par des gènes responsables de la SLA/DLFT (*ALSIN, CYLD, NEK1* et *TBK1*) sont également enrichies au niveau du centrosome, mais leur interaction directe avec TDP-43 n'a pas encore été rapportée à ce jour.

Tableau 8 Protéines centrosomales qui interagissent avec TDP-43.

Gene	Protein	Centrosomal localization	TDP-43 interaction	Neurodegeneration
ALSIN	Alsin	Millecamps *et al*., 2005	Not reported	Yang *et al*., 2001 ; Hadano *et al*., 2001
ATXN2	Ataxin 2	Gnazzo *et al*., 2016 ; Stubenvoll *et al*., 2016	Elden *et al*., 2010	Elden *et al*., 2010 ; Hart *et al*., 2012
BRCA1	Breast cancer 1, early onset	Hsu and White, 1998	Hill *et al*., 2016	Noristani *et al*., 2015
CCNF	Cyclin F	D'Angiolella *et al*., 2010	Rayner *et al*., 2022	Williams *et al*. 2016
CDC7	Cell division cycle 7-related protein kinase	Müller-Taubenberger *et al*., 2009	Liachko *et al*., 2013	Liachko *et al*., 2013 ; Vaca *et al*., 2021
CHMP2B	Charged Multivesicular Body Protein 2B	Ott *et al*., 2018	Deng *et al*., 2022	Skibinski *et al*., 2005 ; Parkinson *et al*., 2006
CSNK1δ	Casein kinase I isoform delta	Greer *et al*., 2014	Kametani *et al*., 2009	Nonaka *et al*., 2016 ; Alquezar *et al*., 2016
CYLD	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD	Eguether T *et al*., 2014	Not reported	Dobson-Stone C *et al*., 2020
DCTN1	Dynactin 1	Kodani *et al*., 2013 ; Zhapparova *et al*., 2013	Deshimaru *et al*., 2021	Konno *et al*., 2017
DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3, X-linked	Chen *et al*., 2017	Freibaum *et al*., 2010	Cheng *et al*., 2019
ELAVL1	ELAV-like protein 1 / Hu-antigen R (HuR)	Filippova *et al*., 2012	Lu *et al*., 2014	Matsye *et al*., 2017
EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1	Leemann-Zakaryan *et al*., 2009	Chi *et al*., 2018	Couthouis *et al*., 2012
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3β	Yoshino and Ishioka, 2015	Moujalled *et al*., 2013	Choi *et al*., 2020
HDAC6	Histone deacetylase 6	Ran *et al*, 2015	Hebron *et al*., 2013	Fazal *et al*., 2021
NEK1	NIMA-Related Kinase 1	White and Quarmby, 2008	Not reported	Brenner *et al*., 2016
PFN1	Profilin 1	Nejedlá *et al*., 2021	Tanaka *et al*., 2016	Wu *et al*., 2012
PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase A or Cyclophilin A	Bannon *et al*., 2012	Lauranzano *et al*., 2015	Pasetto *et al*., 2021
TBK1	TANK-Binding Kinase 1	Pillai *et al*., 2015	Not reported	Freischmidt *et al*., 2015 ; Cirulli *et al*., 2015
TTBK1/2	Tau-tubulin kinase 1/2	Čajánekand Nigg, 2014	Liachko *et al*., 2014	Taylor *et al*., 2018
VCP	Valosin containing protein	Balestra *et al*., 2013 ; Madeo *et al*., 1998	Freibaum *et al*., 2010	Watts *et al*., 2004

ALS/DLFT causative genes are in bold.

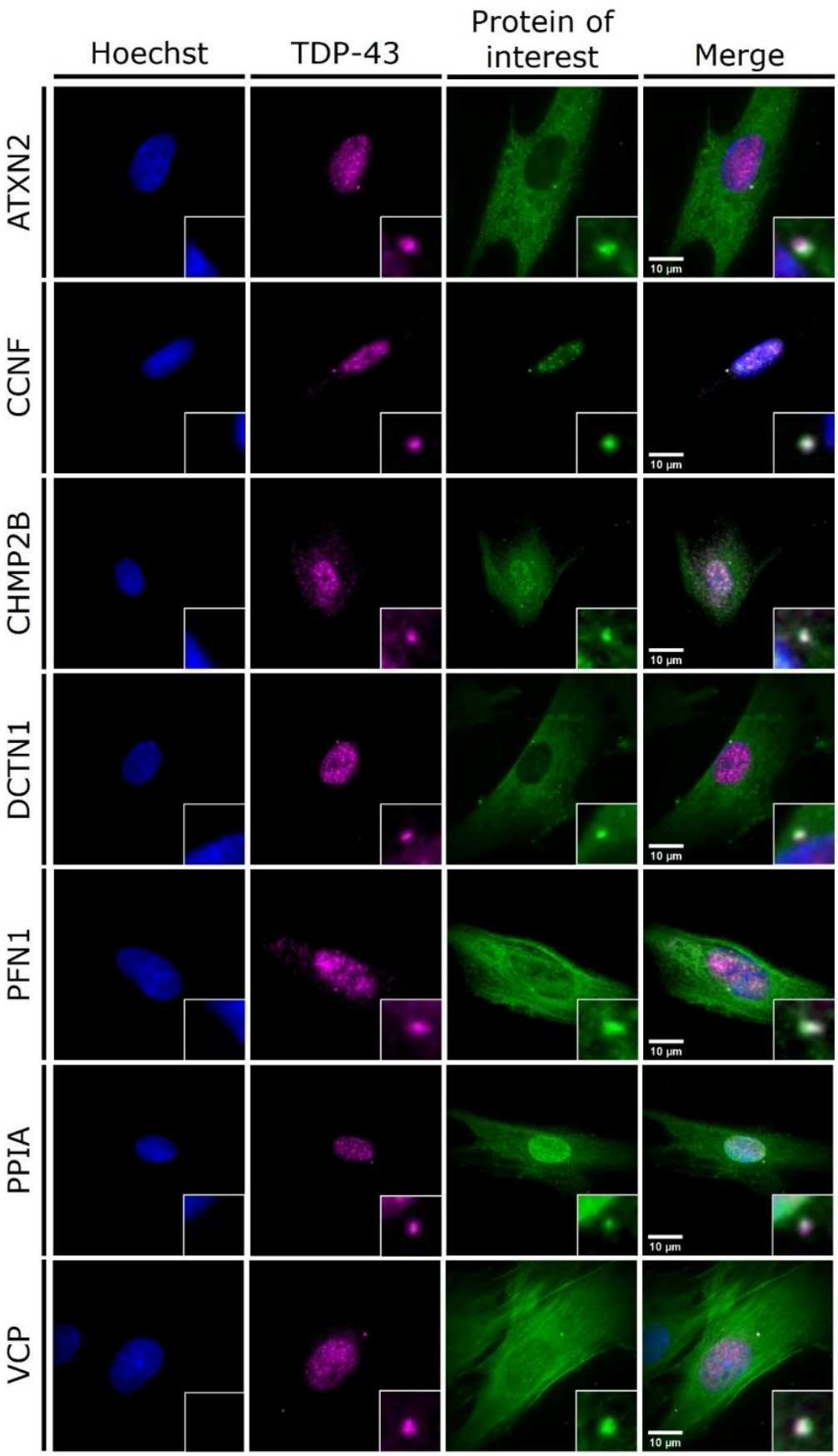


Figure 22 Protéines qui interagissent avec TDP-43 au sein du centrosome. *Images de microscopie TIRF de fibroblastes de peau humaine saine fixés et immunomarqués contre TDP-43 (magenta), et les protéines majeures qui interagissent avec TDP-43 au sein du centrosome (vert).*

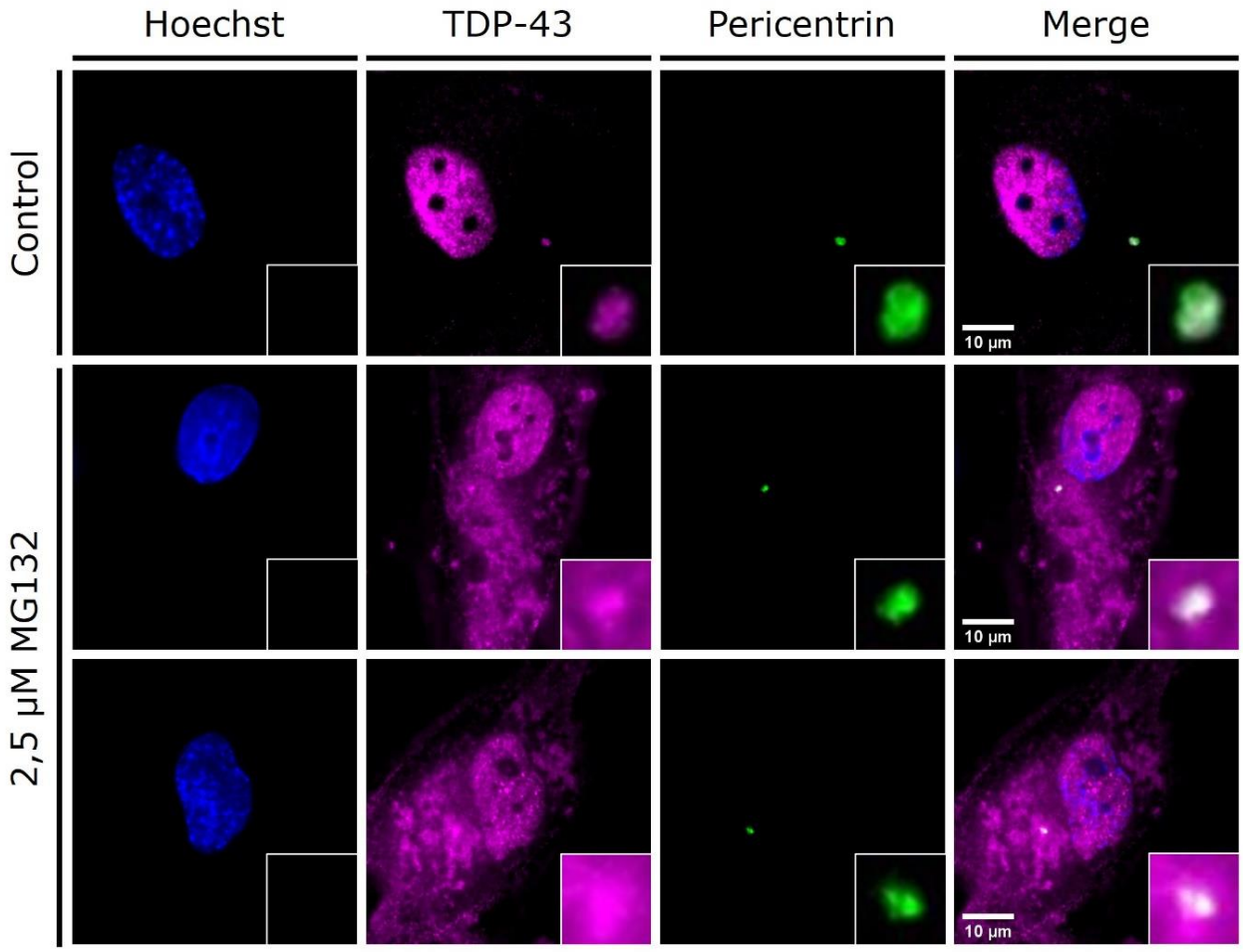


Figure 23 Induction d'agrégats cytoplasmiques de TDP-43. *Images de microscopie TIRF de fibroblastes de peau humaine saine fixés et immunomarqués contre TDP-43 (magenta), et la péricentrine (vert) avant ou après traitement au MG132.*

Pour confirmer ces interactions de TDP-43 avec les sept protéines centrosomales majeures (ATXN2, CCNF, CHMP2B, DCTN1, PFN1, PPIA et VCP), nous avons réalisé des co-immunomarquages de TDP-43 avec chacune de ces protéines, que nous avons observés en microscopie TIRF à fort grossissement sur des fibroblastes. Nous avons ainsi mis en évidence une colocalisation de TDP-43 avec toutes les protéines étudiées au niveau de la PCM avec des schémas de distribution similaires (Figure 22). Dans l'ensemble, ces résultats avancent un rôle fonctionnel de TDP-43 au sein de la PCM par le biais d'une liaison locale aux ARNm et protéines centrosomaux.

3.6. Etude de la localisation de TDP-43 par microscopie à fluorescence en condition pathologique

Après avoir identifié une nouvelle localisation physiologique de la protéine TDP-43 au sein du centrosome, nous nous sommes questionnés sur sa potentielle implication en condition pathologique. Nous avons donc cherché à étudier celle localisation dans les modèles cellulaires pathologiques de la SLA, et sur coupe histologique de patients atteints de la SLA.

3.6.1. Sur modèle cellulaire d'agrégats pathologiques de TDP-43

Un certain nombre de modèles cellulaires ont été présentés dans la littérature scientifique afin de reproduire les agrégats pathologiques retrouvés au sein des motoneurones des patients atteints de SLA. Certaines études ont démontré qu'une exposition avec du liquide cérébrospinal (LCS) issu de patients atteint de SLA induisait une dégénérescence de motoneurones en culture (Vijayalakshmia *et al*., 2009 ; Sumitha *et al*., 2018). Il a été démontré qu'un traitement à l'acide éthacrynique entraine une déplétion du glutathion qui est à l'origine d'un stress oxydatif, induisant la phosphorylation l'insolubilisation, la fragmentation et la distribution cytoplasmique de la protéine TDP-43 dans les cellules NSC-34 (Iguchi *et al*., 2012). Un stress chronique par exposition à l'arsénite de sodium induit la formation de granules de stress et d'agrégats pathologiques de TDP-43 dans des fibroblastes de peau issus de patients atteints de SLA et des iPSC différenciés en motoneurones (Ratti *et al*., 2020). Aussi, parmi les mécanismes associés à la SLA, le dysfonctionnement mitochondrial (traitement à la roténone, inhibiteur du complexe I de la chaine respiratoire), le défaut d'élimination des protéines mal conformées (traitement au MG132, inhibiteur du protéasome), la formation d'agrégats cytoplasmiques (surexpression de TDP-43), le dysfonctionnement du transport (traitement au nocodazole qui induit la dépolymérisation des microtubules) sont autant de facteurs qui peuvent être utilisés comme modèles cellulaires pour étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA. Nous avons tenté d'utiliser ces différentes approches afin de générer des agrégats sur différentes lignées cellulaires (hSF, SH-SY5Y, HeLa, HEK 293, U87) dans le but d'étudier la fraction centrosomale de TDP-43 en condition pathologique. Parmi toutes les conditions testées, la seule nous ayant permis de reproduire des agrégats cytoplasmiques de TDP-43 était le traitement au MG132. Le MG132 est un inhibiteur du protéasome, une voie de dégradation des protéines. Nous avons pu observer que les agrégats cytoplasmiques de TDP-43 ainsi formés étaient systématiquement centrés par le centrosome (Figure 23). Ceci peut s'expliquer par le fait que le centrosome et le protéasome sont étroitement liés puisqu'il a été démontré que le centrosome jouait un rôle dans la dégradation des protéines médiée par le protéasome (Wigley *et al*., 1999). Ces résultats nous ont permis de conclure que la protéine TDP-43 semble toujours associée au centrosome en condition pathologique dans un

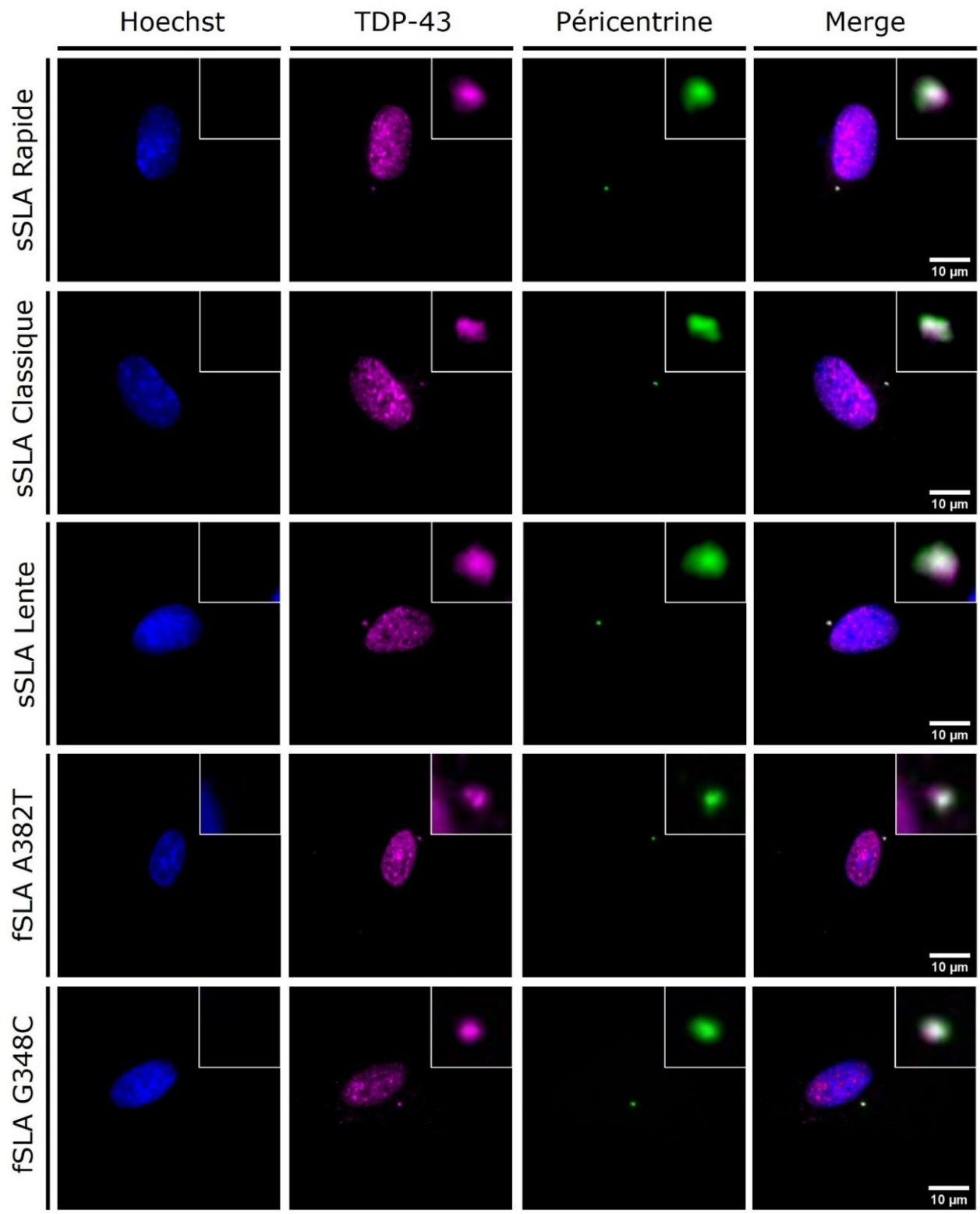


Figure 24 Présence de TDP-43 au sein du centrosome dans des fibroblastes de peau issus de patients atteints de SLA. *Images de microscopie TIRF de fibroblastes de peau humaine fixés et immunomarqués contre TDP-43 (magenta), et la péricentrine (vert). Abréviations : sSLA = SLA sporadique ; fSLA = SLA familiale.*

modèle d'agrégats cytoplasmiques lié à un déficit de la voie du protéasome. Toutefois il reste difficile de conclure quant au rôle de la fraction centrosomale de TDP-43 dans la SLA en l'absence d'autres modèles pathologiques *in vitro*.

3.6.2. Sur fibroblastes de patients atteints de SLA

Nous avons ensuite entrepris d'étudier cette localisation de la protéine sur des fibroblastes de peau issus de patients atteints de la SLA afin de se rapprocher de la pathologie. Nous avons donc étudié cette localisation chez 3 patients atteints de la forme sporadique de la maladie sSLA (1 forme rapide, 1 forme classique, et 1 forme lente), et chez 2 patients atteints de la forme familiale de la SLA portant une mutation sur le gène TARDP en position A382T pour l'un et G348C pour l'autre (données cliniques Tableau 2). Chez tous les fibroblastes de patients observés, nous avons retrouvé la présence de TDP-43 au sein du centrosome (Figure 24). Pour les fibroblastes issus de patients atteints de fSLA, s'agissant de mutations hétérozygotes, il est probable que la protéine TDP-43 que nous observons au sein du centrosome soit la forme native produite par l'allèle non muté, et non la forme pathologique produite par l'allèle portant la mutation, cependant nous n'avons pas d'anticorps permettant de différencier ces différentes formes. Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que la forme mutée ne soit pas présente au sein du centrosome contrairement à sa localisation physiologique, ou qu'elle y soit mais présente mais que celle-ci entraine des dysfonctions centrosomales qui pourraient jouer un rôle dans le développement de la pathologie. Ces résultats suggèrent une implication probable de TDP-43 en pathologie via son interaction avec le centrosome. Par ailleurs, les fibroblastes restant un modèle d'étude assez éloigné de la pathologie même s'ils ont une origine embryologique commune avec les neurones, nous ne pouvons pas exclure que ces résultats ne reproduisent pas ce qui se passe au niveau neuronal chez les patients.

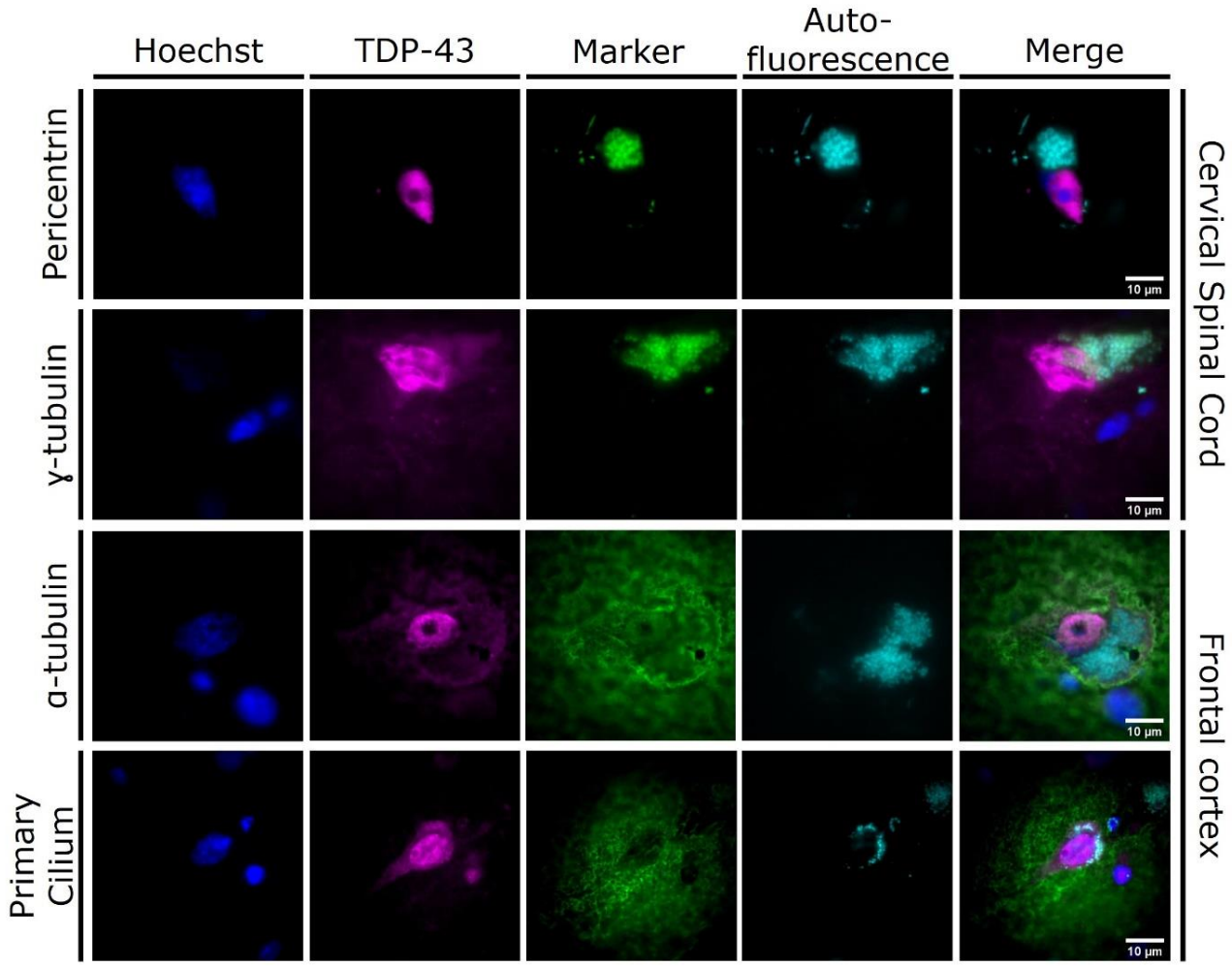


Figure 25 Tentatives d'imagerie du centrosome de neurones de cortex frontal ou de motoneurones de la moelle épinière de patients atteint de SLA. Images de microscopie TIRF de coupes de cortex frontal ou de corne antérieure de moelle épinière cervicale de patients atteints de SLA, immunomarqués contre TDP-43 (magenta), et différents marqueurs pour essayer d'identifier le centrosome (vert), la lipofuscine est visible en cyan dans le canal autofluorescence.

3.6.3. Sur coupes histologiques de SNC de patients atteints de SLA

Nous avons enfin tenté d'étudier cette localisation au sein de neurones de patients atteints de la SLA sur coupes histologiques de SNC. Dans un premier temps nous avons réalisé des co-immunomarquage de TDP-43 avec différents marqueurs du centrosome (péricentrine et ɣ-tubuline) sur des coupes de cortex frontal et de corne antérieure de moelle épinière cervicale d'un patient atteint de SLA afin d'observer des neurones et motoneurones en microscopie à fluorescence (données cliniques Tableau 4). La première difficulté à laquelle nous avons été confrontés est la perte neuronale induite par la SLA chez les patients, réduisant le nombre de neurones sur les coupes histologiques étudiées. La deuxième difficulté a été la présence de lipofuscine, dans les neurones restants. La lipofuscine est un pigment autofluorescent qui s'accumule dans les neurones au cours du vieillissement dans les cellules qui n'ont pas la capacité à se régénérer et qui gêne par conséquent l'imagerie en fluorescence sur ces tissus. Pour ces différentes raisons, nous n'avons pas réussi à identifier de centrosome grâce à la péricentrine ou la ɣ-tubuline dans les neurones que nous avons réussi à imager (Figure 25). Cependant, la présence et le rôle du centrosome au sein des neurones matures est un sujet controversé, il est connu que le centrosome joue un rôle crucial dans l'organisation des microtubules au cours du développement neuronal précoce, mais leur fonction dans les neurones matures est moins claire. La position du centrosome est précisément régulée pendant la neurogenèse, la migration et la différenciation, influençant le développement neuronal, mais son rôle diminue aux stades ultérieurs de la maturation neuronale (Higginbotham et Gleeson 2007 ; Kuijpers et Hoogenraad 2011).

Le centrosome étant le principal centre organisateur des microtubules (MTOC), et le cytosquelette étant un élément clé pour les neurones, nous avons ensuite tenté de repérer le centrosome en identifiant le MTOC des neurones. Nous avons alors réalisé un co-immunomarquage de TDP-43 et de l'α-tubuline, une sous-unité des microtubules, sur ces mêmes coupes de cortex frontal et de corne antérieure de la moelle épinière. Cependant nous n'avons pas réussi à imager le cytosquelette des neurones et ainsi retracer le MTOC où prennent leur origine les microtubules (Figure 25). De plus, certaines études suggèrent que dans les neurones matures le centrosome perd son activité d'organisation des microtubules qui est alors médiée par une nucléation non centrosomale impliquant les complexes augmin et γTuRC (Sanchez Huertas *et al*., 2016).

Pour ces différentes raisons l'imagerie du centrosome dans les neurones peut s'avérer fastidieuse. En revanche, les neurones matures expriment systématiquement un cil primaire qui prend son origine sur le centriole mère du centrosome, et qui est essentiel pour diverses fonctions cérébrales, notamment l'intégration synaptique et la neuroplasticité (Álvarez-Satta *et al*., 2019). De ce fait, nous avons tenté d'immunomarquer le cil primaire plutôt que le centrosome. Sur toutes les acquisitions qui ont été réalisées, nous n'avons pas réussi à identifier le cil primaire, ni le centrosome dans des neurones (Figure 25). Nous avons pu observer une répartition nucléaire de la protéine dans des neurones sains, sans pouvoir distinguer une quelconque localisation cytoplasmique par ailleurs. Nous n'avons pas réussi à observer le centrosome, ni le cil primaire, ni le centre organisateur des microtubules sur un neurone mature, ne permettant pas d'étudier la présence de TDP-43 au sein de ce dernier puisqu'il n'est visible qu'à très fort grossissement sur cet organite s'il est présent.

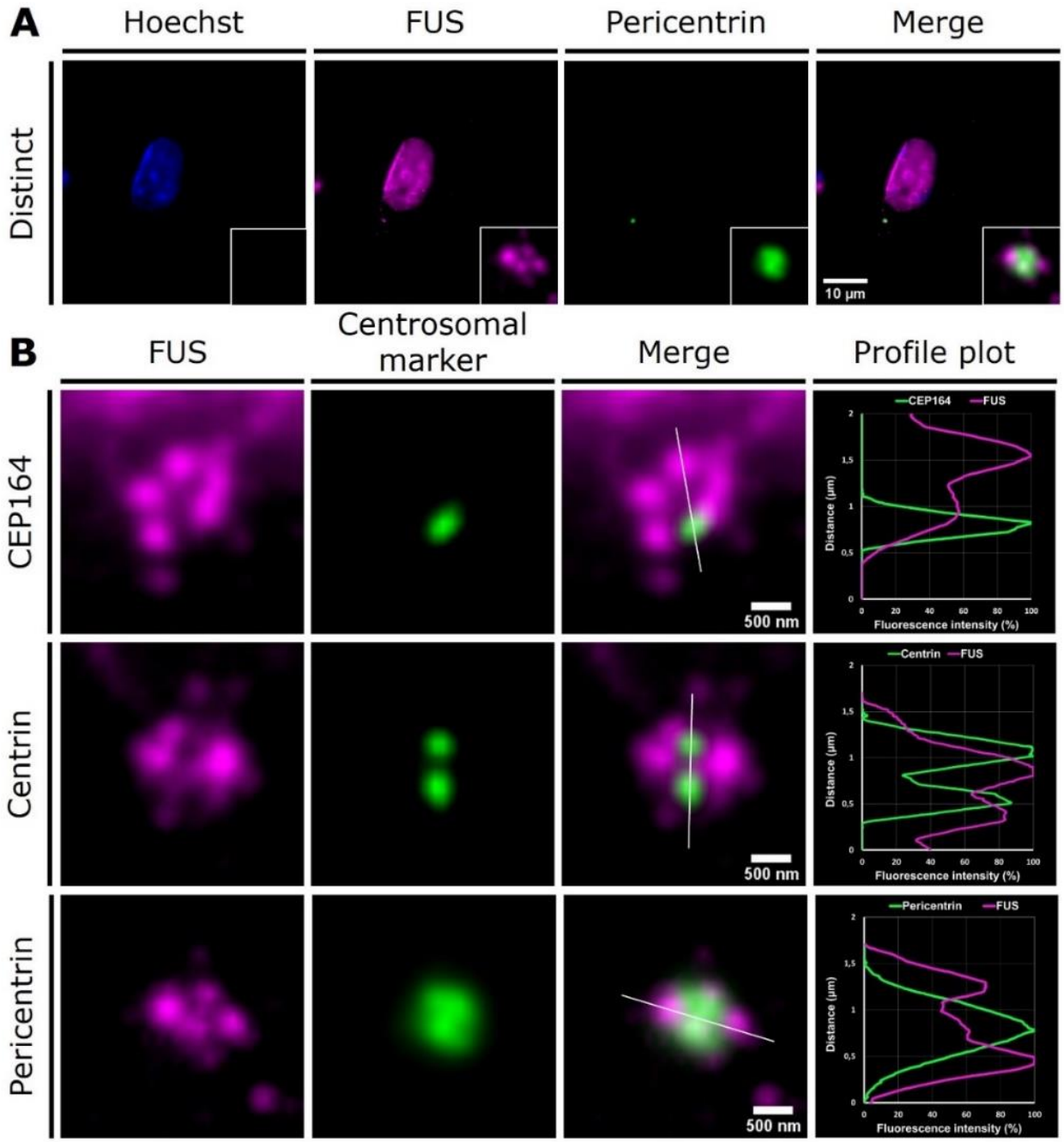


Figure 26 La protéine FUS semble également enrichie au centrosome. *(A) Images de microscopie TIRF (Total Internal Reflection) sur des fibroblastes de peau humains fixés et immunomarqués contre FUS (mangenta) et la péricentrine (vert) montrant la colocalisation des deux signaux au sein du centrosome. (B) Images de microscopie TIRF à fort grossissement du centrosome de fibroblastes de peau humaine saine fixés et immunomarqués contre FUS (magenta), et différents marqueurs du centrosome (vert). Les profils d'intensité de fluorescence de chaque canal sont représentés à droite.*

3.6.4. Autre protéine impliquée dans la SLA : FUS

La protéine TDP-43 est la protéine majeure impliquée dans la SLA, mais pas la seule, d'autres protéines sont en cause. La protéine FUS lui est assez similaire et est également impliquée dans certaines formes familiales de la pathologie. Tout comme TDP-43, FUS est une protéine de liaison à l'ADN, c'est une protéine ubiquitaire nucléaire, qui joue un rôle essentiel dans divers processus cellulaires tels que la régulation de la transcription, l'épissage de l'ARN, le transport de l'ARN, la réparation de l'ADN et la réponse aux dommages. De la même façon que pour TDP-43, chez les patients atteints de SLA génétique liée aux mutations du gène FUS (environ 1% des formes familiales de SLA), la protéine FUS est retrouvée agrégée dans le cytoplasme des motoneurones. La proximité structurelle et fonctionnelle de la protéine FUS avec la protéine TDP-43 nous a amenés à étudier si la protéine FUS pouvait également être associée au centrosome. Par une approche en imagerie TIRF similaire à celle entreprise précédemment, nous avons pu observer la présence de FUS au sein du centrosome dans des fibroblastes de peau humaine (Figure 26A). En revanche, la forme du corpuscule était différente de celle observée avec TDP-43. Pour TDP-43 nous avons observé une sphère uniforme, alors que pour FUS nous observions systématiquement plusieurs spots de fluorescence rapprochés et de taille différentes. Nous avons voulu préciser la localisation de FUS au sein du centrosome à l'aide de co-marquages avec les différentes régions du centrosome en microscopie TIRF (Figure 26B). De cette façon nous avons démontré que comme TDP-43, la protéine FUS n'est pas localisée au sein des appendices distaux puisqu'elle ne co-localisait pas avec CEP164. Les profils de fluorescence se chevauchaient partiellement entre FUS et la centrine mais nous avons observé sur les images qu'une majeure partie des protéines FUS se trouvaient de part et d'autre des deux centrioles. Enfin, là où TDP-43 co-localisait presque parfaitement avec la péricentrine, la protéine FUS elle ne s'y localisait que partiellement. Ces résultats démontrent que la protéine FUS, également impliquée dans la SLA serait localisée au centrosome en condition physiologique, mais que sa répartition au sein de ce dernier était différente de celle de TDP-43 au sein de la PCM, ce qui suggère que ces deux protéines on probablement des partenaires centrosomaux différents et y jouent probablement des rôles distincts. Une approche complémentaire utilisant des anticorps complémentaires dans différentes conditions, et des approches sur centrosomes isolés est nécessaire pour mieux définir le profil de localisation centrosomale de la protéine.

4. Discussion

A travers nos différents résultats, nous avons découvert une nouvelle localisation physiologique de la protéine TDP-43 au sein du centrosome. Cette localisation centrosomale de TDP-43 est passée inaperçue jusqu'à présent car elle n'est détectée que dans des conditions d'acquisitions particulières et par des techniques d'imageries dédiées et hautement résolutives. En effet, l'enrichissement de TDP-43 au centrosome n'est observable que lorsque le centrosome et le noyau ne se superposent pas, avec une fixation au méthanol plutôt qu'avec une fixation au PFA, et uniquement avec des techniques de microscopies haute- ou super-résolutives telles que le TIRF ou le STORM. Les principaux fixateurs utilisés en microscopie sont à base d'alcool (comme le méthanol) ou à base d'aldéhyde (comme le PFA). Les fixateurs à base d'alcool vont déshydrater l'échantillon en remplaçant l'eau dans le tissu, brisant les liaisons hydrophobes, et entrainant la dénaturation et précipitation des protéines. Ils ont l'avantage de mieux préserver l'antigénicité mais peuvent légèrement déformer des détails nucléaires et cytoplasmiques. Les fixateurs à base d'aldéhyde forment des liaisons covalentes entre les protéines, conservant ainsi leur structure native. Ils ont l'avantage de mieux préserver la morphologie cellulaire, mais peuvent masquer certains épitopes. Ainsi, avec une fixation au PFA, certains épitopes de TDP-43 peuvent être masqués et donc non reconnus par les anticorps, ce qui pourrait expliquer la différence de pourcentage de colocalisation observée en fonction du type de fixation utilisée.

Nous avons démontré que la protéine TDP-43 est associée au centrosome avec 6 anticorps anti-TDP-43 dans 7 types cellulaires différents et dans des IPSC différenciées en cellules neurales ce qui laisse penser que cette localisation centrosomale est physiologique et ubiquitaire. Des transfections de plasmide TDP-43 couplée à la GFP n'ont pas permis d'observer la présence de la protéine TDP-43 exogène au sein du centrosome mais la forme endogène y était bien présente. Cependant le plasmide utilisé avait une construction avec un couplage de la GFP en région C-terminale de la protéine, étant donné l'importance de cette région pour l'interaction de TDP-43 avec d'autres protéines, il peut être envisagé que l'ajout de la GFP empêche la protéine d'interagir avec ses partenaires protéiques centrosomaux et donc de se localiser au centrosome. L'utilisation d'un plasmide codant pour la protéine TDP-43 couplée à la GFP par son extrémité N-terminale aurait été préférable. Il est également possible que l'adressage soit majoritairement nucléaire et/ou que le signal fluorescence de la GFP au niveau de la fraction centrosomale soit trop faible en émission spontané pour être détecté. Une amplification par utilisation d'anticorps anti-GFP pourrait permettre de détecter cette expression. Sur centrosome isolé nous avons confirmé la présence de TDP-43 au sein de cet organite en microscopie à fluorescence et en western blot, et ce à l'aide de plusieurs anticorps anti-TDP-43. Tous ces résultats nous permis de confirmer l'identification de cette nouvelle localisation physiologique de la protéine TDP-43.

Grâce à l'étude approfondie de cette nouvelle localisation nous avons pu démontrer qu'elle est stable au cours du cycle cellulaire, et qu'elle y est localisée par un mécanisme indépendant des microtubules. Plus précisément, nos résultats en microscopie super-résolutive TIRF et STORM montrent que TDP-43 est localisée dans la matrice péricentriolaire, où il elle interagit avec des ARNm et des protéines spécifiques du centrosome. Cette nouvelle localisation centrosomale de la protéine soulève des questions sur les fonctions de TDP-43 dans cet organite. Le centrosome est le principal centre d'organisation des microtubules dans les cellules humaines, contrôlant la forme, la polarité, le trafic, la motilité, la ciliogenèse et le cycle cellulaire. On peut supposer que la

fraction centrosomale de TDP-43 soit impliquée dans ces processus. Par extension, la létalité embryonnaire et les troubles du développement neurologique provoqués par la perte d'expression de TARDBP dans des modèles animaux (Kraemer *et al*., 2010 ; Sephton *et al*., 2009 ; Wu *et al*., 2010 ; Iguchi *et al*., 2013) pourraient être en partie dus à un dysfonctionnement du centrosome, étant donné le rôle central de cet organite dans l'embryogenèse, la prolifération et la migration cellulaire.

Bien que le rôle précis de TDP-43 au niveau de la PCM reste à définir, la protéine pourrait être impliquée dans le transport et la traduction des ARN et interagir avec d'autres protéines de la PCM, à l'instar d'autres RBP centrosomales (Zein-Sabatto et Lerit, 2021). A l'appui de cette hypothèse, nous avons constaté que 4 des 11 ARN récemment détectés au niveau du centrosome avaient déjà été identifiés comme des cibles de TDP-43, et que 16 interactants de TDP-43 sont également des protéines centrosomales. De manière plus frappante, ces 16 protéines sont toutes impliquées dans la physiopathologie des protéinopathies liées à TDP-43, dont sept sont codées par des gènes responsables de SLA/DLFT familiale, ce qui suggère que la perturbation locale participe à la neurodégénérescence dans ces maladies. Enfin, nous avons montré que la protéine TDP-43 était toujours associée au centrosome dans des fibroblastes de 5 patients atteints de SLA (3 formes sporadiques et 2 formes familiales). Les patients fSLA portaient les mutations hétérozygotes G348C et A382T sur le gène *TARDBP*. Comme ce signal pourrait provenir de la présence de la forme sauvage de TDP-43 codée par l'allèle non mutée, ce résultat ne permet pas de préjuger si la forme mutée de TDP-43 n'est plus associée au centrosome avec une possible perte de fonction locale, ou si elle est toujours localisée au sein de l'organite avec à la fois un gain et/ou une perte de fonction liés à la mutation.

De plus, nos résultats sur modèles *in vitro* pathologique démontrent que les agrégats cytoplasmiques de TDP-43 sont toujours centrés par le centrosome, ce qui renforce la suspicion d'un rôle du centrosome en condition pathologique. Cependant, les agrégats induits par ce modèle sont la conséquence d'un défaut d'élimination par le protéasome qui ne dégrade plus les protéines mal conformées, qui s'agrègent donc dans le cytoplasme autour du centrosome. S'il amène des premiers résultats intéressants, ce modèle reste imparfait (voies pathologiques probablement non représentatives de la pathologie dans sa globalité, fraction nucléaire toujours présente) et assez peu pertinent comme modèle d'étude *in vitro* de la SLA. Aussi, nous n'avons pas pu étudier l'association de TDP-43 au sein du centrosome dans des neurones de patients atteints de SLA car pour des raisons techniques nous n'avons pas réussi à identifier le centrosome quelle que soit l'approche utilisée.

Dans l'ensemble, nos résultats démontrent que la protéine TDP-43 joue un rôle au niveau du centrosome par le biais d'une liaison à l'ARN et d'interactions protéiques, et que le dysfonctionnement du centrosome pourrait participer à la neurodégénérescence liée à la protéine TDP-43. Cette première description de la localisation centrosomale de TDP-43 dans les cellules ouvre la voie à une compréhension plus complète de la physiologie et de la pathologie de TDP-43.

Pour finir, nous avons également démontré que la protéine FUS, une autre protéine majeure impliquée dans la physiopathologie de la SLA et proche de TDP-43 sur les plans structurels et fonctionnels, semble également associée au centrosome avec cependant un profil différent de celui de TDP-43. Ceci suggère que le centrosome est un axe de recherche prometteur dans la physiopathologie de la SLA.

Une partie de ces résultats a été publié dans le journal scientifique Brain (Oxford Academic) en 2023 (Bodin *et al*., 2023, Annexe 1) accompagné d'un commentaire scientifique par Megan Dykstra et Sami J. Barmada (Annexe 2), mettant en perspective nos résultats avec la présence de TDP-43 dans différents organites sans membranes (MLO), et de leur rôles potentiel en pathologie.

Dans leur commentaire scientifique intitulé « The MLO-down on TDP-43 », Megan Dykstra et Sami J. Barmada ont relevé qu'un nombre croissant d'études démontrent que la protéine TDP-43 est un composant actif de plusieurs organites sans membranes (MLO). En effet, à travers sa contribution à la transcription et l'épissage alternatif, TDP-43 a été retrouvée dans des MLO nucléaires tels que les speckles (Casafont *et al*., 2009) et paraspeckles nucléaires ainsi que les corps de Cajal (Pérez-Berlanga *et al*., 2023), des structures essentielles à la biogenèse des ribosomes et à l'épissage de l'ARN. En réponse à un stress, TDP-43 se délocalise des MLO pour former des corps nucléaires en forme de gouttelette (droplet-like nuclear body) dont le rôle reste assez flou mais qui pourrait servir à moduler la maturation des ARN en séquestrant des facteurs de transcription durant la période de stress. Par ailleurs, TDP-43 est également retrouvée dans des MLO cytoplasmiques, notamment dans les processing bodies (P-bodies) qui jouent un rôle dans la dégradation des ARN (Wang *et al*., 2008), dans les granules de stress (Pérez-Berlanga *et al*., 2023) et dans les granules de transport (Alami *et al*., 2014). De la même façon que les droplet-like nuclear body, les granules de stress séquestrent des RBP, ARN et ribosomes temporairement pour moduler le métabolisme des ARN le temps du stress. Les granules de transport permettent à TDP-43 de faire la navette pour acheminer des ARN sur des sites distaux pour une synthèse locale des protéines.

Nos travaux sur la localisation de TDP-43 au sein du centrosome, par définition un organiste sans membrane vient donc l'ajouter à la liste des MLO jusqu'à présent recensés. Cependant, comme soulevé par Megan Dykstra et Sami J. Barmada, nos travaux soulèvent plus de questions qu'anticipées, notamment sur le rôle de TDP-43 au sein de cet organite. A juste titre, les auteurs se sont demandé si TDP-43 pourrait être nécessaire à la formation du centrosome lui-même. Il est envisageable que TDP-43 achemine les ARNm essentiels codants pour les composants du centrosome, en les concentrant au sein de la PCM et les rendant disponibles pour une traduction locale. Ou à l'inverse, il est possible qu'un ou plusieurs de ces facteurs doivent être présents au centrosome pour que TDP-43 s'y localise. Une autre hypothèse envisagée par Megan Dykstra et Sami J. Barmada, serait qu'en condition de stress prolongé ou en condition pathologique, le centrosome servirait de site initial à la formation des agrégats de protéines cytoplasmiques dans les protéinopathies liées à TDP-43. Cette hypothèse est soutenue par nos résultats préliminaires obtenus *in vitro* en condition de stress induit par traitement par MG132, avec les réserves déjà évoquées liées au modèle.

Ce commentaire scientifique met en lumière une nouvelle notion à intégrer à l'avenir et qui définit que tout organite sans membrane contenant suffisamment d'ARN (comme le centrosome) contient probablement en son sein la protéine TDP-43.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons étudié la protéine TDP-43 en condition physiologique, mais comme nous l'avons présenté, notre principale difficulté a été de poursuivre notre travail en condition pathologique, car les modèles actuels restent éloignés de la forme sporadique de la maladie. Dans la seconde partie de ma thèse, nous avons donc tenté de mettre au point de nouveaux modèles de la maladie en s'appuyant sur les propriétés prion-like de la protéine TDP-43. L'obtention de ces modèles, permettrait ensuite de constituer un support recherche pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie, en particulier poursuivre nos travaux sur l'implication de la fraction centrosomale de TDP-43 en condition pathologique. Ces modèles permettraient également de tester de nouvelles approches thérapeutiques pré-cliniques sur des lignées cellulaires et murines plus fiables, plus représentatives de la forme sporadique de la maladie.

Partie II : Etude de la dynamique de TDP-43 en condition pathologique

1. Introduction : insuffisance des modèles d'études dans la recherche sur la sSLA

Malgré les avancées opérées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie ces dernières années, l'absence de modèle cellulaire et animal reproduisant fidèlement la sSLA est une limite majeure à la mise au point de traitements. Les principaux modèles murins disponibles à ce jour reposent avant tout sur des mutations à l'origine des formes familiales de la SLA. Comme évoqué précédemment, les souris transgéniques porteuses de mutations sur les gènes *SOD1*, *TARDBP, FUS et C9ORF72* ne sont qu'incomplètement représentatives de la SLA sporadique. Des nombreux modèles transgéniques et/ou inductibles ont été générés et nous ont permis d'avancer sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués, mais la principale limite de ces modèles reste l'absence d'agrégats pathologiques qui sont pourtant observés chez les patients, rendant encore nécessaire la genèse de nouveaux modèles pour avancer dans la compréhension de la maladie et faire émerger des pistes thérapeutiques novatrices.

Les propriétés prion-like de la protéine TDP-43 permettent de proposer des stratégies de propagation des inclusions, ainsi, des modèles cellulaires et murins novateurs ont vu le jour ces dernières années. Plusieurs études *in vitro* utilisant du LCS ou des lysats de cerveaux issus de patients SLA ou DFT-TDP ont été publiés. Ces études ont démontré que la protéine TDP-43 insoluble issue de lysat de cortex cérébraux, mais pas de cervelet, issus de patients SLA et DFT-TDP pouvait former des inclusions intracellulaires dans la lignée SH-SY5Y (Nonaka *et al*., 2013), dans des neurones corticaux primaires de souris (Feiler *et al*., 2015), dans les cellules HEK293 et NSC-34 (Smethurst *et al*., 2016) et dans des cellules HEK293 exprimant TDP-43 WT (Laferrière *et al*., 2019). Une autre étude a démontré la capacité du LCS issus de patients atteints de SLA et DFT à induire ces agrégats dans des cellules U251 -MG (lignée humaine de glioblastome multiforme) (Ding *et al*., 2015). Dans la continuité des modèles *in vitro*, des modèles murins ont été générés. L'injection intracérébrale d'extraits protéiques de cortex ou de fibrilles pathologiques de TDP-43 a permis d'induire chez des souris transgéniques (CamKIIa-hTDP-43NLSm, rNLS8) une charge lésionnelle TDP-43 similaire à celle observée chez des patients (Porta *et al.,* 2018). Ces résultats ont été reproduits, dans une moindre mesure, sur des modèles murins non transgéniques (Porta *et al*., 2018). De même, l'administration de LCS de patients atteints de SLA par pompe osmotique intraventriculaire pendant 30 jours chez des souris transgéniques (hTDP43WT) et non-transgéniques a permis de reproduire un phénotype clinique et pathologique de la maladie (Mishra *et al.,* 2020). Cependant ces modalités d'induction de la pathologie restent pour le moment invasives avec des atteintes cérébrales majeures et principalement sur des modèles transgéniques difficilement accessibles ou fastidieux à générer.

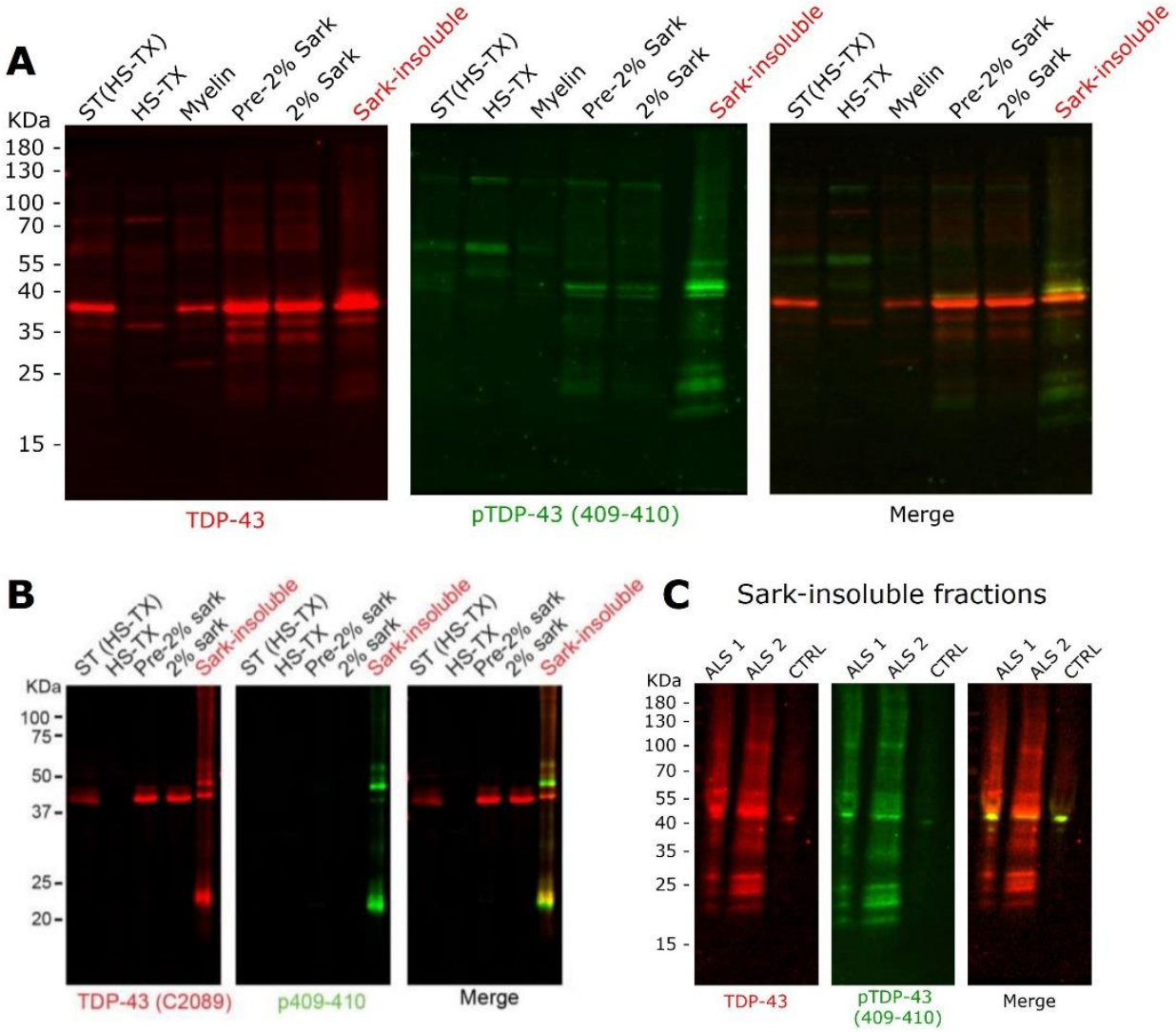


Figure 27 Caractérisation biochimique des extraits de cerveau contrôle et de patients atteints de SLA. *(A) Immunoblot de chaque étape du protocole d'extraction de protéines insolubles à partir de cortex frontal d'un patient atteint de SLA. ST(HS-TX) = homogénat de départ, HS-TX, Myéline, Pré-2% sark, 2% sark et la fraction finale sarkosyl-insoluble (Sark-insoluble) contenant la forme insoluble de TDP-43 qui a été utilisée dans cette étude comme germe pathogène. Un anticorps anti TDP-43 (10782-2-AP) a été utilisé pour détecter la protéine TDP-43 totale (rouge) et un anticorps spécifique pour la forme phosphorylée pTDP-43 Ser409/410 (22309-1-AP) a été utilisé pour la détection de la protéine TDP-43 insoluble/pathologique (vert). (B) Comparé aux résultats attendus issus de l'article de Porta et al., 2018. (C) Immunoblot des fractions finales sarkosyl-insolubles issues de deux patients atteint de SLA et d'un sujet contrôle.*

2. Objectif

L'objectif de ce projet était de tenter de générer un nouveau modèle murin par induction de la SLA sporadique qui soit plus proche de la pathologie sporadique humaine, facile à induire, et reproductible afin de pouvoir avancer sur la compréhension des mécanismes pathologiques impliqués et faire émerger de nouvelles pistes thérapeutiques.

3. Résultats

3.1. Purification des protéines insolubles à partir de cerveaux de sujet sain et de patients atteints de SLA

Les protéines insolubles ont été extraites à partir de cortex frontal d'un sujet sain et de 2 patients atteints de sSLA (données cliniques recensées dans le Tableau 4) selon un protocole adapté de Porta *et al*., 2018. Les extraits protéiques ont ensuite été testés en Western-Blot afin de s'assurer de la présence de TDP-43 et de sa forme phosphorylée dans les différentes fractions insolubles récoltées. Le protocole d'extraction mis au point nous a permis d'obtenir la forme totale de TDP-43 et d'enrichir la forme phosphorylée dans la fraction sark-insoluble comparées aux fractions des différentes étapes du protocole d'extraction (Figure 27A). Ces résultats étaient similaires à ceux obtenus avec le protocole d'extraction par Porta *et al*., 2018 sur cerveau de patient atteint de SLA/DFLT (Figure 27B) où nous retrouvons également la forme native et phosphorylée dans la fraction sark-insoluble ainsi que les fragments C-terminaux (CTFs) plus courts entre 20 et 35 kDa. Ces résultats nous ont permis de valider la méthode d'extraction et le protocole adapté mis au point pour notre étude. Nous avons ensuite reproduit ces extractions avec le protocole validé sur un autre patient atteint de SLA ainsi qu'un sujet contrôle. Ces résultats nous ont permis de démontrer que TDP-43 et pTDP-43 Ser409/410 ne sont pas présent dans la fraction sark-insolubles issue du cerveau du sujet sain comparé aux patients atteints de SLA (Figure 27C). Ces fractions insolubles finales ont été utilisées pour la suite de l'étude *in vivo*.

3.2. Induction *in vivo* : Evaluation des effets de protéines insolubles de cerveau de patients atteints de SLA chez la souris

La réalisation de l'étude *in vivo* a été réalisée au sein du laboratoire de Porsolt SAS (Le Genest-Saint-Isle, France). Porsolt SAS, fondée en 1985, est une entreprise reconnue à l'international comme leader dans les services de recherche contractuelle préclinique (CRO). Basée près de Laval (53), en France, Porsolt travaille avec des entreprises pharmaceutiques, biotechnologiques, des instituts académiques et des organisations à but non lucratif. Elle offre des services spécialisés de découverte de médicaments, de criblage, d'efficacité et de sécurité pharmacologique, couvrant de nombreuses maladies et systèmes physiologiques. Porsolt est particulièrement active dans les domaines de la neurologie et de la gestion de la douleur.

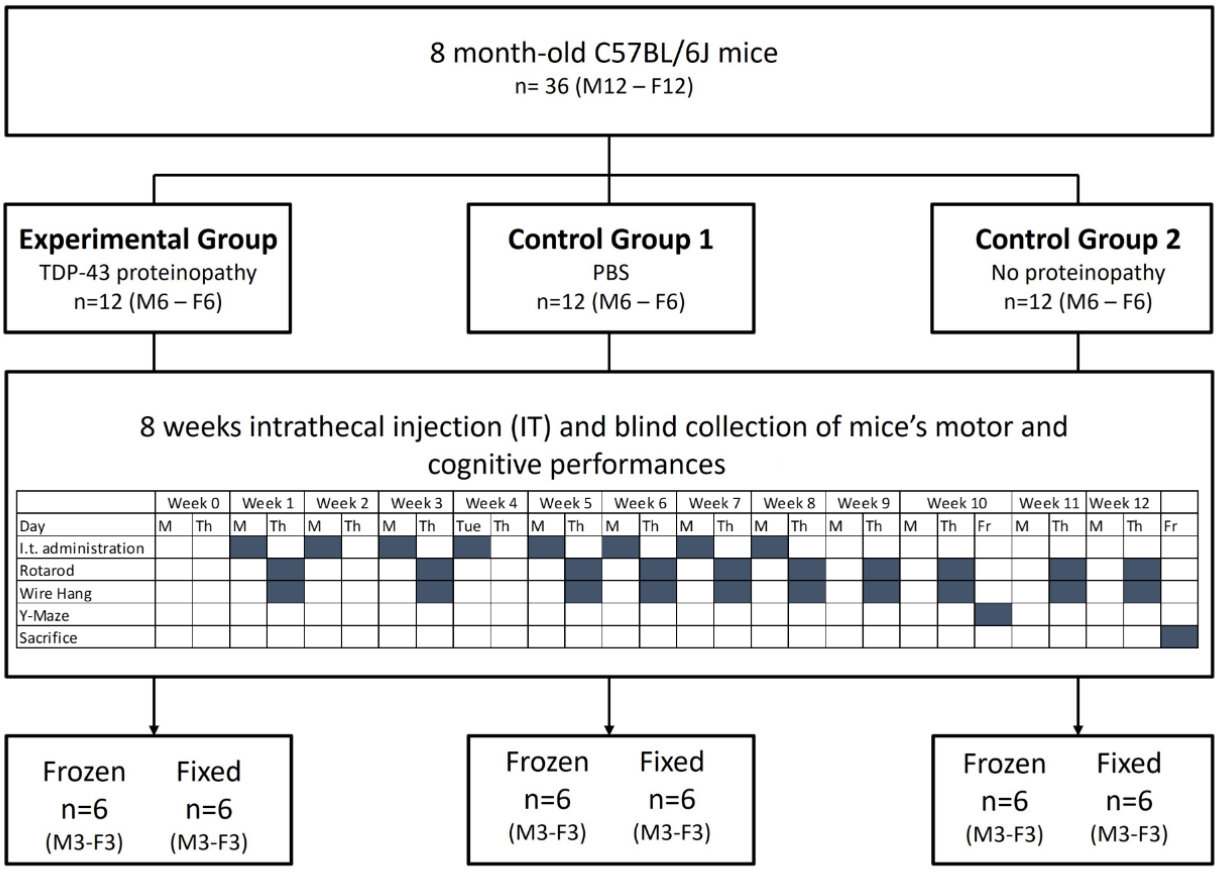


Figure 28 Design expérimental et chronogramme de l'étude.

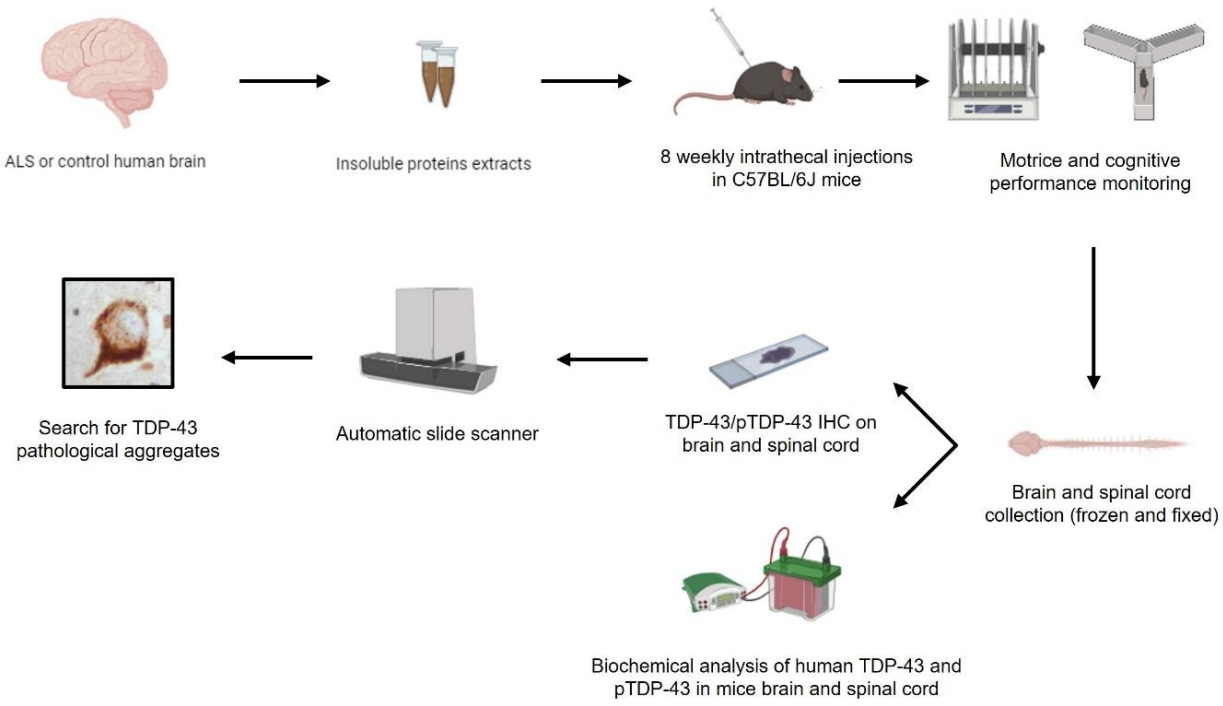


Figure 29 Représentation schématique du protocole d'induction in vitro et in vivo.

Le design expérimental de l'étude, représenté en Figure 28 était le suivant : 38 souris C57BL/6J de 8 mois (Janvier Labs) ont été utilisées. Nous avons choisi volontairement des souris âgées de 8 mois en début de protocole, 11 mois en fin d'étude, afin d'être plus proche de l'âge moyen de survenue de la maladie chez l'Homme. Les souris ont été réparties en 3 groupes expérimentaux (12 souris par groupe ; 6 mâles et 6 femelles), un groupe contrôle négatif (ayant reçu des injections de PBS 1X), un groupe contrôle sain (ayant reçu les injections de protéines insolubles issues de sujet non atteint de pathologie neurodégénérative (Ctrl_3)), et un groupe expérimental (ayant reçu les injections de protéines insolubles issues d'un patient atteint de SLA (sSLA_5)) (données cliniques dans le Tableau 4).

Quel que soit le groupe, les souris ont reçues des injections intrathécales répétées de 10 µL correspondant à 60µg de protéines par injection et par souris pour les groupes contrôle sain et groupe expérimental. Les groupes étaient composés à moitié d'individus mâles et à moitié d'individus femelles, la SLA touchant les deux genres chez l'Homme. Les animaux ont été pesés deux fois par semaines avant les injections et tests comportementaux pendant toute l'étude. Les animaux ont reçu une administration intrathécale de la solution correspondante pour chaque groupe par semaine sous anesthésie pendant 8 semaines. Pendant les 8 semaines d'injections, puis pendant les 4 semaines de repos qui ont suivies, les performances motrices des animaux ont été mesurés, puis les performances cognitives ont été testées en semaine 10. A la fin des 12 semaines de l'étude, la moitié des animaux ont été sacrifiés par décapitation pour les analyses biochimiques, et l'autre moitié par perfusion cardiaque de PFA 4% pour l'imagerie. Les cerveaux et les moelles épinières ont été prélevés en vues des analyses puis congelés ou fixés au PFA 4% en fonction du devenir de l'échantillon. Le protocole de prélèvement et d'analyse est représenté en figure 29. L'étude étant en cours, les résultats des analyses biochimiques et d'imagerie ne sont pas disponibles, mais les premiers résultats des tests comportementaux sont présentés ci-dessous.

3.2.1. Observations générales et mortalité

Durant les 8 semaines d'études impliquant les injections intrathécales, cinq souris sont décédées pendant ou après l'administration intrathécale. Au sein du groupe témoin, une souris est morte lors de la première anesthésie en semaine 1 et a pu être aussitôt remplacée, et une autre est morte au cours de la dernière semaine de l'étude. Parmi le groupe injecté avec l'extrait protéique de sujet sain : une souris a été retrouvée morte à la semaine 4, et deux souris sont mortes pendant l'anesthésie aux semaines 7 et 8, respectivement. Enfin, parmi le groupe injecté avec l'extrait protéique de patient SLA : une souris est morte pendant l'anesthésie à la semaine 8 et une autre a été sacrifiée pour des raisons éthiques en semaine 2. Aucun de ces décès n'était lié à l'installation d'un phénotype déficitaire neurologique, moteur ou cognitif.

La mortalité a été relativement élevée au cours des 8 semaines d'administration intrathécale. Ceci suggère que des administrations répétées sont source de complications. Avec le temps, les administrations intrathécales sont devenues plus difficiles à réaliser, augmentant la durée de l'anesthésie et par conséquent le taux de mortalité.

3.2.2. Evolution du poids corporel

Le poids corporel des souris est resté stable ou a légèrement augmenté pour les trois groupes pendant les 12 semaines d'études, n'entrainant aucune différence significative (Figure 30, modèle à effet mixte). Au début de l'étude, les souris pesaient en moyenne 32,1 g pour le groupe contrôle PBS, 31,8 g pour le groupe contrôle sain, et 32,3 g pour le groupe expérimental. Après 12 semaines d'études, les souris alors âgées de 11 mois pesaient en moyenne 33,3 g pour le groupe contrôle PBS, 34,4 g pour le groupe contrôle sain, et 32,7 g pour le groupe expérimental. En revanche, une diminution transitoire du poids a été observée en semaine 2 pour le groupe contrôle sain, mais qui est rapidement revenu à la normale la semaine suivante. Globalement une différence de poids a été observée tout au long de l'étude entre les mâles et les femelles (Figure 30B et C), les femelles étant plus petites que les mâles (28,4 g en moyenne pour les femelles contre 35,7 g pour les mâles) sans que cette différence ne soit significative.

3.2.3. Evaluation des fonctions motrices par Wire hang test

Chez les souris du groupe contrôle injectées avec du PBS, la latence moyenne de chute a progressivement diminué de la semaine 1 à la semaine 9, puis les valeurs sont revenues proches des performances de base (environ 85-90 secondes). Les femelles du groupe témoin ont affiché des performances supérieures à celles des mâles (Figure 31). Les faibles valeurs chez les mâles peuvent être dues au poids corporel ou au manque de motivation.

Chez les souris traitées avec l'extrait protéique de sujet sain, la latence moyenne à la chute a légèrement diminué au cours des 12 semaines, par rapport au groupe contrôle traité au PBS. Aucune différence significative n'a été observée avec l'analyse du modèle à effets mixtes. Néanmoins, des effets significatifs ont été observés avec une analyse 2 par 2 (test t de student non apparié). Par comparaison avec le groupe contrôle PBS, une diminution de 40% a été observé en semaine 3 ($p \leq 0,05$) ; 39% en semaine 10 ($p \leq 0,05$) ; 52% en semaine 11 ($p \leq 0,01$) et 43% en semaine 12 ($p \leq 0,05$). Chez les mâles les valeurs étaient légèrement diminuées par rapport au groupe contrôle. Cet effet était plus marqué de la semaine 10 à la semaine 12. Chez les femelles les valeurs ont diminué de la semaine 1 à la semaine 8 et de la semaine 10 à la semaine 12, par rapport au groupe témoin.

Chez les souris traitées avec l'extrait protéique de patient SLA, la latence moyenne à la chute a légèrement augmenté de la semaine 1 à la semaine 12, par rapport aux souris traitées avec l'extrait protéique sujet sain. Chez les mâles une différence significative a été observée en semaine 3 ($p \leq 0,001$) et en semaine 12 ($p \leq 0,05$) par rapport au groupe contrôle PBS avec l'analyse 2 par 2 (test t de student non apparié). Globalement chez les mâles les valeurs étaient légèrement inférieures à celles du groupe contrôle sain traité avec l'extrait protéique de sujet sain. Chez les femelles les valeurs ont légèrement augmenté de la semaine 1 à la semaine 12, par rapport aux souris traitées avec l'extrait protéique de patients sains.

Globalement, un effet est observé entre les performances des souris mâles, comparé aux performances des souris femelles, sûrement dû à la différence de poids entre les deux. Cependant aucun effet significatif n'a été observé sur la latence moyenne de chute en fonction des groupes, ce qui indique que les différentes injections reçues n'ont pas eu d'impact sur la force motrice.

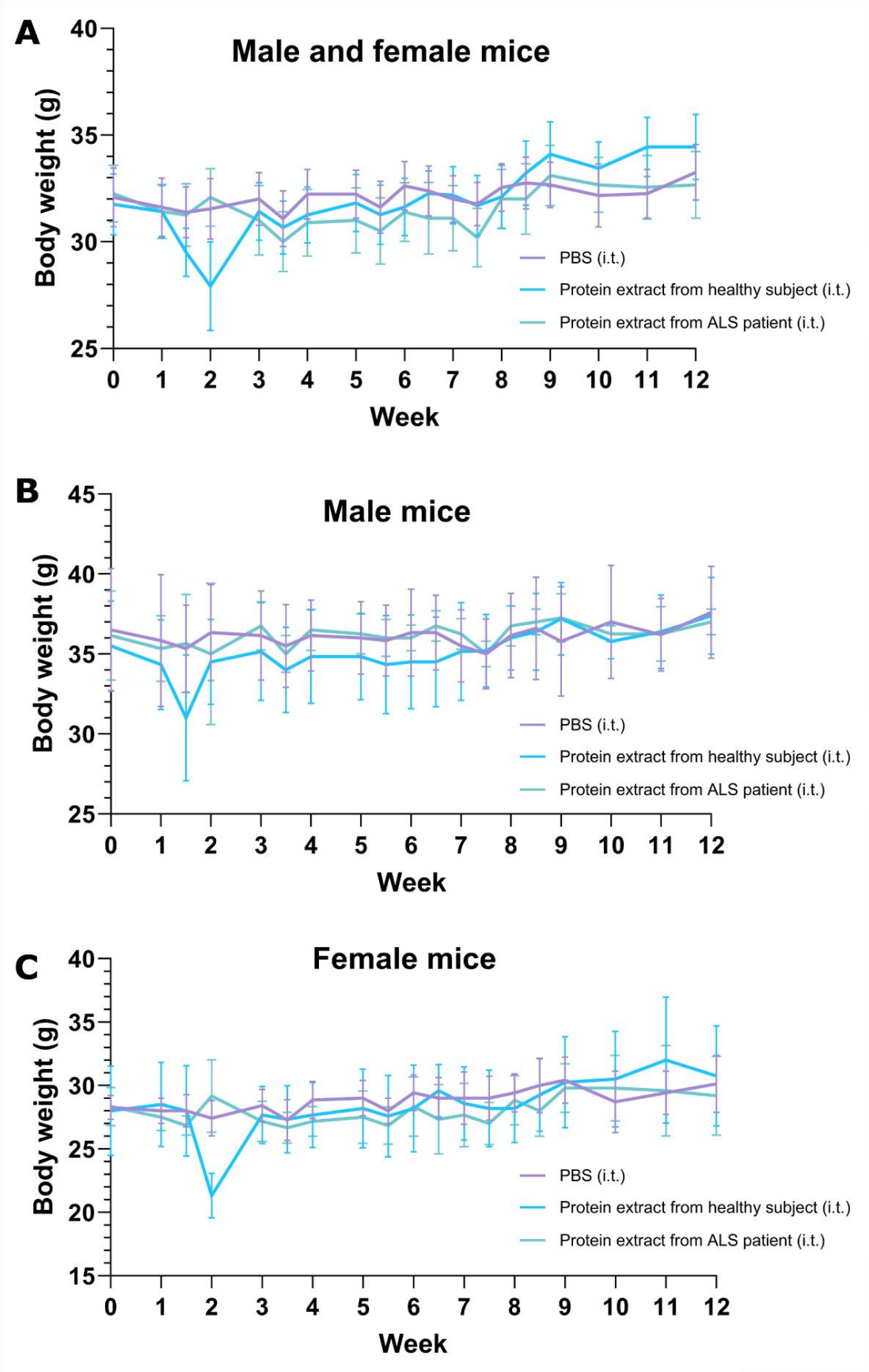


Figure 30 Evolution du poids corporel des souris sur 12 semaines en fonction des groupes. *(A) Evolution du poids corporel des souris en fonction des groupes, mâles et femelles confondus. (B) Evolution du poids des souris mâles en fonction des groupes. (C) Evolution du poids des souris femelles en fonction des groupes.*

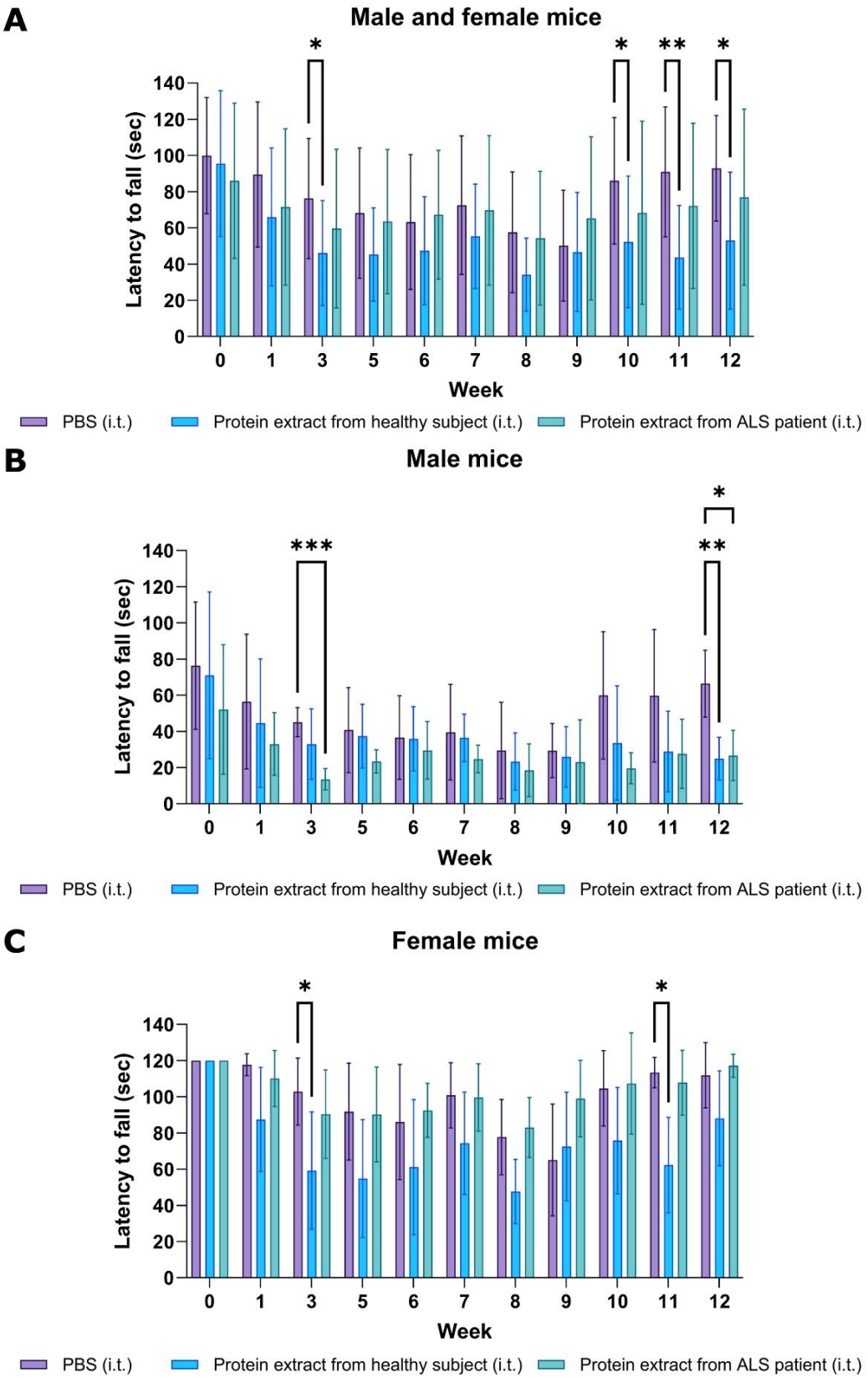


Figure 31 Temps de latence avant l'échec du test du wire hang chez la souris sur 12 semaines. *Modèle à effets mixtes mâles et femelles (A), souris mâles (B), souris femelles (C). * p ≤ 0,05 ; ** p ≤ 0,01 ; *** p ≤ 0,001.*

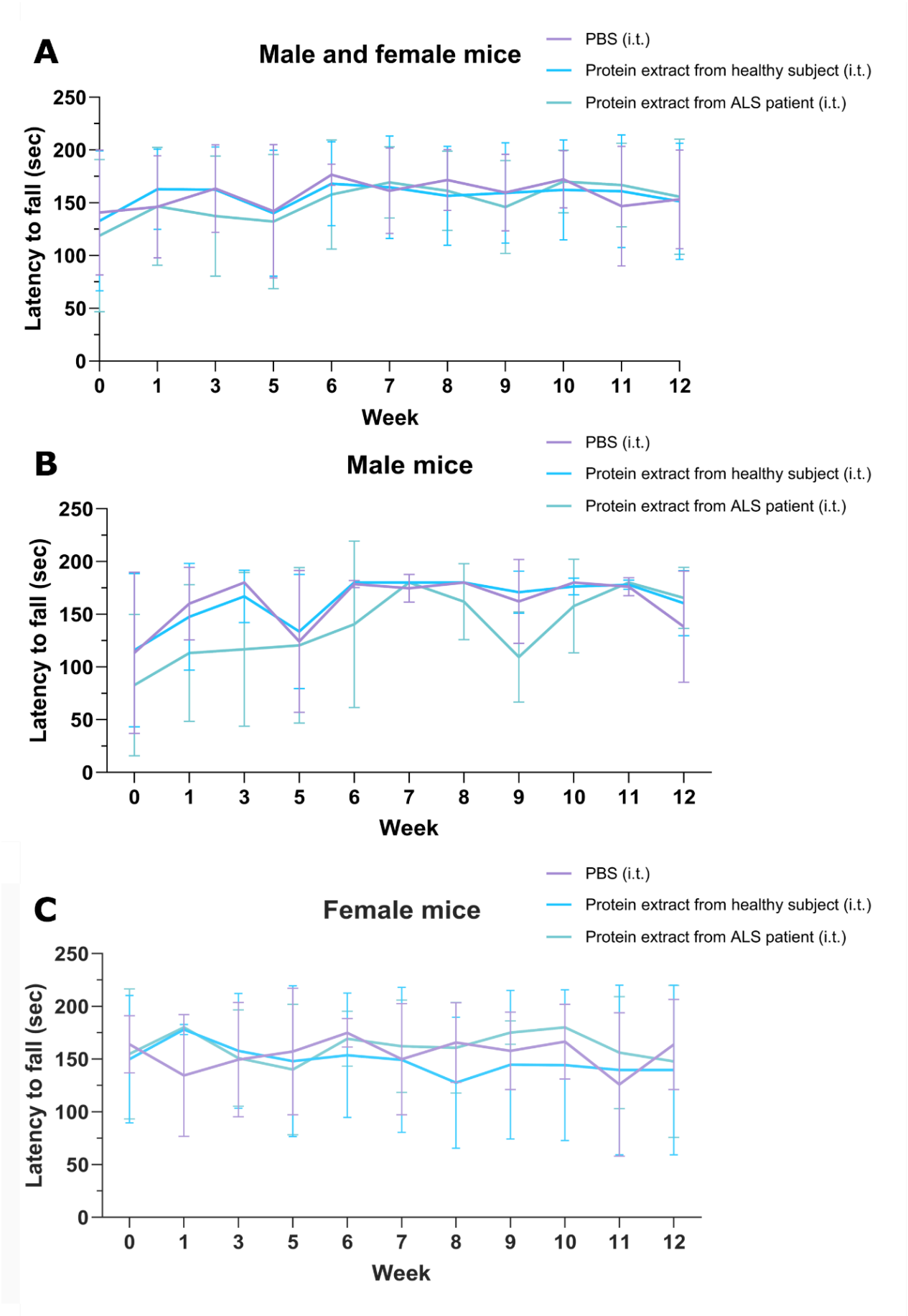


Figure 32 Temps de latence avant la chute au test du rotarod en fonction des groupes sur 12 semaines. *Modèle à effets mixtes mâles et femelles (A), souris mâles (B), souris femelles (C).*

3.2.4. Evaluation des fonctions motrices par rotarod

Lors de la session de référence (semaine 0), le temps de chute était compris entre 118,8 ± 20,8 et 140,7 ± 16,4 secondes pour les 3 groupes testés et un ou deux animaux sont tombés pendant le test sur les 12 souris testées par groupe. Le temps de chute moyen pour le groupe contrôle PBS a légèrement augmenté au cours des semaines 1 et 3, par rapport à la semaine 0, ce qui indique que les performances motrices se sont améliorées au fil du temps (Figure 32A). Les mâles et les femelles ont montré des performances motrices similaires (Figure 32B et C) (les valeurs moyennes étaient proches de 180 secondes), à l'exception des mâles aux semaines 0 et 5 (Figure 32B).

Il n'a pas été observé de différence significative entre les groupes contrôle sain et groupe expérimental par rapport au groupe contrôle PBS. Aucune différence significative n'a été observée sur le temps de chute avec l'analyse du modèle des effets mixtes ou avec l'analyse 2 par 2 (test U de Mann-Whitney, comparaison avec le groupe témoin). Aucun changement n'a été observé en ce qui concerne le nombre de souris tombées à chaque point dans le temps (test exact de Fisher). De même, aucune différence significative n'a été observée entre les souris du groupe contrôle sain et du groupe expérimental avec l'analyse du modèle à effets mixtes (Figure 32B et C).

Pour conclure, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes au cours de l'étude, ce qui indique que les souris ne présentent pas d'atteinte motrice.

3.2.5. Evaluation des fonctions cognitives par test du labyrinthe en Y (Y-maze).

Le test du labyrinthe en Y est basé sur la préférence spatiale basée sur la nouveauté chez la souris. Les souris témoins ont affiché un pourcentage de distance parcourue dans le nouveau bras significativement plus élevé que le niveau de chance (41,3 %, $p < 0,05$), ce qui indique une exploration/investigation plus importante du nouveau bras que du bras familier ou du bras de départ (Figure 33). Ces résultats indiquent la présence d'une reconnaissance spatiale chez ces souris. Cependant, aucun effet n'a été observé sur le temps passé dans le nouveau bras.

Les souris traitées avec l'extrait protéique de sujet sain ont affiché des performances similaires, avec une augmentation significative du pourcentage de distance parcourue dans le nouveau bras, par rapport au niveau de chance (42,4 %, $p < 0,01$) (Figure 33). Aucun effet n'a été observé sur le pourcentage de temps passé dans le nouveau bras. Néanmoins, le temps passé dans le nouveau bras était légèrement supérieur à celui passé dans le bras familier. Aucune différence n'a été observée sur le pourcentage de distance parcourue dans le nouveau bras entre les souris traitées avec l'extrait protéique de sujet sain et les souris témoins.

Les souris traitées avec les extraits protéiques de patient SLA ont montré une augmentation du pourcentage de distance parcourue dans le nouveau bras, par rapport au niveau de chance, même si cela n'a pas atteint la signification statistique ($p = 0551$, NS). Aucun effet n'a été observé sur le pourcentage de temps passé dans le nouveau bras. Néanmoins, le temps passé dans le nouveau bras était légèrement supérieur à celui passé dans le bras "familier". Aucune différence n'a été observée sur le pourcentage de distance parcourue

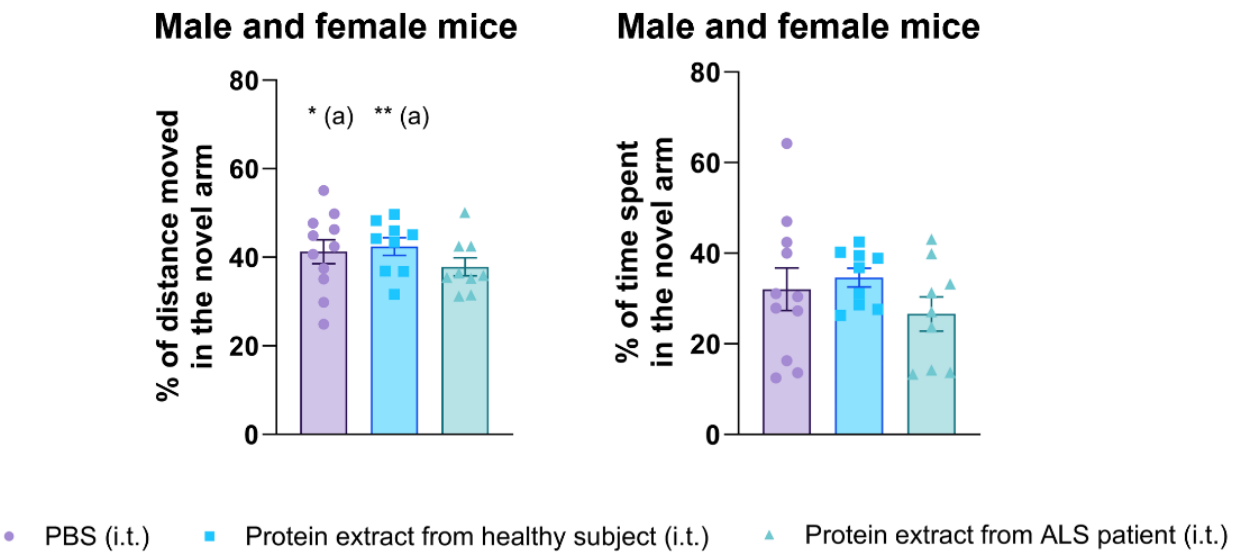


Figure 33 Pourcentage de la distance parcourue et du temps passé dans le nouveau bras lors du test du labyrinthe en Y chez souris en fonction des groupes en semaine 10. *Test t de Student : * p ≤ 0,05 ; ** p ≤ 0,01 (par rapport à la valeur du hasard Test t de Student non apparié).*

dans le nouveau bras entre les souris traitées avec l'extrait de protéine de patient SLA et les souris traitées avec l'extrait de protéine de sujet sain. Ces résultats permettent de conclure à une absence de déficit cognitifs chez les souris, quel que soit le groupe testé.

Ces résultats suggèrent que l'administration intrathécale répétée d'extrait protéique de patients atteints de SLA pendant 8 semaines n'a pas affecté le poids corporel des souris pendant 12 semaines. Les performances motrices, évaluées dans les tests du wire hang et du rotarod, n'ont pas été altérées par rapport aux souris traitées avec l'extrait protéique de sujet sain et au groupe contrôle. Aucun déficit cognitif n'a été observé dans le test du labyrinthe en Y, réalisé la semaine 10.

3.2.6. Analyses complémentaires prévisionnelles

Les souris ont été sacrifiées à la fin des 3 mois d'induction selon le mode de mise à mort prévu pour chaque prélèvement. Les cerveaux et moelles épinières ont été prélevés comme décrit dans la section « 8.1.7 Prélèvements biologiques » en vues d'analyses immunohistochimiques actuellement en cours, et de western blots afin d'étudier la genèse d'agrégats pathologiques.

4. Discussion et perspectives

La deuxième partie de cette thèse a pour objectif de répondre à un des grands enjeux en matière de recherche sur la SLA, générer de nouveaux modèles qui reproduisent fidèlement la forme sporadique de la pathologie, qui concerne plus de 90% des patients. Pour cela, des fractions de la protéine TDP-43 ont été extraites à partir de cerveaux de patients atteints de sSLA, et d'un sujet non atteint de maladie neurodégénérative considéré comme contrôle. Le protocole d'extraction a permis d'enrichir la forme phosphorylée de la protéine TDP-43, ainsi que les CTF dans les fractions issues des patients SLA, signes distinctifs de la pathologie mais pas chez le sujet contrôle. Ces premiers résultats sont donc encourageant pour l'induction *in vivo* à partir de ces fractions insolubles pathologiques. Ce projet ambitieux est en cours de réalisation, par conséquent les résultats les résultats d'induction *in vivo* ne sont que partiellement disponibles.

L'induction *in vivo* de protéines insolubles issues de patient atteint de SLA n'a pas permis de reproduire de phénotype moteur chez les souris injectées comparé à un groupe témoin et un groupe contrôle sain injecté avec des protéines insolubles issues d'un sujet non atteint de pathologie neurodégénérative. Par ailleurs, les animaux n'ont pas présenté d'atteinte cognitive. Si ces inductions ne reproduisent pas l'atteinte motrice observée chez les patients, nous sommes dans l'attente des résultats de l'analyse sur les échantillons biologiques prélevés pour déterminer si des agrégats pathologiques ont été induits. En effet, dans les études précédentes il n'a pas forcément été décrit de phénotype moteur ni cognitif chez les souris, malgré une charge lésionnelle pathologique pTDP-43 élevée (Porta *et al*., 2018).

A l'aide de ce protocole d'induction, nous espérons générer des inclusions cytoplasmiques pathologiques de TDP-43 dans les motoneurones de la moelle épinière des souris injectées avec les fractions pathologiques, avec éventuellement une propagation le long du névraxe, traduisant la propagation prion-like de neurone en neurone. Il est envisageable que nous n'obtenions pas ces résultats pathologiques. En effet, ce modèle d'induction prion-like se démocratise, et une étude a récemment été publiée (Vasquez-Sanchez *et al*., juin 2024), sur l'induction de la pathologie par induction de FUS dans la DFT. Si cette étude démontre que l'injection intracérébrale (cortex et hippocampe) de fibrilles de FUS humain dans le cerveau de souris transgéniques exprimant la protéine FUS humaine, est suffisante pour induire l'agrégation cytoplasmique de la protéine FUS exogène et endogène avec une propagation dans les régions distales du cerveau, en revanche elle soulève que cette injection n'induit pas d'agrégation dans des souris de souches sauvage naïves, mettant en lumière une barrière de propagation entre les espèces. De ce fait, ces résultats pourront expliquer des résultats négatifs si nous n'obtenons pas d'agrégats après les injections des protéines TDP-43 humaines chez nos souris exprimant uniquement la protéine TDP-43 murine. Toutefois, les études précédentes menées par Porta *et al*., 2018 et Zhang *et al*., 2021 sur des souris non transgéniques avaient permis la genèse d'agrégats bien que rares et moins efficaces dans ces souches sauvages. Aussi, s'agissant d'un protocole de mise au point, d'autres aspects du protocole pourront être ajustés à l'avenir si celui-ci ne permet pas l'induction d'agrégats, tels que les modalités d'administration (injections intracérébrales au lieu d'intrathécales), la souche de souris utilisées, augmenter la durée d'induction, utiliser des souris plus âgées, utiliser des fractions issues d'autre patients pour tester si certains ont une souche plus pathogène que d'autres, tel que décrit par plusieurs études (Nonaka *et al*., 2013 ; Laferrière *et al*., 2019 ; Porta *et al*., 2021 ; De Rossi *et al*., 2021).

Ce projet ambitieux est toujours en cours et ne nous permet pas pour l'instant de répondre à ces interrogations. Si ces inductions sont effectives, elles nous permettraient d'obtenir un modèle cellulaire et murin plus proche de la SLA sporadique, et à terme d'étudier plus précisément les mécanismes physiopathologiques impliqués qui restent non élucidés, et également d'identifier et de tester de nouvelles cibles thérapeutiques.

Conclusion générale et perspectives

Les objectifs de cette thèse, centrée sur l'étude de la dynamique de la protéine TDP-43 en conditions physiologique et pathologique, étaient doubles. D'une part, il s'agissait de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA à travers l'étude de son acteur central en condition physiologique, la protéine TDP-43. Les travaux de recherche menés ont permis d'identifier une nouvelle localisation physiologique de TDP-43, jusqu'alors inconnue. En effet, la protéine a été localisée au niveau du centrosome dans huit lignées cellulaires, de manière stable tout au long du cycle cellulaire. Cette découverte a été confirmée par des approches biochimiques et d'imagerie sur des centrosomes purifiés. L'apport de la microscopie super-résolutive STORM a permis de préciser son ultralocalisation au sein de la matrice péricentriolaire du centrosome, où nous avons identifié des ARNm et des protéines capables d'interagir avec TDP-43 localement. Cette nouvelle localisation suggère des fonctions encore inconnues de TDP-43 au sein de cet organite, potentiellement impliquées en pathologie. Toutefois, les limites rencontrées dans la modélisation de la pathologie *in vitro* et sur les échantillons biologiques humains ont freiné la poursuite de nos recherches sur son implication pathologique au sein du centrosome.

Pour dépasser ces difficultés, le second objectif de cette thèse était de contribuer à la recherche de nouveaux modèles représentatifs de la SLA sporadique par une approche reposant sur l'induction de la pathologie via l'activité prion-like de la protéine TDP-43. La purification des protéines TDP-43 insolubles issues de patients atteints de SLA a permis un enrichissement des formes pathologiques de la protéine (phosphorylée et fragments C-terminaux). Ces protéines insolubles sont actuellement utilisées pour l'induction de la pathologie chez des souris. Bien que l'induction sur modèle murin n'a pas permis de reproduire de phénotype moteur chez le groupe expérimental injecté avec les protéines insolubles de patient sSLA, les résultats d'imagerie et biochimiques ne sont pas encore disponibles et ne permettent pas de savoir s'il a permis d'induire la formation d'agrégats cytoplasmiques pathologiques. Si ce modèle aboutit, il permettra de poursuivre notre travail d'étude de l'impact de la fraction centrosomale de TDP-43 dans les mécanismes de neurodégénérescence liés à la SLA sporadique**.**

En conclusion, ces travaux ouvrent des perspectives de recherche sur le rôle du centrosome dans la SLA et potentiellement dans d'autres maladies neurodégénératives, vu l'importance de cet organite pour le développement et l'architecture neuronale. Si l'induction permet de générer un modèle animal représentatif de la SLA sporadique, il permettra une avancée majeure pour l'étude des mécanismes de neurodégénérescence impliqués dans la sSLA et ouvriront des perspectives en physiopathologie et thérapeutique.

Bibliographie

Afroz, T. *et al*. Functional and dynamic polymerization of the ALS-linked protein TDP-43 antagonizes its pathologic aggregation. Nat Commun 8, 45 (2017).

Agrawal, S. *et al*. RNA recognition motifs of disease-linked RNA-binding proteins contribute to amyloid formation. Sci Rep 9, 6171 (2019).

Alami, N. H. *et al*. Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. Neuron 81, 536–543 (2014).

Alquezar, C. *et al*. Targeting TDP-43 phosphorylation by Casein Kinase-1δ inhibitors: a novel strategy for the treatment of frontotemporal dementia. Mol Neurodegener 11, 36 (2016).

Álvarez-Satta, M., Moreno-Cugnon, L. & Matheu, A. Primary cilium and brain aging: role in neural stem cells, neurodegenerative diseases and glioblastoma. *Ageing Research Reviews* 52, 53–63 (2019).

Anderson, P. & Kedersha, N. Stress granules: the Tao of RNA triage. Trends Biochem Sci 33, 141–150 (2008).

Arai, T. *et al*. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Biochem Biophys Res Commun 351, 602–611 (2006).

ARSLA (2024, 10 août) *Les essais thérapeutiques.* https://www.arsla.org/essais-therapeutiques/

Ash, P. E. A. *et al*. Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in C. elegans. Hum Mol Genet 19, 3206–3218 (2010).

Ayala, Y. M. *et al*. TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. EMBO J 30, 277–288 (2011).

Azimzadeh, J. & Bornens, M. Structure and duplication of the centrosome. Journal of Cell Science 120, 2139–2142 (2007).

Babić Leko, M. *et al*. Molecular Mechanisms of Neurodegeneration Related to C9orf72 Hexanucleotide Repeat Expansion. Behav Neurol 2019, 2909168 (2019).

Babinchak, W. M. *et al*. The role of liquid–liquid phase separation in aggregation of the TDP-43 low-complexity domain. J Biol Chem 294, 6306–6317 (2019).

Balendra, R. & Isaacs, A. M. C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. Nat Rev Neurol 14, 544–558 (2018).

Balestra, F. R., Strnad, P., Flückiger, I. & Gönczy, P. Discovering regulators of centriole biogenesis through siRNA-based functional genomics in human cells. Dev Cell 25, 555–571 (2013).

Bannon, J. H., O'Donovan, D. S., Kennelly, S. M. E. & Mc Gee, M. M. The peptidyl prolyl isomerase cyclophilin A localizes at the centrosome and the midbody and is required for cytokinesis. Cell Cycle 11, 1340–1353 (2012).

Baralle, M., Buratti, E. & Baralle, F. E. The role of TDP-43 in the pathogenesis of ALS and DLFT. Biochem Soc Trans 41, 1536–1540 (2013).

Besnard-Guérin, C. Cytoplasmic localization of amyotrophic lateral sclerosis-related TDP-43 proteins modulates stress granule formation. Eur J Neurosci 52, 3995–4008 (2020).

Bilican, B. *et al.* Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5803–5808 (2012).

Birsa, N., Bentham, M. P. & Fratta, P. Cytoplasmic functions of TDP-43 and FUS and their role in ALS. Seminars in Cell & Developmental Biology 99, 193–201 (2020).

Blair, H. A. Tofersen: First Approval. Drugs 83, 1039–1043 (2023).

Bornens, M. Centrosome organization and functions. Curr Opin Struct Biol 66, 199–206 (2021).

Bose, J. K., Huang, C.-C. & Shen, C.-K. J. Regulation of autophagy by neuropathological protein TDP-43. J Biol Chem 286, 44441–44448 (2011).

Bowler, M. *et al*. High-resolution characterization of centriole distal appendage morphology and dynamics by correlative STORM and electron microscopy. Nat Commun 10, 993 (2019).

Brenner, D. *et al*. NEK1 mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. Brain 139, e28 (2016).

Brettschneider, J. *et al*. Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 74, 20–38 (2013).

Brown, A.-L. *et al*. TDP-43 loss and ALS-risk SNPs drive mis-splicing and depletion of UNC13A. Nature 603, 131–137 (2022).

Brown, R. H. & Al-Chalabi, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. New England Journal of Medicine 377, 162–172 (2017).

Buratti, E. & Baralle, F. E. Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CTFR exon 9. J Biol Chem 276, 36337–36343 (2001).

Buratti, E. *et al*. Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. FEBS J 277, 2268–2281 (2010).

Buratti, E. Functional Significance of TDP-43 Mutations in Disease. Adv Genet 91, 1–53 (2015).

Buratti, E. TDP-43 post-translational modifications in health and disease. Expert Opin Ther Targets 22, 279–293 (2018).

Buratti, E. Trends in Understanding the Pathological Roles of TDP-43 and FUS Proteins. Adv Exp Med Biol 1281, 243–267 (2021).

Burkhardt, M. F. *et al*. A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. Mol Cell Neurosci 56, 355–364 (2013).

Burrell, J. R. *et al*. The frontotemporal dementia-motor neuron disease continuum. Lancet 388, 919–931 (2016).

Buxbaum, A. R., Haimovich, G. & Singer, R. H. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. Nat Rev Mol Cell Biol 16, 95–109 (2015).

Čajánek, L. & Nigg, E. A. Cep164 triggers ciliogenesis by recruiting Tau tubulin kinase 2 to the mother centriole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E2841-2850 (2014).

Calliari, A. *et al*. HDGFL2 cryptic proteins report presence of TDP-43 pathology in neurodegenerative diseases. Mol Neurodegener 19, 29 (2024).

Camu, W. *et al*. Vitamin D confers protection to motoneurons and is a prognostic factor of amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiology of Aging 35, 1198–1205 (2014).

Casafont, I., Bengoechea, R., Tapia, O., Berciano, M. T. & Lafarga, M. TDP-43 localizes in mRNA transcription and processing sites in mammalian neurons. J Struct Biol 167, 235–241 (2009).

Chang, C., Chiang, M., Toh, E. K.-W., Chang, C.-F. & Huang, T. Molecular mechanism of oxidation-induced TDP-43 RRM1 aggregation and loss of function. FEBS Lett 587, 575–582 (2013).

Charif, S. E., Luchelli, L., Vila, A., Blaustein, M. & Igaz, L. M. Cytoplasmic Expression of the ALS/FTD-Related Protein TDP-43 Decreases Global Translation Both *in vitro* and *in vivo*. Front Cell Neurosci 14, 594561 (2020).

Chatterjee, M. *et al*. Plasma extracellular vesicle tau and TDP-43 as diagnostic biomarkers in FTD and ALS. Nat Med 30, 1771–1783 (2024).

Chen, H. *et al.* Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell* 14, 796–809 (2014).

Chen, W.-J., Wang, W.-T., Tsai, T.-Y., Li, H.-K. & Lee, Y.-H. W. DDX3 localizes to the centrosome and prevents multipolar mitosis by epigenetically and translationally modulating p53 expression. Sci Rep 7, 9411 (2017).

Cheng, W. *et al*. CRISPR-Cas9 Screens Identify the RNA Helicase DDX3X as a Repressor of C9ORF72 (GGGGCC)n Repeat-Associated Non-AUG Translation. Neuron 104, 885-898.e8 (2019).

Chew, J. *et al*. Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. Science 348, 1151–1154 (2015).

Chi, B. *et al*. Interactome analyses revealed that the U1 snRNP machinery overlaps extensively with the RNAP II machinery and contains multiple ALS/SMA-causative proteins. Sci Rep 8, 8755 (2018).

Chiang, P.-M. *et al*. Deletion of TDP-43 down-regulates Tbc1d1, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 16320–16324 (2010).

Chiò, A. *et al*. Prognostic factors in ALS: A critical review. Amyotroph Lateral Scler 10, 310–323 (2009).

Choi, H.-J., Cha, S. J., Lee, J.-W., Kim, H.-J. & Kim, K. Recent Advances on the Role of GSK3β in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Brain Sci 10, 675 (2020).

Chooi, W. H. *et al*. Defined Alginate Hydrogels Support Spinal Cord Organoid Derivation, Maturation, and Modeling of Spinal Cord Diseases. Adv Healthc Mater 12, e2202342 (2023).

Chouaib, R. *et al*. A Dual Protein-mRNA Localization Screen Reveals Compartmentalized Translation and Widespread Co-translational RNA Targeting. Developmental Cell 54, 773-791.e5 (2020).

Cirulli, E. T. *et al*. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. Science 347, 1436–1441 (2015).

Clemson, C. M. *et al*. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. Mol Cell 33, 717–726 (2009).

Codron, P. *et al*. Primary fibroblasts derived from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients do not show ALS cytological lesions. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener 19, 446–456 (2018).

Codron, P. Marqueurs pathologiques et pistes thérapeutiques dans la Sclérose Latérale Amyotrophique Sporadique. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2019.

Cohen, T. J. *et al*. An acetylation switch controls TDP-43 function and aggregation propensity. Nat Commun 6, 5845 (2015).

Cohen, T. J., Hwang, A. W., Unger, T., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. Y. Redox signalling directly regulates TDP-43 via cysteine oxidation and disulphide cross-linking. EMBO J 31, 1241–1252 (2012).

Colombrita, C. *et al*. TDP-43 and FUS RNA-binding proteins bind distinct sets of cytoplasmic messenger RNAs and differently regulate their post-transcriptional fate in motoneuron-like cells. J Biol Chem 287, 15635–15647 (2012).

Colombrita, C. *et al*. TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. J Neurochem 111, 1051–1061 (2009).

Conicella, A. E., Zerze, G. H., Mittal, J. & Fawzi, N. L. ALS Mutations Disrupt Phase Separation Mediated by α-Helical Structure in the TDP-43 Low-Complexity C-Terminal Domain. Structure 24, 1537–1549 (2016).

Corcia, P., Blasco, H. & Camu, W. [Genetics of amyotrophic lateral sclerosis]. Presse Med 43, 555–562 (2014).

Costessi, L., Porro, F., Iaconcig, A. & Muro, A. F. TDP-43 regulates β-adducin (Add2) transcript stability. RNA Biol 11, 1280–1290 (2014).

Couthouis, J. *et al*. Evaluating the role of the FUS/TLS-related gene EWSR1 in amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet 21, 2899–2911 (2012).

Cox, L. E. *et al*. Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). PLoS One 5, e9872 (2010).

D'Angiolella, V. *et al*. SCF(Cyclin F) controls centrosome homeostasis and mitotic fidelity through CP110 degradation. Nature 466, 138–142 (2010).

Davis, S. A. *et al*. TDP-43 interacts with mitochondrial proteins critical for mitophagy and mitochondrial dynamics. Neurosci Lett 678, 8–15 (2018).

De Boer, E. M. J. *et al*. TDP-43 proteinopathies: a new wave of neurodegenerative diseases. J Neurol Neurosurg Psychiatry 92, 86–95 (2021).

De Rossi, P. *et al.* FTLD-TDP assemblies seed neoaggregates with subtype-specific features via a prion-like cascade. *EMBO Rep* 22, e53877 (2021).

DeJesus-Hernandez, M. *et al*. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. Neuron 72, 245–256 (2011).

Deng, H.-X. *et al*. Amyotrophic Lateral Ssclerosis and Structural Defects in Cu,Zn Superoxide Dismutase. Science 261, 1047–1051 (1993).

Deng, X. *et al*. CHMP2B regulates TDP-43 phosphorylation and cytotoxicity independent of autophagy via CK1. J Cell Biol 221, e202103033 (2022).

Dennis, J. S. & Citron, B. A. Wobbler mice modeling motor neuron disease display elevated transactive response DNA binding protein. Neuroscience 158, 745–750 (2009).

Deshaies, J.-E. *et al*. TDP-43 regulates the alternative splicing of hnRNP A1 to yield an aggregation-prone variant in amyotrophic lateral sclerosis. Brain 141, 1320–1333 (2018).

Deshimaru, M. *et al*. DCTN1 Binds to TDP-43 and Regulates TDP-43 Aggregation. Int J Mol Sci 22, 3985 (2021).
Ding, X. *et al*. Exposure to ALS-FTD-CSF generates TDP-43 aggregates in glioblastoma cells through exosomes and TNTs-like structure. Oncotarget 6, 24178–24191 (2015).

Ding, X. *et al*. Exposure to ALS-FTD-CSF generates TDP-43 aggregates in glioblastoma cells through exosomes and TNTs-like structure. Oncotarget 6, 24178–24191 (2015).

Ding, X. *et al*. Spreading of TDP-43 pathology via pyramidal tract induces ALS-like phenotypes in TDP-43 transgenic mice. Acta Neuropathol Commun 9, 15 (2021).

Dobson-Stone, C. *et al*. CYLD is a causative gene for frontotemporal dementia - amyotrophic lateral sclerosis. Brain 143, 783–799 (2020).

Eguether, T. *et al*. The deubiquitinating enzyme CYLD controls apical docking of basal bodies in ciliated epithelial cells. Nat Commun 5, 4585 (2014).

Elden, A. C. *et al*. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. Nature 466, 1069–1075 (2010).

Emde, A. *et al*. Dysregulated miRNA biogenesis downstream of cellular stress and ALS-causing mutations: a new mechanism for ALS. EMBO J 34, 2633–2651 (2015).

Falconer, D. S. (1956). Wobbler. Mouse News Lett. 15, 23–29.

Fang, Y.-S. *et al*. Full-length TDP-43 forms toxic amyloid oligomers that are present in frontotemporal lobar dementia-TDP patients. Nat Commun 5, 4824 (2014).

Fazal, R. *et al*. HDAC6 inhibition restores TDP-43 pathology and axonal transport defects in human motor neurons with TARDBP mutations. EMBO J 40, e106177 (2021).

Feiler, M. S. *et al*. TDP-43 is intercellularly transmitted across axon terminals. J Cell Biol 211, 897–911 (2015).

Feligioni, M., Nishimune, A. & Henley, J. M. Protein SUMOylation modulates calcium influx and glutamate release from presynaptic terminals. Eur J Neurosci 29, 1348–1356 (2009).

Fiesel, F. C. *et al*. Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6. EMBO J 29, 209–221 (2010).

Filippova, N., Yang, X., King, P. & Nabors, L. B. Phosphoregulation of the RNA-binding Protein Hu Antigen R (HuR) by Cdk5 Affects Centrosome Function. J Biol Chem 287, 32277–32287 (2012).

Fratta, P. *et al*. C9orf72 hexanucleotide repeat associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia forms RNA G-quadruplexes. Sci Rep 2, 1016 (2012).

Freibaum, B. D., Chitta, R. K., High, A. A. & Taylor, J. P. Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. J Proteome Res 9, 1104–1120 (2010).

Freischmidt, A. *et al*. Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. Nat Neurosci 18, 631–636 (2015).

Furukawa, Y., Kaneko, K., Watanabe, S., Yamanaka, K. & Nukina, N. A seeding reaction recapitulates intracellular formation of Sarkosyl-insoluble transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43 inclusions. J Biol Chem 286, 18664–18672 (2011).

Gagliardi, S. *et al*. Long non coding RNAs and ALS: Still much to do. Noncoding RNA Res 3, 226–231 (2018).

Gebauer, F., Schwarzl, T., Valcárcel, J. & Hentze, M. W. RNA-binding proteins in human genetic disease. Nat Rev Genet 22, 185–198 (2021).

Gendron, T. F., Belzil, V. V., Zhang, Y.-J. & Petrucelli, L. Mechanisms of toxicity in C9DLFT/ALS. Acta Neuropathol 127, 359–376 (2014).

Gitcho, M. A. *et al*. TDP-43 A315T Mutation in Familial Motor Neuron Disease. Ann Neurol 63, 535–538 (2008).

Gnazzo, M. M. *et al*. The RNA-binding protein ATX-2 regulates cytokinesis through PAR-5 and ZEN-4. Mol Biol Cell 27, 3052–3064 (2016).

Godena, V. K. *et al*. TDP-43 regulates Drosophila neuromuscular junctions growth by modulating Futsch/MAP1B levels and synaptic microtubules organization. PLoS One 6, e17808 (2011).

Gogendeau, D., Guichard, P. & Tassin, A.-M. Purification of centrosomes from mammalian cell lines. Methods Cell Biol 129, 171–189 (2015).

Greer, Y. E. *et al*. Casein kinase 1δ functions at the centrosome and Golgi to promote ciliogenesis. Mol Biol Cell 25, 1629–1640 (2014).

Gu, J. *et al*. Transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates alternative splicing of tau exon 10: Implications for the pathogenesis of tauopathies. J Biol Chem 292, 10600–10612 (2017).

Guo, W. *et al*. An ALS-associated mutation affecting TDP-43 enhances protein aggregation, fibril formation and neurotoxicity. Nat Struct Mol Biol 18, 822–830 (2011).

Gurney, M. E. *et al*. Motor Neuron Degeneration in Mice that Express a Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Mutation. Science 264, 1772–1775 (1994).

Hadano, S. *et al*. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. Nat Genet 29, 166–173 (2001).

Han, J.-H. *et al*. ALS/DLFT-linked TDP-43 regulates neurite morphology and cell survival in differentiated neurons. Exp Cell Res 319, 1998–2005 (2013).

Hans, F., Eckert, M., von Zweydorf, F., Gloeckner, C. J. & Kahle, P. J. Identification and characterization of ubiquitinylation sites in TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). J Biol Chem 293, 16083–16099 (2018).

Haramati, S. *et al*. miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 13111–13116 (2010).

Hart, M. P. & Gitler, A. D. ALS-associated ataxin 2 polyQ expansions enhance stress-induced caspase 3 activation and increase TDP-43 pathological modifications. J Neurosci 32, 9133–9142 (2012).

Has. Prise en charge des personnes atteintes de sclérose latérale amyotrophique — Texte des recommandations (version courte): 23 et 24 novembre 2005, Centre universitaire méditerranéen – Nice. Revue Neurologique 162, 544–548 (2006).

Hasegawa, M. *et al*. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 64, 60–70 (2008).

Hashimoto, S. & Kishimoto, T. Roles of RNA-binding proteins in immune diseases and cancer. *Semin Cancer Biol* 86, 310–324 (2022).

Hebron, M. L. *et al*. Parkin ubiquitinates Tar-DNA binding protein-43 (TDP-43) and promotes its cytosolic accumulation via interaction with histone deacetylase 6 (HDAC6). J Biol Chem 288, 4103–4115 (2013).

Hergesheimer, R. C. *et al*. The debated toxic role of aggregated TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis: a resolution in sight? Brain 142, 1176–1194 (2019).

Herzog, J. J., Deshpande, M., Shapiro, L., Rodal, A. A. & Paradis, S. TDP-43 misexpression causes defects in dendritic growth. Sci Rep 7, 15656 (2017).

Higginbotham, H. R. & Gleeson, J. G. The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci* 30, 276–283 (2007).

Hill, S. J. *et al*. Two familial ALS proteins function in prevention/repair of transcription-associated DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A 113, E7701–E7709 (2016).

Holt, C. E. & Schuman, E. M. The central dogma decentralized: new perspectives on RNA function and local translation in neurons. Neuron 80, 648–657 (2013).

Hsu, L. C. & White, R. L. BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 12983–12988 (1998).

Iguchi, Y. *et al*. Exosome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43. Brain 139, 3187–3201 (2016).

Iguchi, Y. *et al*. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. Brain 136, 1371–1382 (2013).

Iguchi, Y. *et al*. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. Neurobiology of Disease 45, 862–870 (2012).

Irwin, K. E. *et al*. A fluid biomarker reveals loss of TDP-43 splicing repression in presymptomatic ALS–FTD. Nat Med 30, 382–393 (2024).

Ishii, T., Kawakami, E., Endo, K., Misawa, H. & Watabe, K. Formation and spreading of TDP-43 aggregates in cultured neuronal and glial cells demonstrated by time-lapse imaging. PLoS One 12, e0179375 (2017).

Izumikawa, K. *et al*. TDP-43 stabilises the processing intermediates of mitochondrial transcripts. Sci Rep 7, 7709 (2017).

Johns, A. E. & Maragakis, N. J. Exploring Motor Neuron Diseases Using iPSC Platforms. Stem Cells 40, 2–13 (2022).

Johnson, J. O. *et al*. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. Neuron 68, 857–864 (2010).

Journe-Mallet, I. *et al.* Design and application of a customizable relational DataBase to assess clinicopathological correlations and concomitant pathology in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol* 33, e13138 (2023).

Jucker, M. & Walker, L. C. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. Nature 501, 45–51 (2013).

Kabashi, E. *et al*. Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits *in vivo*. Hum Mol Genet 19, 671–683 (2010).

Kabashi, E. *et al*. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. Nat Genet 40, 572–574 (2008).

Kametani, F. *et al*. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. Biochem Biophys Res Commun 382, 405–409 (2009).

Kawaguchi, T. *et al*. Changes to the TDP-43 and FUS Interactomes Induced by DNA Damage. J Proteome Res 19, 360–370 (2020).

Kawahara, Y. & Mieda-Sato, A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 3347–3352 (2012).

Kiernan, M. C. *et al*. Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 377, 942–955 (2011).

Kim, S. H., Shanware, N. P., Bowler, M. J. & Tibbetts, R. S. Amyotrophic lateral sclerosis-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to co-regulate HDAC6 mRNA. J Biol Chem 285, 34097–34105 (2010).

King, A., Maekawa, S., Bodi, I., Troakes, C. & Al-Sarraj, S. Ubiquitinated, p62 immunopositive cerebellar cortical neuronal inclusions are evident across the spectrum of TDP-43 proteinopathies but are only rarely additionally immunopositive for phosphorylation-dependent TDP-43: Cerebellar p62 in TDP-43-opathies. Neuropathology 31, 239–249 (2011).

Kinoshita, C., Kubota, N. & Aoyama, K. Interplay of RNA-Binding Proteins and microRNAs in Neurodegenerative Diseases. Int J Mol Sci 22, 5292 (2021).

Kodani, A., Salomé Sirerol-Piquer, M., Seol, A., Garcia-Verdugo, J. M. & Reiter, J. F. Kif3a interacts with Dynactin subunit p150 Glued to organize centriole subdistal appendages. EMBO J 32, 597–607 (2013).

Konno, T. *et al*. DCTN1-related neurodegeneration: Perry syndrome and beyond. Parkinsonism Relat Disord 41, 14–24 (2017).

Koppers, M. *et al*. C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. Ann Neurol 78, 426–438 (2015).

Koyama, A. *et al*. Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. Nucleic Acids Res 44, 5820–5836 (2016).

Kraemer, B. C. *et al*. Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. Acta Neuropathol 119, 409–419 (2010).

Kuijpers, M. & Hoogenraad, C. C. Centrosomes, microtubules and neuronal development. *Mol Cell Neurosci* 48, 349–358 (2011).

Kwiatkowski, T. J. *et al*. Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. Science 323, 1205–1208 (2009).

Kwong, L. K., Uryu, K., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M.-Y. TDP-43 proteinopathies: neurodegenerative protein misfolding diseases without amyloidosis. Neurosignals 16, 41–51 (2008).

Laferrière, F. *et al*. TDP-43 extracted from frontotemporal lobar degeneration subject brains displays distinct aggregate assemblies and neurotoxic effects reflecting disease progression rates. Nat Neurosci 22, 65–77 (2019).

Lagier-Tourenne, C. *et al*. Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. Nat Neurosci 15, 1488–1497 (2012).

Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. Hum Mol Genet 19, R46–R64 (2010).

Lang, B., Armaos, A. & Tartaglia, G. G. RNAct: Protein-RNA interaction predictions for model organisms with supporting experimental data. Nucleic Acids Res 47, D601–D606 (2019).

Laporte, M. H., Gambarotto, D., Borgers, S., Hamel, V. & Guichard, P. Time-series reconstruction of the molecular architecture of human centriole assembly.

Lashkevich, K. A. & Dmitriev, S. E. mRNA Targeting, Transport and Local Translation in Eukaryotic Cells: From the Classical View to a Diversity of New Concepts. Mol Biol 55, 507–537 (2021).

Lattante, S., Rouleau, G. A. & Kabashi, E. TARDBP and FUS mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis: summary and update. Hum Mutat 34, 812–826 (2013).

Lauranzano, E. *et al*. Peptidylprolyl isomerase A governs TARDBP function and assembly in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes. Brain 138, 974–991 (2015).

Le Clech, M. Role of CAP350 in centriolar tubule stability and centriole assembly. PLoS One 3, e3855 (2008).

Lee, S. & Huang, E. J. Modeling ALS and FTD with iPSC-derived Neurons. Brain Res 1656, 88–97 (2017).

Lee, S., Lee, T. A., Song, S. J., Park, T. & Park, B. Hyperproduction of IL-6 caused by aberrant TDP-43 overexpression in high-fat diet-induced obese mice. FEBS Lett 589, 1825–1831 (2015).

Leemann-Zakaryan, R. P. *et al*. Dynamic subcellular localization of the Ewing sarcoma proto-oncoprotein and its association with and stabilization of microtubules. J Mol Biol 386, 1–13 (2009).

LeGuennec, M., Klena, N., Aeschlimann, G., Hamel, V. & Guichard, P. Overview of the centriole architecture. Current Opinion in Structural Biology 66, 58–65 (2021).

Leigh, P. N. *et al*. UBIQUITIN-IMMUNOREACTIVE INTRANEURONAL INCLUSIONS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. 1991

Li, H.-R. *et al*. The physical forces mediating self-association and phase-separation in the C-terminal domain of TDP-43. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom 1866, 214–223 (2018). (1)

Li, H.-R., Chiang, W.-C., Chou, P.-C., Wang, W.-J. & Huang, J.-R. TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) liquid-liquid phase separation is mediated by just a few aromatic residues. J Biol Chem 293, 6090–6098 (2018). (2)

Li, H.-Y., Yeh, P.-A., Chiu, H.-C., Tang, C.-Y. & Tu, B. P. Hyperphosphorylation as a defense mechanism to reduce TDP-43 aggregation. PLoS One 6, e23075 (2011).

Li, Q., Yokoshi, M., Okada, H. & Kawahara, Y. The cleavage pattern of TDP-43 determines its rate of clearance and cytotoxicity. Nat Commun 6, 6183 (2015).

Liachko, N. F. *et al*. CDC7 inhibition blocks pathological TDP-43 phosphorylation and neurodegeneration. Ann Neurol 74, 39–52 (2013).

Liachko, N. F. *et al*. The Tau Tubulin Kinases TTBK1/2 Promote Accumulation of Pathological TDP-43. PLoS Genet 10, e1004803 (2014).

Liachko, N. F., Guthrie, C. R. & Kraemer, B. C. Phosphorylation promotes neurotoxicity in a Caenorhabditis elegans model of TDP-43 proteinopathy. J Neurosci 30, 16208–16219 (2010).

Ling, J. P., Pletnikova, O., Troncoso, J. C. & Wong, P. C. TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. Science 349, 650–655 (2015).

Ling, S.-C., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Converging mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and protein homeostasis. Neuron 79, 416–438 (2013).

Liu, Y.-C., Chiang, P.-M. & Tsai, K.-J. Disease animal models of TDP-43 proteinopathy and their pre-clinical applications. Int J Mol Sci 14, 20079–20111 (2013).

Lu, L. *et al*. Hu antigen R (HuR) is a positive regulator of the RNA-binding proteins TDP-43 and FUS/TLS: implications for amyotrophic lateral sclerosis. J Biol Chem 289, 31792–31804 (2014).

Lukavsky, P. J. *et al*. Molecular basis of UG-rich RNA recognition by the human splicing factor TDP-43. Nat Struct Mol Biol 20, 1443–1449 (2013).

Luna, J. *et al.* Epidemiological time-trend of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) over two decades: The French population-based register of ALS in Limousin (FRALim register). Rev Neurol *(Paris)* 178, 914–923 (2022).

Mackenzie, I. R., Rademakers, R. & Neumann, M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. Lancet Neurol 9, 995–1007 (2010).

Madeo, F., Schlauer, J., Zischka, H., Mecke, D. & Fröhlich, K.-U. Tyrosine Phosphorylation Regulates Cell Cycle-dependent Nuclear Localization of Cdc48p. Molecular Biology of the Cell 9, 131 (1998).

Markopoulou, K. *et al*. Clinical, neuropathological and genotypic variability in SNCA A53T familial Parkinson's disease. Variability in familial Parkinson's disease. Acta Neuropathol 116, 25–35 (2008).

Matej, R., Tesar, A. & Rusina, R. Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias in comorbidity: A clinical and neuropathological overview. Clin Biochem 73, 26–31 (2019).

Matsye, P. *et al*. HuR promotes the molecular signature and phenotype of activated microglia: Implications for amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases. Glia 65, 945–963 (2017).

Maurel, C. *et al*. A role for SUMOylation in the Formation and Cellular Localization of TDP-43 Aggregates in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Mol Neurobiol 57, 1361–1373 (2020).

McAlary, L., Plotkin, S. S., Yerbury, J. J. & Cashman, N. R. Prion-Like Propagation of Protein Misfolding and Aggregation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Front. Mol. Neurosci. 12, 262 (2019).

McCord, J. M. & Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 244, 6049–6055 (1969).

Mejzini, R. *et al*. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? Front Neurosci 13, 1310 (2019).

Melamed, Z. *et al*. Premature polyadenylation-mediated loss of stathmin-2 is a hallmark of TDP-43-dependent neurodegeneration. Nat Neurosci 22, 180–190 (2019).

Mielke, J. K. *et al.* Seeding activity of human superoxide dismutase 1 aggregates in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis postmortem neural tissues by real-time quaking-induced conversion. Acta Neuropathol 147, 100 (2024).

Millecamps, S. *et al*. SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. J Med Genet 47, 554–560 (2010).

Millecamps, S., Gentil, B. J., Gros-Louis, F., Rouleau, G. & Julien, J.-P. Alsin is partially associated with centrosome in human cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1745, 84–100 (2005).

Miller, R. G., Mitchell, J. D. & Moore, D. H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* 2012, CD001447 (2012).

Mishra, P. S. *et al*. Transmission of ALS pathogenesis by the cerebrospinal fluid. Acta Neuropathol Commun 8, 65 (2020).

Mitra, J. *et al*. Motor neuron disease-associated loss of nuclear TDP-43 is linked to DNA double-strand break repair defects. Proc Natl Acad Sci U S A 116, 4696–4705 (2019).

Mitsumoto, H., Brooks, B. R. & Silani, V. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? Lancet Neurol 13, 1127–1138 (2014).

Mojarad, B. A. *et al*. CEP19 cooperates with FOP and CEP350 to drive early steps in the ciliogenesis programme. Open Biol 7, 170114 (2017).

Morera, A. A., Ahmed, N. S. & Schwartz, J. C. TDP-43 regulates transcription at protein-coding genes and Alu retrotransposons. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech 1862, 194434 (2019).

Moser, J. M., Bigini, P. & Schmitt-John, T. The wobbler mouse, an ALS animal model. Mol Genet Genomics 288, 207–229 (2013).

Moujalled, D. *et al*. Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress. PLoS One 8, e67433 (2013).

Müller, K. *et al*. Comprehensive analysis of the mutation spectrum in 301 German ALS families. J Neurol Neurosurg Psychiatry 89, 817–827 (2018).

Müller-Taubenberger, A., Ishikawa-Ankerhold, H. C., Kastner, P. M., Burghardt, E. & Gerisch, G. The STE group kinase SepA controls cleavage furrow formation in Dictyostelium. Cell Motil Cytoskeleton 66, 929–939 (2009).

Münch, C. *et al*. Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. Neurology 63, 724–726 (2004).

Murphy, N. A. *et al*. Age-related penetrance of the C9orf72 repeat expansion. Sci Rep 7, 2116 (2017).

Naganuma, T. *et al*. Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. EMBO J 31, 4020–4034 (2012).

Nejedlá, M. *et al*. The actin regulator profilin 1 is functionally associated with the mammalian centrosome. Life Sci Alliance 4, e202000655 (2021).

Nelson, P. T. *et al*. Limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy (LATE): consensus working group report. Brain 142, 1503–1527 (2019).

Neumann, M. *et al*. Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. Acta Neuropathol 117, 137–149 (2009).

Neumann, M. *et al*. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. Science 314, 130–133 (2006).

Nishimoto, Y., Nakagawa, S. & Okano, H. NEAT1 lncRNA and amyotrophic lateral sclerosis. Neurochem Int 150, 105175 (2021).

Nishimura, A. L. *et al.* Allele-specific knockdown of ALS-associated mutant TDP-43 in neural stem cells derived from induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 9, e91269 (2014).

Nishimura, A. L. *et al*. Nuclear import impairment causes cytoplasmic trans-activation response DNA-binding protein accumulation and is associated with frontotemporal lobar degeneration. Brain 133, 1763–1771 (2010).

Nolan, M., Talbot, K. & Ansorge, O. Pathogenesis of FUS-associated ALS and FTD: insights from rodent models. Acta Neuropathol Commun 4, 99 (2016).

Nonaka, T. *et al*. Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1δ Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. J Biol Chem 291, 5473–5483 (2016).

Nonaka, T. *et al*. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. Cell Rep 4, 124–134 (2013).

Noristani, H. N. *et al*. Brca1 is expressed in human microglia and is dysregulated in human and animal model of ALS. Mol Neurodegener 10, 34 (2015).

Ntountoumi, C. *et al*. Low complexity regions in the proteins of prokaryotes perform important functional roles and are highly conserved. Nucleic Acids Research 47, 9998–10009 (2019).

Oakes, J. A., Davies, M. C. & Collins, M. O. TBK1: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation. Mol Brain 10, 5 (2017).

Onesto, E. *et al*. Gene-specific mitochondria dysfunctions in human TARDBP and C9ORF72 fibroblasts. Acta Neuropathol Commun 4, 47 (2016).

Ott, C. *et al*. VPS4 is a dynamic component of the centrosome that regulates centrosome localization of γ-tubulin, centriolar satellite stability and ciliogenesis. Sci Rep 8, 3353 (2018).

Ou, S. H., Wu, F., Harrich, D., García-Martínez, L. F. & Gaynor, R. B. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. J Virol 69, 3584–3596 (1995).

Parkinson, N. *et al*. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). Neurology 67, 1074–1077 (2006).

Pasetto, L. *et al*. Defective cyclophilin A induces TDP-43 proteinopathy: implications for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. Brain 144, 3710–3726 (2021).

Pereira, B., Billaud, M. & Almeida, R. RNA-Binding Proteins in Cancer: Old Players and New Actors. Trends Cancer 3, 506–528 (2017).

Pérez-Berlanga, M. *et al*. Loss of TDP-43 oligomerization or RNA binding elicits distinct aggregation patterns. EMBO J 42, e111719 (2023). Lukong, K. E., Chang, K., Khandjian, E. W. & Richard, S. RNA-binding proteins in human genetic disease. Trends Genet 24, 416–425 (2008).

Pesiridis, G. S., Lee, V. M.-Y. & Trojanowski, J. Q. Mutations in TDP-43 link glycine-rich domain functions to amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet 18, R156–R162 (2009).

Philips, T. & Rothstein, J. D. Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Curr Protoc Pharmacol 69, 5.67.1-5.67.21 (2015).

Phukan, J. *et al*. The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. J Neurol Neurosurg Psychiatry. (2011)

Pillai, S. *et al*. Tank binding kinase 1 is a centrosome-associated kinase necessary for microtubule dynamics and mitosis. Nat Commun 6, 10072 (2015).

Polymenidou, M. *et al*. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. Nat Neurosci 14, 459–468 (2011).

Porta, S. *et al.* Distinct brain-derived TDP-43 strains from FTLD-TDP subtypes induce diverse morphological TDP-43 aggregates and spreading patterns *in vitro* and *in vivo*. *Neuropathol Appl Neurobiol* 47, 1033–1049 (2021).

Porta, S. *et al*. Patient-derived frontotemporal lobar degeneration brain extracts induce formation and spreading of TDP-43 pathology *in vivo*. Nat Commun 9, 4220 (2018).

Rabdano, S. O. *et al*. Onset of disorder and protein aggregation due to oxidation-induced intermolecular disulfide bonds: case study of RRM2 domain from TDP-43. Sci Rep 7, 11161 (2017).

Ran, J., Yang, Y., Li, D., Liu, M. & Zhou, J. Deacetylation of α-tubulin and cortactin is required for HDAC6 to trigger ciliary disassembly. Sci Rep 5, 12917 (2015).

Ratti, A. & Buratti, E. Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. J Neurochem 138 Suppl 1, 95–111 (2016).

Ratti, A. *et al*. Chronic stress induces formation of stress granules and pathological TDP-43 aggregates in human ALS fibroblasts and iPSC-motoneurons. Neurobiology of Disease 145, 105051 (2020).

Rayner, S. L. *et al*. TDP-43 is a ubiquitylation substrate of the SCFcyclin F complex. Neurobiol Dis 167, 105673 (2022).

Reaume, A. G. *et al*. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. Nat Genet 13, 43–47 (1996).

Renton, A. E. *et al*. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. Neuron 72, 257–268 (2011).

Rinchetti, P., Rizzuti, M., Faravelli, I. & Corti, S. MicroRNA Metabolism and Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Mol Neurobiol 55, 2617–2630 (2018).

Rosen, D. R. *et al*. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362, 59–62 (1993).

Russo, A. *et al*. Increased cytoplasmic TDP-43 reduces global protein synthesis by interacting with RACK1 on polyribosomes. Hum Mol Genet 26, 1407–1418 (2017).

Safieddine, A. *et al*. A choreography of centrosomal mRNAs reveals a conserved localization mechanism involving active polysome transport. Nat Commun 12, 1352 (2021).

Sánchez-Huertas, C. *et al.* Non-centrosomal nucleation mediated by augmin organizes microtubules in post-mitotic neurons and controls axonal microtubule polarity. *Nat Commun* 7, 12187 (2016).

Scarian, E. *et al*. Patients' Stem Cells Differentiation in a 3D Environment as a Promising Experimental Tool for the Study of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Int J Mol Sci 23, 5344 (2022).

Schatten, H. The mammalian centrosome and its functional significance. Histochem Cell Biol 129, 667–686 (2008).

Schermelleh, L. *et al*. Super-resolution microscopy demystified. Nat Cell Biol 21, 72–84 (2019).

Schmitt-John, T. *et al*. Mutation of Vps54 causes motor neuron disease and defective spermiogenesis in the wobbler mouse. Nat Genet 37, 1213–1215 (2005).

Schwab, C., Arai, T., Hasegawa, M., Yu, S. & McGeer, P. L. Colocalization of transactivation-responsive DNA-binding protein 43 and huntingtin in inclusions of Huntington disease. J Neuropathol Exp Neurol 67, 1159–1165 (2008).

Scotter, E. L. *et al*. Differential roles of the ubiquitin proteasome system and autophagy in the clearance of soluble and aggregated TDP-43 species. J Cell Sci 127, 1263–1278 (2014).

Sellami, L., Saracino, D. & Le Ber, I. Genetic forms of frontotemporal lobar degeneration: Current diagnostic approach and new directions in therapeutic strategies. Rev Neurol (Paris) 176, 571–581 (2020).

Sephton, C. F. *et al*. TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. J Biol Chem 285, 6826–6834 (2010).

Sepulveda, G. *et al*. Co-translational protein targeting facilitates centrosomal recruitment of PCNT during centrosome maturation in vertebrates. eLife 7, e34959 (2018).

Serio, A. *et al.* Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 4697–4702 (2013).

Shang, Y. & Huang, E. J. Mechanisms of FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res 1647, 65–78 (2016).

Sharma, A. *et al*. ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. Nat Commun 7, 10465 (2016).

Shibata, N., Asayama, K., Hirano, A. & Kobayashi, M. Immunohistochemical study on superoxide dismutases in spinal cords from autopsied patients with amyotrophic lateral sclerosis. Dev Neurosci 18, 492–498 (1996).

Shimonaka, S., Nonaka, T., Suzuki, G., Hisanaga, S.-I. & Hasegawa, M. Templated Aggregation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Seeding with TDP-43 Peptide Fibrils. J Biol Chem 291, 8896–8907 (2016).

Shodai, A. *et al*. Aberrant assembly of RNA recognition motif 1 links to pathogenic conversion of TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). J Biol Chem 288, 14886–14905 (2013).

Sigal, Y. M., Zhou, R. & Zhuang, X. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy. *Science* 361, 880–887 (2018).

Silk, A. D., Holland, A. J. & Cleveland, D. W. Requirements for NuMA in maintenance and establishment of mammalian spindle poles. J Cell Biol 184, 677–690 (2009).

Skibinski, G. *et al*. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. Nat Genet 37, 806–808 (2005).

Smethurst, P. *et al*. *In vitro* prion-like behaviour of TDP-43 in ALS. Neurobiol Dis 96, 236–247 (2016).

Smeyers, J., Banchi, E.-G. & Latouche, M. C9ORF72: What It Is, What It Does, and Why It Matters. Front Cell Neurosci 15, 661447 (2021).

Smith, R., Myers, K., Ravits, J. & Bowser, R. Amyotrophic lateral sclerosis: Is the spinal fluid pathway involved in seeding and spread? Med Hypotheses 85, 576–583 (2015).

Sreedharan, J. *et al*. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Science 319, 1668–1672 (2008).

Stallings, N. R., Puttaparthi, K., Luther, C. M., Burns, D. K. & Elliott, J. L. Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. Neurobiol Dis 40, 404–414 (2010).

Stoica, R. *et al*. ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. Nat Commun 5, 3996 (2014).

Stover, C. M. *et al*. Organization of the MASP2 locus and its expression profile in mouse and rat. Mamm Genome 15, 887–900 (2004).

Strong, M. J. *et al*. TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. Mol Cell Neurosci 35, 320–327 (2007).

Stubenvoll, M. D., Medley, J. C., Irwin, M. & Song, M. H. ATX-2, the C. elegans Ortholog of Human Ataxin-2, Regulates Centrosome Size and Microtubule Dynamics. PLoS Genet 12, e1006370 (2016).

Sumitha, R. *et al*. Cerebrospinal Fluid from Patients with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Induces Degeneration of Motor Neurons Derived from Human Embryonic Stem Cells. Mol Neurobiol 56, 1014–1034 (2019).

Swaminathan, A. *et al*. Expression of C9orf72-related dipeptides impairs motor function in a vertebrate model. Hum Mol Genet 27, 1754–1762 (2018).

Swarup, V. *et al*. Deregulation of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis triggers nuclear factor κB-mediated pathogenic pathways. J Exp Med 208, 2429–2447 (2011).

Swinnen, B. & Robberecht, W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. Nat Rev Neurol 10, 661–670 (2014).

Takahashi, K. *et al*. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131, 861–872 (2007).

Tamaki, Y. *et al.* Spinal cord extracts of amyotrophic lateral sclerosis spread TDP-43 pathology in cerebral organoids. *PLoS Genet* 19, e1010606 (2023).

Tan, Q. *et al*. Extensive cryptic splicing upon loss of RBM17 and TDP43 in neurodegeneration models. Hum Mol Genet 25, 5083–5093 (2016).

Tan, R. H. *et al*. TDP-43 proteinopathies: pathological identification of brain regions differentiating clinical phenotypes. Brain 138, 3110–3122 (2015).

Tanaka, Y., Nonaka, T., Suzuki, G., Kametani, F. & Hasegawa, M. Gain-of-function profilin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause seed-dependent intracellular TDP-43 aggregation. Hum Mol Genet 25, 1420–1433 (2016).

Taylor, L. M. *et al*. Pathological phosphorylation of tau and TDP-43 by TTBK1 and TTBK2 drives neurodegeneration. Mol Neurodegener 13, 7 (2018).

The Centrosome in Cell Replication and Early Development Edited by R.E. Palazzo and G.P. Schatten San Diego, CA: Academic Press (2000).

Tollervey, J. R. *et al*. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. Nat Neurosci 14, 452–458 (2011).

Torres, P. *et al*. Cryptic exon splicing function of TARDBP interacts with autophagy in nervous tissue. Autophagy 14, 1398–1403 (2018).

Vaca, G. *et al*. Therapeutic potential of novel Cell Division Cycle Kinase 7 inhibitors on TDP-43-related pathogenesis such as Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). J Neurochem 156, 379–390 (2021).

Valdmanis, P. N., Daoud, H., Dion, P. A. & Rouleau, G. A. Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis. Curr Neurol Neurosci Rep 9, 198–205 (2009).

Van Nostrand, E. L. *et al*. Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP). Nat Methods 13, 508–514 (2016).

Vance, C. *et al*. ALS mutant FUS disrupts nuclear localization and sequesters wild-type FUS within cytoplasmic stress granules. Hum Mol Genet 22, 2676–2688 (2013).

Vance, C. *et al*. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. Science 323, 1208–1211 (2009).

Vazquez-Sanchez, S. *et al*. Frontotemporal dementia-like disease progression elicited by seeded aggregation and spread of FUS. Mol Neurodegener 19, 46 (2024).

Vijayalakshmi, K. *et al*. Cerebrospinal Fluid from sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis patients induces degeneration of a cultured motor neuron cell line. Brain Research 1263, 122–133 (2009).

Waite, A. J. *et al*. Reduced C9orf72 protein levels in frontal cortex of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal degeneration brain with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion. Neurobiol Aging 35, 1779.e5-1779.e13 (2014).

Walker, A. K. *et al*. Functional recovery in new mouse models of ALS/DLFT after clearance of pathological cytoplasmic TDP-43. Acta Neuropathol 130, 643–660 (2015).

Wang, H.-Y., Wang, I.-F., Bose, J. & Shen, C.-K. J. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. Genomics 83, 130–139 (2004).

Wang, I.-F., Wu, L.-S., Chang, H.-Y. & Shen, C.-K. J. TDP-43, the signature protein of FTLD-U, is a neuronal activity-responsive factor. J Neurochem 105, 797–806 (2008).

Wang, M.-D., Little, J., Gomes, J., Cashman, N. R. & Krewski, D. Identification of risk factors associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. NeuroToxicology 61, 101–130 (2017).

Wang, W. *et al*. The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. Hum Mol Genet 22, 4706–4719 (2013).

Wang, W. *et al*. The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. Nat Med 22, 869–878 (2016).

Watts, G. D. J. *et al*. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. Nat Genet 36, 377–381 (2004).

White, M. A. *et al*. TDP-43 gains function due to perturbed autoregulation in a Tardbp knock-in mouse model of ALS-FTD. Nat Neurosci 21, 552–563 (2018).

White, M. C. & Quarmby, L. M. The NIMA-family kinase, Nek1 affects the stability of centrosomes and ciliogenesis. BMC Cell Biol 9, 29 (2008).

Wigley C. *et al.* Dynamic Association of Proteasomal Machinery with the Centrosome. *J Cell Biol* 145, 481–490 (1999).

Williams, K. L. *et al*. CCNF mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. Nat Commun 7, 11253 (2016).

Wils, H. *et al*. TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 3858–3863 (2010).

Winton, M. J. *et al*. Disturbance of Nuclear and Cytoplasmic TAR DNA-binding Protein (TDP-43) Induces Disease-like Redistribution, Sequestration, and Aggregate Formation. J Biol Chem 283, 13302–13309 (2008).

Woo, E. *et al.* Machine learning approaches based on fibroblast morphometry do not predict ALS. *Neurobiol Aging* 130, 80–83 (2023).

Writing Group & Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Neurol 16, 505–512 (2017).

Wu, C.-H. *et al*. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 488, 499–503 (2012).

Wu, L.-S. *et al*. TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. Genesis 48, 56–62 (2010).

Wu, L.-S., Cheng, W.-C. & Shen, C.-K. J. Targeted depletion of TDP-43 expression in the spinal cord motor neurons leads to the development of amyotrophic lateral sclerosis-like phenotypes in mice. J Biol Chem 287, 27335–27344 (2012).

Wu, X. & Brewer, G. The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. Gene 500, 10–21 (2012).
Xia, Q. *et al*. TDP-43 loss of function increases TFEB activity and blocks autophagosome-lysosome fusion. EMBO J 35, 121–142 (2016).

Xu, Y.-F. *et al*. Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. Mol Neurodegener 6, 73 (2011).

Yamashita, S. & Ando, Y. Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. Transl Neurodegener 4, 13 (2015).

Yan, X., Habedanck, R. & Nigg, E. A. A complex of two centrosomal proteins, CAP350 and FOP, cooperates with EB1 in microtubule anchoring. Mol Biol Cell 17, 634–644 (2006).

Yang, C. *et al*. Partial loss of TDP-43 function causes phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A 111, E1121-1129 (2014).

Yang, H. & Hu, H.-Y. Sequestration of cellular interacting partners by protein aggregates: implication in a loss-of-function pathology. FEBS J 283, 3705–3717 (2016).

Yang, Y. *et al*. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. Nat Genet 29, 160–165 (2001).

Yoshino, Y. & Ishioka, C. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 beta induces apoptosis and mitotic catastrophe by disrupting centrosome regulation in cancer cells. Sci Rep 5, 13249 (2015).

Zein-Sabatto, H. & Lerit, D. A. The Identification and Functional Analysis of mRNA Localizing to Centrosomes. Front. Cell Dev. Biol. 9, (2021).

Zhang, R. *et al.* Spreading of pathological TDP-43 along corticospinal tract axons induces ALS-like phenotypes in Atg5+/- mice. *Int J Biol Sci* 17, 390–401 (2021).

Zhang, Y.-J. *et al*. Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 7607–7612 (2009).

Zhang, Y.-J. *et al*. The dual functions of the extreme N-terminus of TDP-43 in regulating its biological activity and inclusion formation. Hum Mol Genet 22, 3112–3122 (2013).

Zhang, Z. *et al.* Downregulation of microRNA-9 in iPSC-derived neurons of FTD/ALS patients with TDP-43 mutations. *PLoS One* 8, e76055 (2013).

Zhapparova, O. N., Fokin, A. I., Vorobyeva, N. E., Bryantseva, S. A. & Nadezhdina, E. S. Ste20-like protein kinase SLK (LOSK) regulates microtubule organization by targeting dynactin to the centrosome. Mol Biol Cell 24, 3205–3214 (2013).

Zhong, X., Liu, L., Zhao, A., Pfeifer, G. P. & Xu, X. The Abnormal Spindle-like, Microcephaly-associated (ASPM) Gene Encodes a Centrosomal Protein. Cell Cycle 4, 1227–1229 (2005).

Zou, Z.-Y. *et al*. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 88, 540–549 (2017).

Table des illustrations

Figure 1 Structure de la protéine TDP-43. 21
Figure 2 Représentation schématique de la structure des fragments C-terminaux (CTF) retrouvés chez les patients atteints de SLA. 23
Figure 3 Schéma des différentes modifications post-transcriptionnelles de la protéine TDP-43. 25
Figure 4 Représentation schématique des principales fonctions de la protéine TDP-43. 29
Figure 5 Agrégats pathologiques de TDP-43 retrouvés chez les patients atteints de SLA. 35
Figure 6 Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA. 37
Figure 7 Représentation schématique des mécanismes d'autorégulation de la protéine TDP-43. 39
Figure 8 Prévalence des mutations génétiques dans la SLA. 43
Figure 9 Evaluation de l'efficacité de transfection de cellules par Incucyte. 67
Figure 10 Principe de la microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence). 75
Figure 11 Principe de diffraction de la lumière et microscopie STORM. 77
Figure 12 Colocalisation de TDP-43 et de la péricentrine dans des fibroblastes contrôles. 93
Figure 13 Colocalisation de TDP-43 et de la péricentrine avec différents anticorps dirigés contre TDP-43. 94
Figure 14 Colocalisation de TDP-43 au sein du centrosome dans différentes lignées cellulaires. 95
Figure 15 Transfection des plasmides TDP-GFP et Centrine-RFP dans des cellules HeLa. 97
Figure 16 Présence de TDP-43 dans les centrosomes purifiés. 101
Figure 17 Western blot réalisés sur des cellules T-lymphoblastoïdes humaines KE-37 montrant un enrichissement de la protéine TDP-43 au sein des centrosomes purifiés. 102
Figure 18 Influence du cycle cellulaire et du réseau de microtubules sur la présence de TDP-43 au sein du centrosome.. 103
Figure 19 Schéma représentatif de la structure du centrosome. 105
Figure 20 Ultra-localisation de la protéine TDP-43 au sein du centrosome en microscopie TIRF. 107
Figure 21 Ultra-localisation de la protéine TDP-43 en microscopie super-résolutive STORM. 108
Figure 22 Protéines qui interagissent avec TDP-43 au sein du centrosome. 114
Figure 23 Induction d'agrégats cytoplasmiques de TDP-43. 115
Figure 24 Présence de TDP-43 au sein du centrosome dans des fibroblastes de peau issus de patients atteints de SLA. 117
Figure 25 Tentatives d'imagerie du centrosome de neurones de cortex frontal ou de motoneurones de la moelle épinière de patients atteint de SLA. 119
Figure 26 La protéine FUS semble également enrichie au centrosome. 121
Figure 27 Caractérisation biochimique des extraits de cerveau contrôle et de patients atteints de SLA. 133
Figure 28 Design expérimental et chronogramme de l'étude. 135
Figure 29 Représentation schématique du protocole d'induction in vitro et in vivo. 135
Figure 30 Evolution du poids corporel des souris sur 12 semaines en fonction des groupes. 139
Figure 31 Temps de latence avant l'échec du test du wire hang chez la souris sur 12 semaines. 140
Figure 32 Temps de latence avant la chute au test du rotarod en fonction des groupes sur 12 semaines. 141

Figure 33 Pourcentage de la distance parcourue et du temps passé dans le nouveau bras lors du test du labyrinthe en Y chez souris en fonction des groupes en semaine 10. 143

Table des tableaux

Tableau 1 Induction de la pathologie TDP-43 in vivo par un mécanisme prion-like dans différentes études. 57
Tableau 2 Caractéristiques cliniques des patients atteints de SLA et des témoins des échantillons biologiques utilisés. 61
Tableau 3 Références et dilutions des anticorps utilisés. 63
Tableau 4 Caractéristiques cliniques des patients atteints de SLA et des témoins des échantillons biologiques utilisés. 69
Tableau 5 Composition des tampons utilisés pour l'extraction de protéines insolubles. 71
Tableau 6 Référence des anticorps dirigés contre TDP-43 utilisés. 93
Tableau 7 ARNm centrosomaux interagissant avec TDP-43. 109
Tableau 8 Protéines centrosomales qui interagissent avec TDP-43. 113

Addendum

Au cours de ma thèse, j'ai été amenée à travailler et à participer à l'encadrement de plusieurs projets annexes portant sur l'imagerie cellulaire et les maladies neurodégénératives.

Le premier projet auquel j'ai partcipé est le travail de Mr Benoit Vovard, et porte sur l'exploration de la structure des inclusions d'α-synucléine dans l'atrophie multisystématisée (AMS) en utilisant la microscopie STORM. Les inclusions cytoplasmiques riches en α-synucléine hyperphosphorylée (p-αSyn) dans le système SNC sont un marqueur pathologique de l'AMS. Contrairement à d'autres synucléinopathies telles que la maladie de Parkinson et la démence à corps de Lewy, les inclusions observées dans l'AMS présentent des caractéristiques distinctes, y compris leur tropisme cellulaire (affectant à la fois les cellules neuronales et gliales) et leur réactivité argentophilique spécifique. Ces différences indiquent que l'AMS et d'autres synucléinopathies pourraient avoir des mécanismes d'agrégation d'α-synucléine distincts, ce qui est crucial pour comprendre la diversité clinique et pathologique de ces maladies. Les résultats ont révélé une structure interne dense et réticulée de l'α-synucléine dans les inclusions gliales (GCI) et neuronales (NCI), suggérant un mécanisme d'agrégation commun. Le processus d'agrégation semble commencer autour de la zone périnucléaire et croît à l'intérieur des cellules, avec une densité mitochondriale plus élevée observée dans les inclusions par rapport aux cellules non affectées, indiquant une possible implication des mitochondries dans ce processus (Annexe 4).

Le secon projet a été mené par Mr Jacques Bureau et porte sur les neuropathies optiques héréditaires, notamment l'atrophie optique dominante (AOD) et la neuropathie optique héréditaire de Leber (NOHL). Ces maladies génétiques se caractérisent par la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR), entraînant une perte de vision principalement due à un dysfonctionnement mitochondrial. Les mutations dans les gènes Opa1 et MT-Nd6, responsables respectivement de l'AOD et de la NOHL, provoquent des changements précoces dans les mitochondries de la rétine et du nerf optique prémylinéaire chez les modèles murins de ces maladies. Le projet avait pour but d'identifier ces changements mitochondriaux avant la perte neuronale, en analysant la distribution et l'ultrastructure des mitochondries dans des sections longitudinales du nerf optique (Annexe 5).

Annexes

Annexe 1 : Bodin A, Greibill L, Gouju J, Letournel F, Pozzi S, Julien JP, Renaud L, Bohl D, Millecamps S, Verny C, Cassereau J, Lenaers G, Chevrollier A, Tassin AM, Codron P. *Transactive response DNA-binding protein 43 is enriched at the centrosome in human cells.* **Brain**. 2023 Sep 1;146(9):3624-3633.

Annexe 2 : Scientific commentary refers to Bodin *et al*., 2023. Dykstra M, Barmada SJ. *The MLO-down on TDP-43.* **Brain.** 2023 Sep 1;146(9):3565-3567.

Annexe 3 : Codron P, Letournel F, Marty S, Renaud L, Bodin A, Duchesne M, Verny C, Lenaers G, Duyckaerts C, Julien JP, Cassereau J, Chevrollier A. *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) reveals the nanoscale organization of pathological aggregates in the human brain.* **Neuropathol Appl Neurobiol** 47, 127–142 (2021).

Annexe 4 : Vovard B, Bodin A, Gouju J, de Guilhem de Lataillade A, Derkinderen P, Etcharry-Bouyx F, Chauviré V, Guillet-Pichon V, Verny C, Letournel F, Lenaers G, Chevrollier A, Codron P. *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy Imaging of Multiple System Atrophy Inclusions Suggests Stepwise α-Synuclein Aggregation.* **Mov Disord.** 2024 Feb 15.

Annexe 5 : Bureau J, Manero F, Baris O, Bodin A, Verny C, Chevrollier A, Lenaers G, Cordon P. *Opa1 and MT-Nd6 mutations induce early mitochondrial changes in the retina and prelaminar optic nerve.* [Revisions mineures **Brain Communications** (Oxford Academics)

https://doi.org/10.1093/brain/awad228 BRAIN 2023: 146; 3624–3633 | 3624

BRAIN
ORIGINAL ARTICLE

Transactive response DNA-binding protein 43 is enriched at the centrosome in human cells

Alexia Bodin,[1,2,†] Logan Greibill,[3,†] Julien Gouju,[2] Franck Letournel,[2] Silvia Pozzi,[4,5] Jean-Pierre Julien,[4,5] Laurence Renaud,[6,7] Delphine Bohl,[8] Stéphanie Millecamps,[8] Christophe Verny,[1,9] Julien Cassereau,[1,9] Guy Lenaers,[1,9] Arnaud Chevrollier,[1] Anne-Marie Tassin[3,‡] and Philippe Codron[1,2,9,‡]

[†,‡]These authors contributed equally to this work.

See Megan Dykstra and Sami J. Barmada (https://doi.org/10.1093/brain/awad268) for a scientific commentary on this article.

The centrosome, as the main microtubule organizing centre, plays key roles in cell polarity, genome stability and ciliogenesis. The recent identification of ribosomes, RNA-binding proteins and transcripts at the centrosome suggests local protein synthesis. In this context, we hypothesized that TDP-43, a highly conserved RNA binding protein involved in the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration, could be enriched at this organelle. Using dedicated high magnification sub-diffraction microscopy on human cells, we discovered a novel localization of TDP-43 at the centrosome during all phases of the cell cycle.

These results were confirmed on purified centrosomes by western blot and immunofluorescence microscopy. In addition, the co-localization of TDP-43 and pericentrin suggested a pericentriolar enrichment of the protein, leading us to hypothesize that TDP-43 might interact with local mRNAs and proteins. Supporting this hypothesis, we found four conserved centrosomal mRNAs and 16 centrosomal proteins identified as direct TDP-43 interactors. More strikingly, all the 16 proteins are implicated in the pathophysiology of TDP-43 proteinopathies, suggesting that TDP-43 dysfunction in this organelle contributes to neurodegeneration.

This first description of TDP-43 centrosomal enrichment paves the way for a more comprehensive understanding of TDP-43 physiology and pathology.

1 Univ Angers, Equipe MitoLab, Unité MitoVasc, Inserm U1083, CNRS 6015, SFR ICAT, 49100 Angers, France
2 Neurobiology and neuropathology, University-Hospital of Angers, 49933 Angers, France
3 Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris Sud, Université Paris-Saclay, 91190 Gif sur Yvette, France
4 Department of Psychiatry and Neuroscience, University of Laval, Québec City, Qc G1V 0A6, Canada
5 CERVO Brain Research Centre, Québec, Qc G1E 1T2, Canada
6 Département de Neurosciences, Université de Montréal, Montréal, Qc H3C 3J7, Canada
7 Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal, Montréal, Qc H3C 3J7, Canada
8 Sorbonne Université, Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, Inserm, CNRS, APHP, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, 75013 Paris, France
9 Department of Neurology, Amyotrophic Lateral Sclerosis Center, University-Hospital of Angers, 49933 Angers, France

Received December 08, 2022. Revised May 14, 2023. Accepted June 03, 2023. Advance access publication July 6, 2023
© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Correspondence to: Philippe Codron
Service de neurologie, CHU d'Angers
4 rue Larrey, 49933 Angers, France
E-mail: Philippe.codron@chu-angers.fr

Keywords: TDP-43; centrosome; pericentriolar matrix; ALS; FTLD

Introduction

Transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43), encoded by the *TARDBP* gene, is a highly conserved and ubiquitously expressed RNA-binding protein (RBP) predominantly localized in the nucleus of cells under physiological conditions. The protein modulates RNA metabolism through its N-terminal RNA recognition motifs and interacts with multiple protein partners through its C-terminal end. TDP-43 has received increasing attention since its identification as one of the main actors in the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), frontotemporal lobar degeneration (FTLD) and limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy (LATE). Indeed, cytosolic translocation and aggregation of phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 in degenerating neurons is a pathologicalal hallmark of these diseases,[1–3] and *TARDBP* mutations are responsible for familial forms of ALS and FTLD.[4,5] However, the precise mechanisms by which TDP-43 pathology contributes to neurodegeneration remain unclear.

In recent years, interest has been growing in the presence of RBPs at the centrosome of cells since mRNAs and ribosomes have been identified within this organelle.[6–8] The centrosome is known to be the main microtubule organizing centre in human cells, controlling cell shape, polarity, trafficking, motility, ciliogenesis and cell cycle. RBPs transport RNAs to the pericentriolar matrix (PCM) and mediate their local translation.[6] Since TDP-43 is an RBP that belongs to the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) family, we hypothesized that it might be localized at the centrosome. To this end, we performed dedicated sub-diffraction imaging and centrosome purification techniques in cultured cells to detect TDP-43 in this organelle.

Materials and methods

Cell culture

Primary skin fibroblasts were obtained from healthy subjects and patients with sporadic[9,10] and familial ALS (Supplementary Table 1). Fibroblasts carrying the *TARDBP*^{G348C} mutation were obtained from the Erasmus Hospital (Brussels, Belgium) with informed consent. Primary skin fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM): nutrient mixture F-12 in the presence of 10% fetal calf serum (FCS), 1% uridine and 1% pyruvate. HeLa (human cervical carcinoma), U-87 MG (human glioblastoma cancer) and SH-SY5Y (human neuroblastoma cancer) cell lines were grown in high glucose Dulbecco's minimum essential medium, supplemented with 10% FCS and 1% glutamine. Human lymphoblastic KE-37 cells were grown in RPMI and DMEM/F12 medium supplemented with 10% FCS in the presence of penicillin-streptomycin (1000 units/ml and 1000 µg/ml, respectively HyClone). All cell lines were cultured in T25 flasks and maintained in a humidified atmosphere (95% air, 5% CO2) at 37°C. Experiments were conducted on cells with similar passage numbers, ranging from 6 to 20, to avoid artefacts due to senescence. If needed, cells were treated with nocodazole (5 mg/ml) prior to fixation.

Immunofixation

Approximately 30 000 cells were seeded into 22 mm borosilicate glass coverslips (Dutscher D.) in a humidified atmosphere (95% air, 5% CO_2) at 37°C for at least 24 h. Cells were then fixed with cold methanol at −20°C for 6 min. After three washes in PBS, cells were blocked in 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 h at room temperature. Cells were then washed and incubated overnight at 4°C with primary antibodies: rabbit anti-TDP-43 polyclonal antibody (10782-2-AP, 1:1000), rabbit recombinant anti-TDP-43 monoclonal antibody (ab109535, 1:750), rabbit anti-TDP-43 (C-terminal) polyclonal antibody (12892-1-AP, 1:1500), mouse anti-TDP-43 (human specific) monoclonal antibody (60019-2-Ig, 1:50 000), mouse anti-TDP-43 monoclonal antibody (ab57105, 1:6000), mouse recombinant anti-pericentrin monoclonal antibody (ab28144, 1:5000), mouse anti-centrin monoclonal antibody (ZMS1054, 1:5000), mouse anti-γ-tubulin monoclonal antibody (T5326, 1:5000), rabbit anti-γ-tubulin polyclonal antibody,[11] mouse anti-polyglutamylated tubulin (GT335) monoclonal antibody (C. Janke, gift),[12] CoraLite®488 rabbit anti-CEP164 polyclonal antibody (CL488-22227, 1:1000), mouse anti-alpha-tubulin monoclonal antibody (T9026, 1:500), mouse anti-ataxin 2 monoclonal antibody (68316-1-Ig, 1:100), mouse anti-p150 (Dynactin) monoclonal antibody (610473, 1:1000), mouse anti-VCP monoclonal antibody (60316-1-Ig, 1:100), mouse anti-cyclophilin A monoclonal antibody (PPIA) (67880-1-Ig, 1:1000), rabbit anti-CHMP2B polyclonal antibody (12527-1-AP, 1:50), rabbit anti-Cyclin F polyclonal antibody (ab203117, 1:100) and rabbit anti-PFN1 polyclonal antibody (P7749, 1:100). Finally, cells were washed in PBS and incubated with Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Invitrogen, 1:2000) for 90 min at room temperature. Nuclei were counterstained with Hoechst 33 342 (Thermo Fisher Scientific) 1:10 000 in PBS. References of reagents and antibodies are listed in Supplementary Table 2.

Total internal reflection fluorescence and stochastic optical reconstruction microscopy

To perform sub-diffraction imaging, the cavity of a clean single depression slide (Paul Marienfeld) was filled with 50 µl of PBS for total internal reflection fluorescence (TIRF) and switching buffer (Abbelight) for stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), and covered the cells with the coverslip facing downward. Excess buffer was carefully wiped away, and the coverslip was sealed with a two-component silicone-glue (Twinsil®, Picodent). After a 10 min drying, the device was placed on the stage of an inverted motorized microscope NIKON ECLIPSE Ti-E (Nikon Instruments Europe) equipped with a CFI SR APO TIRF 100× ON1.49 objective, a Perfect Focus System, a TIRF ILas2 module (Roper Scientific) and a single-photon sensitive camera Evolve 128TM EMCCD 512 × 512 imaging array, 16 × 16 µm pixels (Photometrics). Acquisitions were performed at 25°C in a dark heating chamber (Okolab NA). Multichannel 2D- and 3D-TIRF microscopy was performed using Metamorph 7.7 software (Molecular Devices, CA, USA). For complementary STORM imaging, the

excitation power of either the 647 nm or 568 laser line was then increased (~50 to 100 mW before the objective lens) to induce fluorophore blinking. The em-gain of the camera was set to high amplification to optimize the signal-to-noise ratio. Images were acquired with an integration time of 30 ms per frame. The total acquisition time points for each sequence were adapted to the labelling density (5000 to 10 000 frames). The centre position of the fluorophores was determined by fitting of 2D Gaussian function with the parameters of microscope's point spread function (PSF) using WaveTracer software (Roper Scientific). Imaris 8.0 (Bitplane, Zurich, Switzerland) was used for image processing and analysis (length and volume measurements, Pearson coefficient).[13]

Cellular fractionation

Triton X-100 soluble and insoluble protein fractions were prepared as follows: KE37cells were washed in PBS and lysed in a PHEM buffer (45 mM PIPES, 45 mM HEPES, 10 mM EGTA, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride adjusted at pH 6.8) containing 1% Triton X-100 and protease inhibitors. Insoluble proteins were pelleted at 300*g*, solubilized in SDS-PAGE sample buffer (Laemmli, 1970), and then boiled for 5 min. Soluble proteins were precipitated with 9 vol of methanol at 4°C for 1 h and pelleted. The pellet was resuspended in the same volume of sample buffer that was used for the insoluble proteins.

Centrosome purification

Centrosomes were isolated from KE-37 cells as described previously.[14] Briefly, cells were pretreated for 1 h with nocodazole (2×10^{-7} M) and cytochalasin D (2×10^{-6} M). Cells were then washed in PBS and resuspended in 8% sucrose in 10× diluted PBS before cell lysis in lysis buffer (1 mM HEPES, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.5% NP40, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride and antiproteases). After centrifugation at 4000 rpm, the supernatant was filtered through a nylon mesh, readjusted to 10 mM HEPES and treated with DNAse and benzonase. Concentrated centrosomes were overlaid on a discontinuous sucrose gradient (70%, 50% and 40%) in a SW32Ti tube and centrifuged at 25 000 rpm for 1 h 15 min. Fractions were then collected and analysed for their purity using an anti-γ-tubulin rabbit polyclonal antibody,[11] a mouse monoclonal antibody GTR453 (a gift from M. Bornens[15]) and DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole, D8417) to stain DNA contamination.

Western blotting of purified centrosomes

Triton X-100-soluble and insoluble fractions as well as centrosomal fraction were run on an SDS-PAGE gel of 10% acrylamide/bis-acrylamide. Gels were transferred on nitrocellulose membranes with a semi-dry transfer device (Bio-Rad). Membranes were blotted with primary antibodies: rabbit anti-TDP-43 polyclonal antibody (10782-2-AP, 1:5000), rabbit anti-TDP-43 (C-terminal) polyclonal antibody (12892-1-AP, 1:1000), mouse anti-TDP-43 (human specific) monoclonal antibody (60019-2-Ig, 1:1000), mouse anti-γ-tubulin monoclonal antibody (T5326, 1:5000), and mouse anti-lamin B1 monoclonal antibody (ab8982, 1:1000). Membranes were then washed in PBS and incubated with peroxydase conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies (Sigma), and finally revealed and imaged by chemiluminescence using the ChemiDoc (Bio-Rad). Quantification of luminescence intensity were performed with Image Lab software (Bio-Rad). References of reagents and antibodies are detailed in Supplementary Table 2.

Immunofluorescence microscopy of purified centrosomes

Isolated centrosomes were fixed with methanol for 6 min at −20°C and immune-stained with primary antibodies: mouse anti-TDP-43 (human specific) monoclonal antibody (60019-2-Ig, 1:2000), and rabbit anti-γ-tubulin polyclonal antibody.[11] Finally, centrosomes were washed in PBS and incubated with Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Invitrogen, 1:1000) for 90 min at room temperature. Immunofluorescence microscopy was performed with an inverted motorized microscope (TCS SP8, Leica Microsystems) equipped with a UV diode (line 405) and two laser diodes (lines 488 and 552) for excitation, an oil immersion magnification 63×/numerical aperture 1.4 Plan-Apochromat CS2 objective lens and two PMT detectors. LAS X software (Leica Microsystems) was used for acquisition. Z-stacks were generated from optical sections taken at 0.3 µm intervals. Image stacks were processed using ImageJ software. References of reagents and antibodies are detailed in Supplementary Table 2.

Ethical approval

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee West II (DC-2011-146) and the Ethics Committee Île de France II (DC 2011-534). The study protocol was declared to the French commission for information technology and civil liberties (declaration number ar19-0012v0).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using PRISM software version 5.0 for Windows (GraphPad, La Jolla, CA). Comparisons of means were performed using the Mann-Whitney test for two-group analysis and the Kruskal-Wallis test for multiple-group analysis. Differences were considered significant at $P < 0.01$.

Results

TDP-43 is enriched at the centrosome

We first attempted to detect the presence of TDP-43 at the centrosome of cultured cells using TIRF microscopy at high magnification. Human skin fibroblasts (hSF), HeLa, U-87 MG and SH-SY5Y cells were fixed with cold methanol and immune-stained with antibodies against TDP-43 (10782-2-AP) and pericentrin, a centrosome marker. A co-localization was observed in all cells when the centrosome and the nucleus did not overlap, indicating a centrosomal enrichment of TDP-43 (Fig. 1A and B). Similar results were obtained with four other antibodies against distinct epitopes of TDP-43 (ab109535, 12892-1-AP, 60019-2 and ab57105, Supplementary Fig. 1A). The co-localization persisted after microtubule disruption with nocodazole (Fig. 1C), suggesting that TDP-43 does not require an active microtubule-dependent mechanism to be maintained at the centrosome, as for other specific centrosomal proteins.[16,17] Indeed, centrosomes retain their distinctive morphology and their structural elements after microtubule depolymerization, whereas centrosomal microtubule-associated components tend to disperse.[16,17] Furthermore, this result indicates that the detected signal was not aggresomal since pericentriolar aggresome formation requires an intact microtubule network.[18,19]

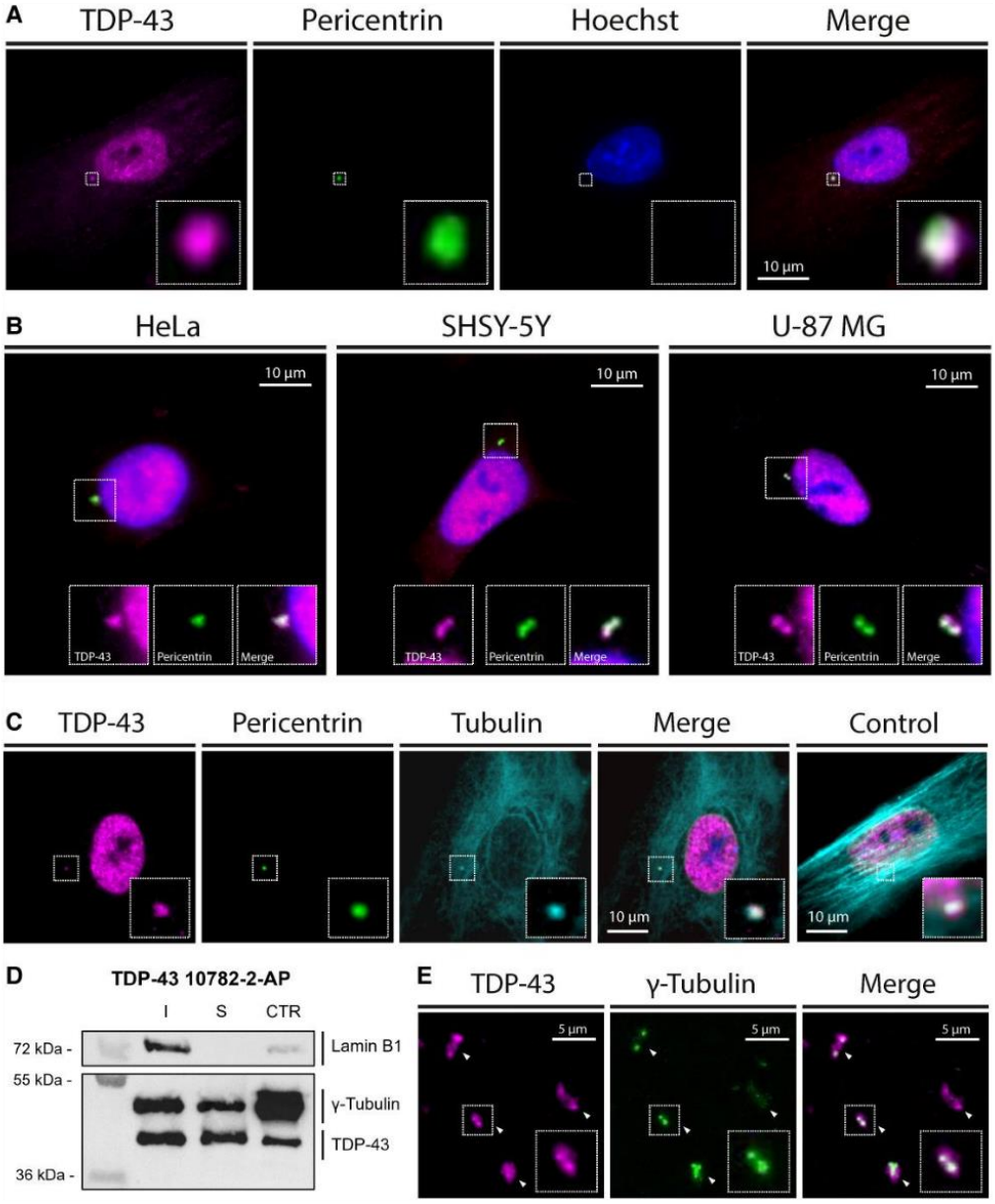


Figure 1 Centrosomal enrichment of TDP-43 in human cells. (**A** and **B**) Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy images of fixed healthy human skin fibroblasts (**A**), and pseudo-neuronal HeLa, U-87 MG and SH-SY5Y cells (**B**) immune-stained with antibodies against TDP-43 (10782-2-AP) and pericentrin, showing a co-localization of the two signals when merged. (**C**) Similar results were obtained in human skin fibroblasts after a 2-h treatment with nocodazole (5 mg/ml) inducing microtubule depolymerization. (**D**) Western blot performed on purified centrosome fractions from human T-lymphoblastoid KE-37 cells using primary antibodies against TDP-43 (10782-2-AP), γ-Tubulin and Lamin B1, showing an enrichment of TDP-43 at the centrosome. I = insoluble fraction; S = soluble fraction; CTR = centrosome fraction. (**E**) Immunofluorescence microscopy performed on purified centrosomes (arrowheads) fixed and immune-stained for TDP-43 (60019-2-Ig) and γ-Tubulin showing a co-localization of the two signals.

To confirm these results, we evaluated the presence of TDP-43 in isolated centrosomes. Western blots performed on purified centrosome fractions from KE-37 cells revealed a 43 kDa band when using a TDP-43 antibody (10782-2-AP) (Fig. 1D). Similar results were obtained using two other TDP-43 antibodies (12892-1-AP and 60019-2-Ig, Supplementary Fig. 1B and C). Since TDP-43 is mostly found in the nucleus, the nuclear fraction of the centrosome preparations was assessed by blotting Lamin B1 on the membranes. TDP-43 was more enriched in the centrosomal fractions than Lamin B1 compared to the insoluble fractions (Supplementary Fig. 1D), indicating minor nuclear contamination and confirming the presence of TDP-43 at the centrosome. Finally, fluorescence microscopy was performed on purified centrosomes immune-stained with antibodies against TDP-43 (60019-2-Ig) and γ-tubulin. All isolated centrosomes showed TDP-43 labelling (Fig. 1E). Together,

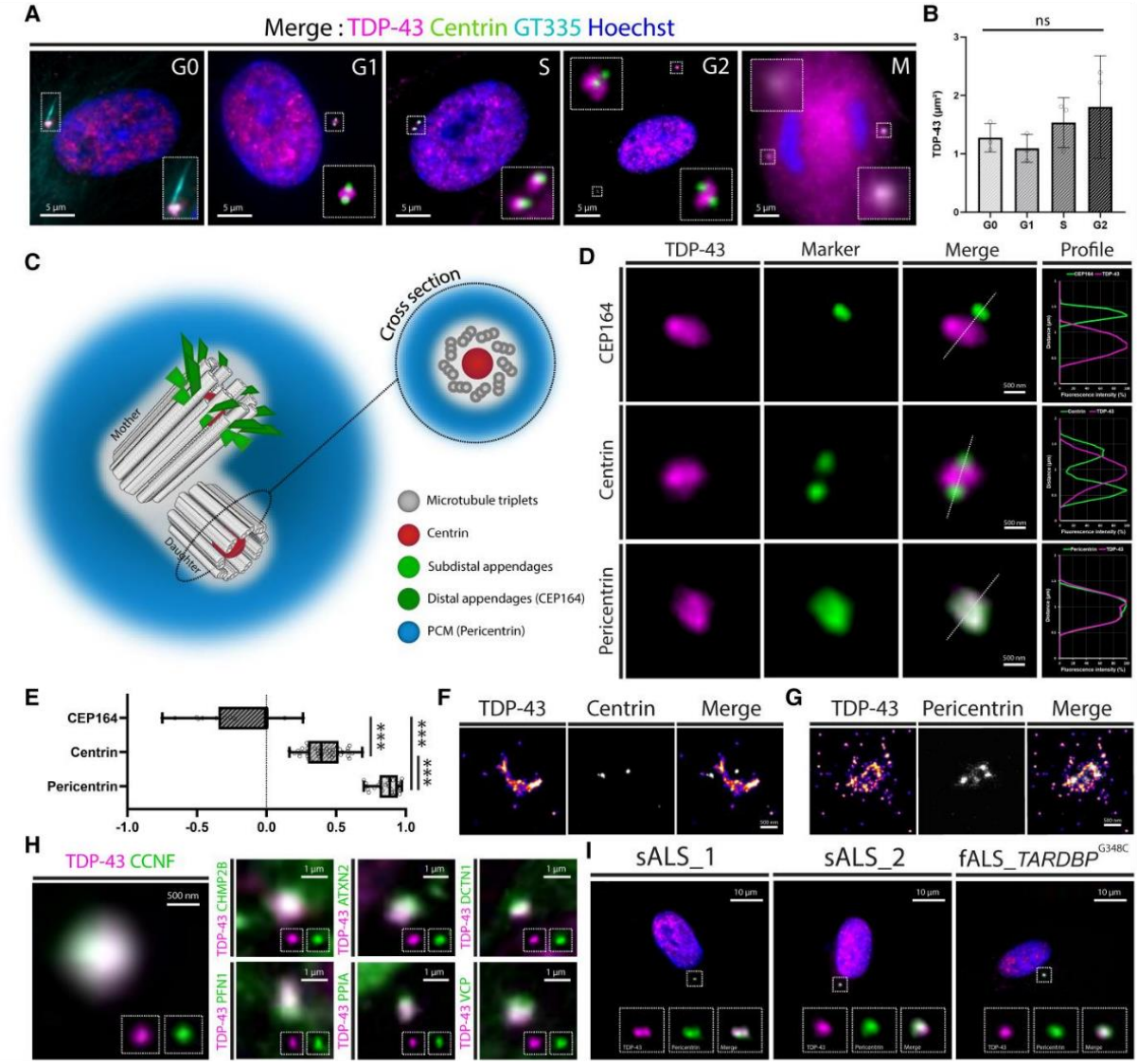


Figure 2 Cell cycle independent pericentriolar enrichment of TDP-43 in physiological and pathological conditions. (**A**) Merged images of TIRF microscopy performed on human skin fibroblasts fixed and immune-stained for TDP-43, pericentrin and GT335, showing the presence of TDP-43 at the centrosome in all phases of the cell cycle, including mitosis. (**B**) Surface area of the TDP-43 centrosomal fraction (μm^2) measured at each phase of the cell cycle (ns = not significant). (**C**) Schematic representation of the different parts of the centrosome, with corresponding protein markers. (**D**) High magnification TIRF microscopy images of the centrosome of human skin fibroblasts immune-stained with antibodies against TDP-43, centrin, CEP-164 and pericentrin. The co-localization profiles (fluorescence intensity of each channel) shown on the right and the Pearson coefficients of co-localization (**E**) indicate a pericentriolar enrichment of TDP-43 ($P < 0.001$). (**F** and **G**) Super resolution stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) images of human skin fibroblasts immune-stained with antibodies against TDP-43 and centrin (**F**) or pericentrin (**G**). (**H**) TIRF microscopy images of TDP-43 and centrosomal TDP-43 partners associated to familial ALS/FTLD in fixed healthy human skin fibroblasts (magnification at the centrosome) disclosing a co-localization. (**I**) TIRF microscopy images of fixed human skin fibroblasts derived from sporadic and familial ALS (fALS) patients immune-stained with antibodies against TDP-43 and pericentrin, showing a co-localization of the two signals.

these results demonstrate a centrosomal localization of TDP-43 in human cell lines.

TDP-43 centrosomal enrichment persists over time

To further assess whether the centrosomal localization of TDP-43 varies over the cell cycle, we performed high magnification TIRF in cultured hSF. Each phase of the cell cycle was defined by the shape and position of the centrioles using a primary antibody against centrin, a centriole marker. The G0 phase was identified by immunostaining for polyglutamylated tubulin (GT335), a primary cilium marker. TDP-43 remained enriched at the centrosome in all phases of the cell cycle, including mitosis (Fig. 2A), further confirming that the centrosomal localization of TDP-43 persists in cells over time. Furthermore, we noticed that the surface area of TDP-43 centrosomal fraction tended to expand during the cell cycle (Fig. 2B), suggesting that the protein is part of the PCM.[20]

Table 1 Centrosomal mRNAs interacting with TDP-43

mRNA	Protein	Centrosomal localization	TDP-43 interaction
ASPM	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein	Safieddine *et al.*,[7] Chouaib *et al.*[8]	Lang *et al.*,[21] Van Nostrand *et al.*[22]
NUMA1	Nuclear mitotic apparatus prot1	Safieddine *et al.*,[7] Chouaib *et al.*[8]	Lang *et al.*,[21] Van Nostrand *et al.*[22]
PCNT	Pericentrin	Safieddine *et al.*[7]	Lang *et al.*,[21] Van Nostrand *et al.*[22]
CEP350	Centrosomal protein 350	Safieddine *et al.*[7]	Lang *et al.*,[21] Van Nostrand *et al.*[22]

Table 2 Centrosomal proteins interacting with TDP-43

Gene	Protein	Centrosomal localization	TDP-43 interaction	Neurodegeneration
ALSIN	Alsin	Millecamps *et al.*[26]	Not reported	Yang *et al.*,[27] Hadano *et al.*[28]
ATXN2	Ataxin 2	Gnazzo *et al.*,[29] Stubenvoll *et al.*[30]	Elden *et al.*[31]	Elden *et al.*,[31] Hart *et al.*[32]
BRCA1	Breast cancer 1, early onset	Hsu and White[33]	Hill *et al.*[34]	Noristani *et al.*[35]
CCNF	Cyclin F	D'Angiolella *et al.*[36]	Rayner *et al.*[37]	Williams *et al.*[38]
CDC7	Cell division cycle 7-related protein kinase	Müller-Taubenberger *et al.*[39]	Liachko *et al.*[40]	Liachko *et al.*,[40] Vaca *et al.*[41]
CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2B	Ott *et al.*[42]	Deng *et al.*[43]	Skibinski *et al.*,[44] Parkinson *et al.*[45]
CSNK1D	Casein kinase I isoform delta	Greer *et al.*[46]	Kametani *et al.*[47]	Nonaka *et al.*,[48] Alquezar *et al.*[49]
CYLD	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD	Eguether *et al.*[50]	Not reported	Dobson-Stone *et al.*[51]
DCTN1	Dynactin 1	Kodani *et al.*,[52] Zhapparova *et al.*[53]	Deshimaru *et al.*[54]	Konno *et al.*[55]
DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3, X-linked	Chen *et al.*[56]	Freibaum *et al.*[57]	Cheng *et al.*[58]
ELAVL1	ELAV-like protein 1/Hu-antigen R (HuR)	Filippova *et al.*[59]	Lu *et al.*[60]	Matsye *et al.*[61]
EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1	Leemann-Zakaryan *et al.*[62]	Chi *et al.*[63]	Couthouis *et al.*[64]
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3β	Yoshino and Ishioka[65]	Moujalled *et al.*[66]	Choi *et al.*[67]
HDAC6	Histone deacetylase 6	Ran *et al.*[68]	Hebron *et al.*[69]	Fazal *et al.*[70]
NEK1	NIMA-related kinase 1	White and Quarmby[71]	Not reported	Brenner *et al.*[72]
PFN1	Profilin 1	Nejedlá *et al.*[73]	Tanaka *et al.*[74]	Wu *et al.*[75]
PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase A or cyclophilin A	Bannon *et al.*[76]	Lauranzano *et al.*[77]	Pasetto *et al.*[78]
TBK1	TANK-binding kinase 1	Pillai *et al.*[79]	Not reported	Freischmidt *et al.*,[80] Cirulli *et al.*[81]
TTBK1/2	Tau-tubulin kinase 1/2	Čajánekand Nigg[82]	Liachko *et al.*[83]	Taylor *et al.*[84]
VCP	Valosin containing protein	Balestra *et al.*,[85] Madeo *et al.*[86]	Freibaum *et al.*[57]	Watts *et al.*[87]

ALS/FTLD causative genes are highlighted in bold.

TDP-43 is located at the pericentriolar matrix

To define the precise localization of TDP-43 within the centrosome, we performed high magnification TIRF microscopy on hSF immune-stained with antibodies against TDP-43 and specific markers of three distinct parts of the centrosome: centrin (centrioles), CEP-164 (distal appendage) and pericentrin (PCM) (Fig. 2C). Co-localization profiles and Pearson coefficients ($P < 0.0001$) confirmed the pericentriolar localization of TDP-43 within the centrosome (Fig. 2D and E). Similar findings were obtained with super-resolutive STORM (Fig. 2F and G), supporting that TDP-43 is enriched at the PCM of the centrosome in human cells.

TDP-43 interacts with centrosomal RNAs and proteins

The pericentriolar enrichment of TDP-43 prompted us to evaluate whether the protein interacts with local mRNAs and proteins, as reported for other centrosomal RBPs.[6–8] Interestingly, we found that four (PCNT, NUMA1, ASPM and CEP350) of the 11 conserved mRNAs recently detected at the centrosome[7,8] were identified as TDP-43 targets by crosslinking and immunoprecipitation[21,22] (Table 1). To identify centrosomal protein partners of TDP-43, we listed 518 proteins that directly interact with TDP-43[23–25] and found that 16 of them are enriched at the centrosome (Table 2). Remarkably, 7 of these 16 proteins are encoded by genes whose variants are responsible for familial forms of ALS/FTLD (*ATXN2*, *CCNF*, *CHMP2B*, *DCTN1*, *PFN1*, *PPIA* and *VCP*) and three of them are kinases that phosphorylate TDP-43 and are associated with neurodegeneration (CDC7, CSNK1δ and TTBK1/2). The remaining six centrosomal TDP-43 interactors (BRCA1, DDX3X, ELAVL1/HuR, EWSR1, GSK3β and HDAC6) are also involved in neurodegenerative pathways in ALS/FTLD. Finally, we found that four proteins encoded by ALS/FTLD causative genes (*ALSIN*, *CYLD*, *NEK1* and *TBK1*) are also enriched at the centrosome, but their direct interaction with TDP-43 has not yet been reported (Table 2). To further investigate the interaction of TDP-43 with the seven centrosomal proteins associated with familial ALS/FTLD and known to be TDP-43 partners (ATXN2, CCNF, CHMP2B, DCTN1, PFN1, PPIA and VCP), we performed high magnification TIRF microscopy on hSF. We disclosed a co-localization of TDP-43 with all the studied proteins at the PCM with similar distribution patterns (Fig. 2H). Taken together, these results support

a role for TDP-43 at the PCM through local RNA binding and protein interactions and suggest that centrosomal dysfunction participates to TDP-43-related neurodegeneration.

Finally, we performed immune-fluorescence microscopy in hSF derived from a patient with familial ALS (*TARDBP*^{G348C}, Supplementary Table 1) to assess mutant TDP-43 dynamics at the centrosome. In these cells, TDP-43 was still associated with the centrosome (Fig. 2I), demonstrating that the expression of the pathogenic TDP-43 mutation does not affect its localization to the organelle. Similar results were observed in hSF derived from patients with sporadic ALS (Fig. 2I and Supplementary Table 1).

Discussion

Here, we found that TDP-43 is physiologically enriched at the centrosome in cells. This TDP-43 centrosomal localization might have been unnoticed so far as it can only be detected by dedicated highly resolutive techniques. More specifically, our results evidence that TDP-43 is localized in the pericentriolar matrix, regardless of the cell-cycle, where it interacts with centrosomal specific mRNAs and proteins. This novel centrosomal localization of TDP-43 raises questions about the functions of the protein in this organelle.

The centrosome is the main microtubule organizing centre in human cells, thereby controlling cell shape, polarity, trafficking, motility, ciliogenesis and cell cycle. It can be assumed that the centrosomal fraction of TDP-43 is involved in these processes. By extension, the embryonic lethality and neurodevelopmental impairments caused by loss of *TARDBP* expression in animal models[88–91] might be partly due to centrosome dysfunction, given the role of this organelle in embryogenesis and cell proliferation.

Although the precise role of TDP-43 at the PCM remains to be defined, the protein may be involved in the transport and translation of RNAs and interact with other proteins of the PCM, as for other centrosomal RBPs.[6] Supporting this hypothesis, we found that 4 of the 11 RNAs recently detected at the centrosome were previously identified as TDP-43 targets, and that 16 TDP-43 interactors are also centrosomal proteins. More strikingly, all of these 16 proteins are involved in the pathophysiology of TDP-43 proteinopathies, seven of which are encoded by genes that cause familial ALS/FTLD, suggesting that local disruption participates to neurodegeneration in these diseases. Finally, we showed that TDP-43 was still associated with the centrosome in *TARDBP*^{G348C} heterozygous hSF cells. Since this signal could originate from the restricted presence of the wild-type TDP-43, this result does not allow to prejudge whether the mutant TDP-43 is no longer associated to the centrosome with a possible local loss-of-function, or whether it is still targeted to the organelle with both toxic gain- and loss-of-function.

Taken together, our findings demonstrate that TDP-43 plays a role at the centrosome through RNA binding and protein interactions, and that centrosomal dysfunction could participate in TDP-43 related neurodegeneration. This first description of TDP-43 centrosomal localization in cells paves the way for a more comprehensive understanding of TDP-43 physiology and pathology.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Paul Guichard, University of Geneva, Section of Biology, Department of Molecular and Cellular Biology, Geneva, Switzerland for contribution to Fig. 2C.

Funding

This work was supported by the Conseil National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), the European Regional Development Fund (ERDF), the Association pour la recherche sur la SLA (ARSLA) (2021 scientific grant), the University Hospital of Angers (grant 21_0266_1), and the University of Angers (PhD research fellowship to A.B.).

Competing interests

The authors report no competing interest.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

1. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, *et al*. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351:602-611.
2. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, *et al*. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006;314:130-133.
3. Nelson PT, Dickson DW, Trojanowski JQ, *et al*. Limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy (LATE): Consensus working group report. *Brain*. 2019;142:1503-1527.
4. Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, *et al*. TARDBP Mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2008;40:572-574.
5. Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, *et al*. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2008;319:1668-1672.
6. Zein-Sabatto H, Lerit DA. The identification and functional analysis of mRNA localizing to centrosomes. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:782802.
7. Safieddine A, Coleno E, Salloum S, *et al*. A choreography of centrosomal mRNAs reveals a conserved localization mechanism involving active polysome transport. *Nat Commun*. 2021;12:1352.
8. Chouaib R, Safieddine A, Pichon X, *et al*. A dual protein-mRNA localization screen reveals compartmentalized translation and widespread co-translational RNA targeting. *Dev Cell*. 2020;54:773-791.e5.
9. Codron P, Cassereau J, Vourc'h P, *et al*. Primary fibroblasts derived from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients do not show ALS cytological lesions. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2018;19(5–6):446-456.
10. Journe-Mallet I, Gouju J, Etcharry-Bouyx F, *et al*. Design and application of a customizable relational DataBase to assess clinicopathological correlations and concomitant pathology in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol*. 2023;33:e13138.

11. Tassin AM, Celati C, Moudjou M, Bornens M. Characterization of the human homologue of the yeast spc98p and its association with gamma-tubulin. *J Cell Biol*. 1998;141:689-701.
12. Wolff A, de Néchaud B, Chillet D, *et al*. Distribution of glutamylated alpha and beta-tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *Eur J Cell Biol*. 1992;59:425-432.
13. Codron P, Letournel F, Marty S, *et al*. STochastic optical reconstruction microscopy (STORM) reveals the nanoscale organization of pathological aggregates in human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2021;47:127-142.
14. Gogendeau D, Guichard P, Tassin AM. Purification of centrosomes from mammalian cell lines. *Methods Cell Biol*. 2015;129:171-189.
15. Bailly E, Dorée M, Nurse P, Bornens M. P34cdc2 is located in both nucleus and cytoplasm; part is centrosomally associated at G2/M and enters vesicles at anaphase. *EMBO J*. 1989;8:3985-3995.
16. Stearns T, Evans L, Kirschner M. Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell*. 1991;65:825-836.
17. Doxsey SJ, Stein P, Evans L, Calarco PD, Kirschner M. Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell*. 1994;76:639-650.
18. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: A cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*. 1998;143:1883-1898.
19. Prosser SL, Tkach J, Gheiratmand L, *et al*. Aggresome assembly at the centrosome is driven by CP110-CEP97-CEP290 and centriolar satellites. *Nat Cell Biol*. 2022;24:483-496.
20. Mennella V, Keszthelyi B, McDonald KL, *et al*. Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy reveals a domain of the centrosome critical for pericentriolar material organization. *Nat Cell Biol*. 2012;14:1159-1168.
21. Lang B, Armaos A, Tartaglia GG. RNAct: Protein-RNA interaction predictions for model organisms with supporting experimental data. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D601-D606.
22. Van Nostrand EL, Pratt GA, Shishkin AA, *et al*. Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP). *Nat Methods*. 2016;13:508-514.
23. Oughtred R, Rust J, Chang C, *et al*. The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Sci*. 2021;30:187-200.
24. UniProt Consortium. Uniprot: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D480-D489.
25. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, *et al*. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347:1260419.
26. Millecamps S, Gentil BJ, Gros-Louis F, Rouleau G, Julien JP. Alsin is partially associated with centrosome in human cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1745:84-100.
27. Yang Y, Hentati A, Deng HX, *et al*. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2001;29:160-165.
28. Hadano S, Hand CK, Osuga H, *et al*. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet*. 2001;29:166-173.
29. Gnazzo MM, Uhlemann EME, Villarreal AR, Shirayama M, Dominguez EG, Skop AR. The RNA-binding protein ATX-2 regulates cytokinesis through PAR-5 and ZEN-4. *Mol Biol Cell*. 2016;27:3052-3064.
30. Stubenvoll MD, Medley JC, Irwin M, Song MH. ATX-2, the C. elegans ortholog of human ataxin-2, regulates centrosome size and microtubule dynamics. *PLoS Genet*. 2016;12:e1006370.
31. Elden AC, Kim HJ, Hart MP, *et al*. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*. 2010;466:1069-1075.
32. Hart MP, Gitler AD. ALS-Associated Ataxin 2 PolyQ expansions enhance stress-induced caspase 3 activation and increase TDP-43 pathological modifications. *J Neurosci*. 2012;32:9133-9142.
33. Hsu LC, White RL. BRCA1 Is associated with the centrosome during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:12983-12988.
34. Hill SJ, Mordes DA, Cameron LA, *et al*. Two familial ALS proteins function in prevention/repair of transcription-associated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E7701-E7709.
35. Noristani HN, Sabourin JC, Gerber YN, *et al*. Brca1 is expressed in human microglia and is dysregulated in human and animal model of ALS. *Mol Neurodegeneration*. 2015;10:34.
36. D'Angiolella V, Donato V, Vijayakumar S, *et al*. SCFCyclin F controls centrosome homeostasis and mitotic fidelity through CP110 degradation. *Nature*. 2010;466:138-142.
37. Rayner SL, Yang S, Farrawell NE, *et al*. TDP-43 is a ubiquitylation substrate of the SCFcyclin F complex. *Neurobiol Dis*. 2022;167:105673.
38. Williams KL, Topp S, Yang S, *et al*. CCNF Mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Nat Commun*. 2016;7:11253.
39. Müller-Taubenberger A, Ishikawa-Ankerhold HC, Kastner PM, Burghardt E, Gerisch G. The STE group kinase SepA controls cleavage furrow formation in Dictyostelium. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2009;66:929-939.
40. Liachko NF, McMillan PJ, Guthrie CR, Bird TD, Leverenz JB, Kraemer BC. CDC7 Inhibition blocks pathological TDP-43 phosphorylation and neurodegeneration: CDC7 and TDP-43 pathology. *Ann Neurol*. 2013;74:39-52.
41. Vaca G, Martinez-Gonzalez L, Fernandez A, *et al*. Therapeutic potential of novel cell division cycle kinase 7 inhibitors on TDP-43-related pathogenesis such as Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neurochem*. 2021;156:379-390.
42. Ott C, Nachmias D, Adar S, *et al*. VPS4 Is a dynamic component of the centrosome that regulates centrosome localization of γ-tubulin, centriolar satellite stability and ciliogenesis. *Sci Rep*. 2018;8:3353.
43. Deng X, Sun X, Yue W, *et al*. CHMP2B Regulates TDP-43 phosphorylation and cytotoxicity independent of autophagy via CK1. *J Cell Biol*. 2022;221:e202103033.
44. Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, *et al*. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet*. 2005;37:806-808.
45. Parkinson N, Ince PG, Smith MO, *et al*. ALS Phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology*. 2006;67:1074-1077.
46. Greer YE, Westlake CJ, Gao B, *et al*. Casein kinase 1δ functions at the centrosome and Golgi to promote ciliogenesis. *Mol Biol Cell*. 2014;25:1629-1640.
47. Kametani F, Nonaka T, Suzuki T, *et al*. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;382:405-409.
48. Nonaka T, Suzuki G, Tanaka Y, *et al*. Phosphorylation of TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) by truncated casein kinase 1δ triggers mislocalization and accumulation of TDP-43. *J Biol Chem*. 2016;291:5473-5483.
49. Alquezar C, Salado IG, de la Encarnación A, *et al*. Targeting TDP-43 phosphorylation by casein kinase-1δ inhibitors: A novel strategy for the treatment of frontotemporal dementia. *Mol Neurodegeneration*. 2016;11:36.
50. Eguether T, Ermolaeva MA, Zhao Y, *et al*. The deubiquitinating enzyme CYLD controls apical docking of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat Commun*. 2014;5:4585.

51. Dobson-Stone C, Hallupp M, Shahheydari H, *et al*. CYLD Is a causative gene for frontotemporal dementia—Amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2020;143:783-799.
52. Kodani A, Salomé Sirerol-Piquer M, Seol A, Manuel Garcia-Verdugo J, Reiter JF. Kif3a interacts with dynactin subunit p150 glued to organize centriole subdistal appendages. *EMBO J*. 2013;32:597-607.
53. Zhapparova ON, Fokin AI, Vorobyeva NE, Bryantseva SA, Nadezhdina ES. Ste20-like protein kinase SLK (LOSK) regulates microtubule organization by targeting dynactin to the centrosome. *Mol Biol Cell*. 2013;24:3205-3214.
54. Deshimaru M, Kinoshita-Kawada M, Kubota K, *et al*. DCTN1 Binds to TDP-43 and regulates TDP-43 aggregation. *Int J Mol Sci*. 2021;22:3985.
55. Konno T, Ross OA, Teive HAG, Sławek J, Dickson DW, Wszolek ZK. DCTN1-related Neurodegeneration: Perry syndrome and beyond. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017;41:14-24.
56. Chen WJ, Wang WT, Tsai TY, Li HK, Lee YHW. DDX3 Localizes to the centrosome and prevents multipolar mitosis by epigenetically and translationally modulating p53 expression. *Sci Rep*. 2017;7:9411.
57. Freibaum BD, Chitta RK, High AA, Taylor JP. Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *J Proteome Res*. 2010;9:1104-1120.
58. Cheng W, Wang S, Zhang Z, *et al*. CRISPR-Cas9 Screens identify the RNA helicase DDX3X as a repressor of C9ORF72 (GGGGCC)n repeat-associated non-AUG translation. *Neuron*. 2019;104:885-898.e8.
59. Filippova N, Yang X, King P, Nabors LB. Phosphoregulation of the RNA-binding protein Hu antigen R (HuR) by Cdk5 affects centrosome function. *J Biol Chem*. 2012;287:32277-32287.
60. Lu L, Zheng L, Si Y, *et al*. Hu antigen R (HuR) is a positive regulator of the RNA-binding proteins TDP-43 and FUS/TLS. *J Biol Chem*. 2014;289:31792-31804.
61. Matsye P, Zheng L, Si Y, *et al*. Hur promotes the molecular signature and phenotype of activated microglia: Implications for amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases. *Glia*. 2017;65:945-963.
62. Leemann-Zakaryan RP, Pahlich S, Sedda MJ, Quero L, Grossenbacher D, Gehring H. Dynamic subcellular localization of the Ewing sarcoma proto-oncoprotein and its association with and stabilization of microtubules. *J Mol Biol*. 2009;386:1-13.
63. Chi B, O'Connell JD, Yamazaki T, Gangopadhyay J, Gygi SP, Reed R. Interactome analyses revealed that the U1 snRNP machinery overlaps extensively with the RNAP II machinery and contains multiple ALS/SMA-causative proteins. *Sci Rep*. 2018;8:8755.
64. Couthouis J, Hart MP, Erion R, *et al*. Evaluating the role of the FUS/TLS-related gene EWSR1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2012;21:2899-2911.
65. Yoshino Y, Ishioka C. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 beta induces apoptosis and mitotic catastrophe by disrupting centrosome regulation in cancer cells. *Sci Rep*. 2015;5:13249.
66. Moujalled D, James JL, Parker SJ, *et al*. Kinase inhibitor screening identifies cyclin-dependent kinases and glycogen synthase kinase 3 as potential modulators of TDP-43 cytosolic accumulation during cell stress. *PLoS One*. 2013;8:e67433.
67. Choi HJ, Cha SJ, Lee JW, Kim HJ, Kim K. Recent advances on the role of GSK3β in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Sci*. 2020;10:675.
68. Ran J, Yang Y, Li D, Liu M, Zhou J. Deacetylation of α-tubulin and cortactin is required for HDAC6 to trigger ciliary disassembly. *Sci Rep*. 2015;5:12917.
69. Hebron ML, Lonskaya I, Sharpe K, *et al*. Parkin ubiquitinates tar-DNA binding protein-43 (TDP-43) and promotes its cytosolic accumulation via interaction with histone deacetylase 6 (HDAC6). *J Biol Chem*. 2013;288:4103-4115.
70. Fazal R, Boeynaems S, Swijsen A, *et al*. HDAC6 Inhibition restores TDP-43 pathology and axonal transport defects in human motor neurons with TARDBP mutations. *EMBO J*. 2021;40:e106177.
71. White MC, Quarmby LM. The NIMA-family kinase, nek1 affects the stability of centrosomes and ciliogenesis. *BMC Cell Biol*. 2008;9:29.
72. Brenner D, Müller K, Wieland T, *et al*. NEK1 Mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2016;139(Pt 5):e28.
73. Nejedlá M, Klebanovych A, Sulimenko V, *et al*. The actin regulator profilin 1 is functionally associated with the mammalian centrosome. *Life Sci Alliance*. 2021;4:e202000655.
74. Tanaka Y, Nonaka T, Suzuki G, Kametani F, Hasegawa M. Gain-of-function profilin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause seed-dependent intracellular TDP-43 aggregation. *Hum Mol Genet*. 2016;25:1420-1433.
75. Wu CH, Fallini C, Ticozzi N, *et al*. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 2012;488:499-503.
76. Bannon JH, O'Donovan DS, Kennelly SME, Mc Gee MM. The peptidyl prolyl isomerase cyclophilin A localizes at the centrosome and the midbody and is required for cytokinesis. *Cell Cycle*. 2012;11:1340-1353.
77. Lauranzano E, Pozzi S, Pasetto L, *et al*. Peptidylprolyl isomerase A governs TARDBP function and assembly in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes. *Brain*. 2015;138:974-991.
78. Pasetto L, Grassano M, Pozzi S, *et al*. Defective cyclophilin A induces TDP-43 proteinopathy: Implications for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Brain*. 2021;144:3710-3726.
79. Pillai S, Nguyen J, Johnson J, Haura E, Coppola D, Chellappan S. Tank binding kinase 1 is a centrosome-associated kinase necessary for microtubule dynamics and mitosis. *Nat Commun*. 2015;6:10072.
80. Freischmidt A, Wieland T, Richter B, *et al*. Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci*. 2015;18:631-636.
81. Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, *et al*. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science*. 2015;347:1436-1441.
82. Čajánek L, Nigg EA. Cep164 triggers ciliogenesis by recruiting tau tubulin kinase 2 to the mother centriole. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:E2841-E2850.
83. Liachko NF, McMillan PJ, Strovas TJ, *et al*. The tau tubulin kinases TTBK1/2 promote accumulation of pathological TDP-43. *PLoS Genet*. 2014;10:e1004803.
84. Taylor LM, McMillan PJ, Liachko NF, *et al*. Pathological phosphorylation of tau and TDP-43 by TTBK1 and TTBK2 drives neurodegeneration. *Mol Neurodegener*. 2018;13:7.
85. Balestra FR, Strnad P, Flückiger I, Gönczy P. Discovering regulators of centriole biogenesis through siRNA-based functional genomics in human cells. *Dev Cell*. 2013;25:555-571.
86. Madeo F, Schlauer J, Zischka H, Mecke D, Fröhlich KU. Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p. *Mol Biol Cell*. 1998;9:131-141.
87. Watts GDJ, Wymer J, Kovach MJ, *et al*. Inclusion body myopathy associated with paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet*. 2004;36:377-381.

88. Kraemer BC, Schuck T, Wheeler JM, *et al*. Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta Neuropathol*. 2010;119:409-419.
89. Sephton CF, Good SK, Atkin S, *et al*. TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. *J Biol Chem*. 2010;285:6826-6834.
90. 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*. 2010;48:56-62.
91. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, *et al*. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain*. 2013;136(Pt 5):1371-1382.

https://doi.org/10.1093/brain/awad268 BRAIN 2023: 146; 3565–3567 | 3565

BRAIN
SCIENTIFIC COMMENTARY

The MLO-down on TDP-43

This scientific commentary refers to 'Transactive response DNA-binding protein 43 is enriched at the centrosome in human cells' by Bodin *et al.* (https://doi.org/10.1093/brain/awad228).

TDP-43 is a highly conserved, ubiquitously expressed RNA-binding protein (RBP) that serves critical functions in RNA splicing, stability and transport. While normally concentrated in the nucleus, TDP-43 is mislocalized to cytosolic inclusions in most amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD) patients. Thus, TDP-43 localization and the mechanisms regulating its distribution may be highly relevant for native TDP-43 function as well as disease pathogenesis. In this issue of *Brain*, Bodin and colleagues[1] identify a new and unanticipated localization of TDP-43 within the centrosome, hinting at a novel function for TDP-43 in microtubule organization.

TDP-43 contains two RNA-recognition motifs (RRMs), enabling recognition of UG-rich sequences in approximately one-third of all transcribed RNAs.[2] A low-complexity domain (LCD) located at the C-terminus mediates protein-protein interactions and facilitates TDP-43 liquid-liquid phase separation (LLPS), a reversible demixing of biomolecules into droplet-like, membraneless organelles (MLOs).[3] MLOs are key players in RNA and protein dynamics, effectively concentrating molecules within specialized compartments and promoting functional interactions independently of lipid membrane-bound organelles.

As illustrated in a growing body of work, TDP-43 is an active component of several MLOs (Fig. 1). Consistent with its contribution to transcription and alternative splicing, TDP-43 localizes to nuclear speckles[4] and Cajal bodies,[5] structures that are essential for RNA splicing, ribosome biogenesis and telomere maintenance. Nuclear paraspeckles are found adjacent to nuclear speckles, yet are morphologically and functionally distinct. They are maintained by the long non-coding RNA, *NEAT1*, which acts as a scaffold for the nucleation of RNA edited transcripts and RBPs such as TDP-43. Super-resolution microscopy confirmed the presence of TDP-43 within the shells of paraspeckles,[5] while unbiased studies revealed a dramatic increase in the affinity of TDP-43 for *NEAT1* in FTD patient tissue compared to controls,[2] suggesting a disease-specific shift in paraspeckle content. In response to stress, TDP-43 relocalizes from these MLOs to droplet-like nuclear bodies that partially overlap with speckles and paraspeckles.[6] While the native function of these stress-induced nuclear bodies remains elusive, they may modulate RNA processing under stressful conditions by sequestering splicing factors such as TDP-43, eliciting a rapid and marked change in alternative splicing that is reversible upon removal of the inciting stress.

Although TDP-43 is concentrated primarily in the nucleus of healthy cells, it is also found in several cytosolic MLOs at baseline, under stress and in disease. TDP-43 is a peripheral component of stress granules, dynamic cytosolic organelles that assemble in response to various stressors.[5] Much like nuclear bodies, stress granules sequester RBPs, RNA and ribosome subunits, temporarily isolating these factors in the face of stress. In keeping with its relevance to RNA stability, TDP-43 is also concentrated within processing (P)-bodies, cytosolic MLOs that function in mRNA degradation.[7] Additionally, TDP-43 may shuttle RNA within transport granules to distal sites within compartmentalized cells such as neurons for local protein synthesis.[8]

Bodin and colleagues[1] add to this considerable collection of TDP-43-positive MLOs by demonstrating the consistent localization of TDP-43 to the centrosome, a complex structure composed of two centrioles wrapped in phase-separated pericentriolar material (PCM). Conventionally, the centrosome serves to organize microtubules for processes such as cell division, signalling, establishment of polarity, and motility. However, recent investigations have uncovered novel centrosome constituents seemingly unrelated to traditional concepts of centrosome function, including ribosomes, RBPs and a subset of protein-encoding mRNAs.[9] Together, these results imply that centrosomes may be sites for local translation, allowing for rapid replacement of principal centrosome components. These findings also drove Bodin *et al.*[1] to explore a potential relationship between TDP-43 and the centrosome. Through a robust combination of high-resolution imaging and biochemical techniques in several distinct cell lines, the authors confirmed that TDP-43 does in fact localize to the centrosome.[1] These results have intriguing and potentially important implications for the functions of TDP-43 and the centrosome, and how these might be disrupted in TDP-43 proteinopathies such as ALS and FTD.

Many questions remain unanswered, however. Perhaps the most pressing of these relates to the role of TDP-43 within the centrosome. Is TDP-43 required for the formation of the centrosome? Analogous to its proposed function in transport granules, it is possible that TDP-43 coats essential mRNAs encoding centrosomal components, concentrating them within the PCM and enabling local translation of constituent proteins on demand. Alternatively, by virtue of its RRMs and LCD, TDP-43 could act as a scaffold for the PCM, similar to the proposed role of the PCM nucleating factor SPD-5.[10] Either or both of these functions are consistent with the fact that TDP-43 remains enriched at the centrosome in all phases of the cell cycle, as shown by Bodin and colleagues.[1] Under prolonged stress or in disease conditions, cytosolic MLOs such as stress granules and their component proteins and RNA become less dynamic, perhaps forming a nidus around which pathogenic inclusions form. Could centrosomes also act as a seed for the evolution of cytosolic protein aggregates in ALS, FTD and other TDP-43 proteinopathies such as Alzheimer's disease and limbic predominant

Received July 31, 2023. Accepted July 31, 2023. Advance access publication August 4, 2023
© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

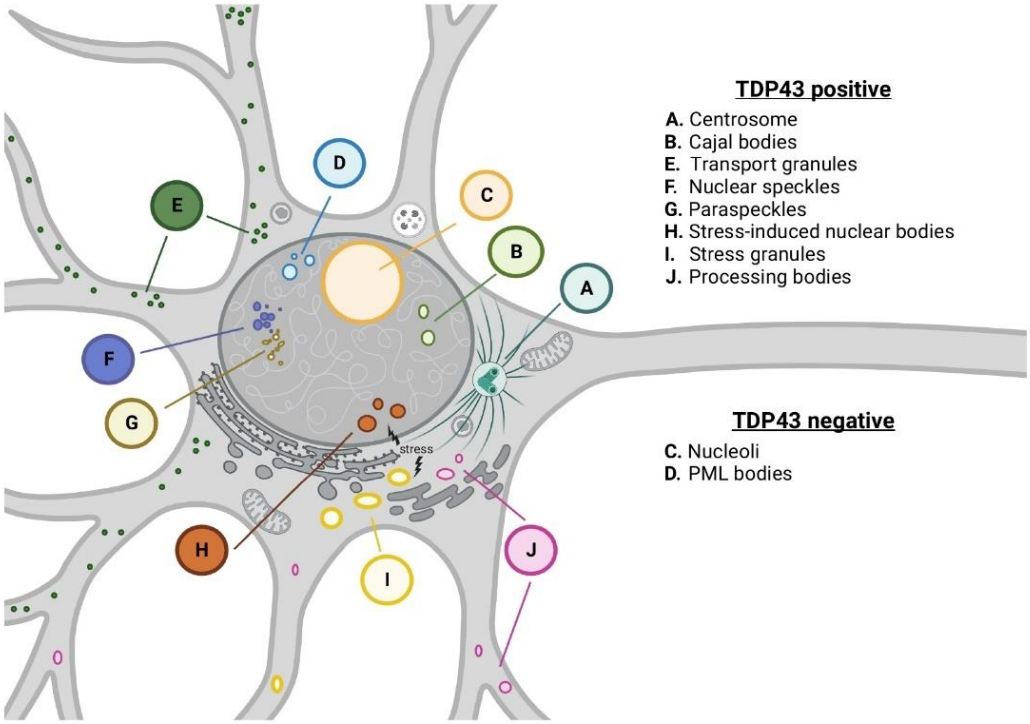


Figure 1 TDP-43 is a component of membraneless organelles (MLOs). Consistent with its role in RNA processing, TDP-43 is present in nuclear speckles, paraspeckles, and Cajal bodies. In response to stress, TDP-43 relocalizes to both nuclear bodies and cytosolic stress granules. TDP-43 has also been detected in cytosolic processing bodies involved in mRNA degradation, and transport bodies that relocate mRNAs to distal compartments for local translation. Bodin *et al.*[1] add to this work by providing novel evidence for TDP-43 within the centrosome, an MLO critical for microtubule organization.

age-related TDP-43 encephalopathy (LATE)? Additional studies are required to address these fundamental questions.

The mechanism responsible for localizing TDP-43 to the centrosome also remains mysterious. Bodin and co-authors[1] collated data on centrosomal proteins and RNAs, several of which were also identified as TDP-43 interactors or substrates, respectively. One or more of these factors may be required for TDP-43 localization within centrosomes, similar to *NEAT1* lncRNA in paraspeckles. Separately, the localization of TDP-43 to the centrosome may be driven by microtubule-dependent motor proteins, akin to its movement through neuronal processes as a component of neuronal transport granules.

As with most compelling science, the study by Bodin and colleagues[1] raises more questions than anticipated. Rather than adding to the complexity of TDP-43 function, however, this investigation may exemplify a larger role for TDP-43 in shielding mRNA from unwarranted processing, be it splicing (within the nucleus), degradation or untimely translation (in the cytoplasm). Such a notion predicts that TDP-43 would follow the RNA, so to speak: any cytoplasmic MLO that contains sufficient quantities of RNA—including the centrosome—may be expected to harbour TDP-43. This possibility may explain the localization of TDP-43 to nearly every mRNA-rich cytosolic MLO (Fig. 1). It is also consistent with the broad array of TDP-43 substrates identified in prior work, as well as the extensive abnormalities in RNA processing that ensue upon loss of TDP-43 and/or its cytosolic accumulation in disease. Future investigations building on the work by Bodin and colleagues[1] are needed to explore and extend these hypotheses to healthy cells as well as those affected by ALS, FTD and other TDP-43-related conditions.

Megan Dykstra[1,2] *and* *Sami J. Barmada*[1,2]

1 Neuroscience Graduate Program, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA
2 Department of Neurology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

Correspondence to: Sami J. Barmada
E-mail: sbarmada@umich.edu

Funding

This work was supported by National Institutes of Health (R01 NS097542 and R01 NS113943 to S.J.B.; P30 AG072931 to the Alzheimer's Disease Research Center; and 1F31NS134123-01 to M.D.).

Competing interests

The authors report no competing interests.

References

1. Bodin A, Greibill L, Gouju J, *et al.* Transactive response DNA-binding protein 43 is enriched at the centrosome in human cells. *Brain.* 2023;146:3624-3633.
2. Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, *et al.* Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci.* 2011;14:452-458.

3. Shin Y, Brangwynne CP. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*. 2017;357:eaaf4382.
4. Casafont I, Bengoechea R, Tapia O, Berciano MT, Lafarga M. TDP-43 localizes in mRNA transcription and processing sites in mammalian neurons. *J Struct Biol*. 2009;167:235-241.
5. Pérez-Berlanga M, Wiersma VI, Zbinden A, *et al*. Loss of TDP-43 oligomerization or RNA binding elicits distinct aggregation patterns. *EMBO J*. Published online 11 July 2023. https://doi.org/10.15252/embj.2022111719
6. Wang C, Duan Y, Duan G, *et al*. Stress induces dynamic, cytotoxicity-antagonizing TDP-43 nuclear bodies via paraspeckle LncRNA NEAT1-mediated liquid-liquid phase separation. *Mol Cell*. 2020;79:443-458.e7.
7. Wang IF, Wu LS, Chang HY, Shen CK. TDP-43, the signature protein of FTLD-U, is a neuronal activity-responsive factor. *J Neurochem*. 2008;105:797-806.
8. Alami NH, Smith RB, Carrasco MA, *et al*. Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron*. 2014;81:536-543.
9. Safieddine A, Coleno E, Salloum S, *et al*. A choreography of centrosomal mRNAs reveals a conserved localization mechanism involving active polysome transport. *Nat Commun*. 2021;12:1352.
10. Woodruff JB, Ferreira Gomes B, Widlund PO, Mahamid J, Honigmann A, Hyman AA. The centrosome is a selective condensate that nucleates microtubules by concentrating tubulin. *Cell*. 2017;169:1066-1077.e10.

Annexe 2

Neuropathology and Applied Neurobiology (2021), **47**, 127–142 doi: 10.1111/nan.12646

STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) reveals the nanoscale organization of pathological aggregates in human brain

P. Codron*†‡, F. Letournel*†, S. Marty§, L. Renaud¶, A. Bodin‡, M. Duchesne**††, C. Verny*‡, G. Lenaers‡, C. Duyckaerts§, J.-P. Julien¶‡‡, J. Cassereau*‡ and A. Chevrollier‡

**Service de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France, †Laboratoire de Neurobiologie et Neuropathologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France, ‡Équipe Mitolab, Institut MITOVASC, INSERM U1083, CNRS 6015, Université d'Angers, Angers, France, §Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, INSERM U1127, CNRS UMR7225, Sorbonne Université, Paris, France, ¶CERVO Brain Research Centre, 2601 Chemin de la Canardière, Québec, QC, Canada, **Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, Limoges, France, ††Centre de Référence des Neuropathies Périphériques Rares, Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, Limoges, France and ‡‡Department of Psychiatry and Neuroscience, Laval University, Québec, QC, Canada*

P. Codron, F. Letournel, S. Marty, L. Renaud, A. Bodin, M. Duchesne, C. Verny, G. Lenaers, C. Duyckaerts, J.-P. Julien, J. Cassereau and A. Chevrollier (2021) *Neuropathology and Applied Neurobiology* **47**, 127–142
STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) reveals the nanoscale organization of pathological aggregates in human brain

Abstract: **Aims**: Histological analysis of brain tissue samples provides valuable information about the pathological processes leading to common neurodegenerative disorders. In this context, the development of novel high-resolution imaging approaches is a current challenge in neuroscience. **Methods**: To this end, we used a recent super-resolution imaging technique called STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) to analyse human brain sections. We combined STORM cell imaging protocols with neuropathological techniques to image cryopreserved brain samples from control subjects and patients with neurodegenerative diseases. **Results**: This approach allowed us to perform 2D-, 3D- and two-colour-STORM in neocortex, white matter and brainstem samples. STORM proved to be particularly effective at visualizing the organization of dense protein inclusions and we imaged with a <50 nm resolution pathological aggregates within the central nervous system of patients with Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Lewy body dementia and fronto-temporal lobar degeneration. Aggregated Aβ branches appeared reticulated and cross-linked in the extracellular matrix, with widths from 60 to 240 nm. Intraneuronal Tau and TDP-43 inclusions were denser, with a honeycomb pattern in the soma and a filamentous organization in the axons. Finally, STORM imaging of α-synuclein pathology revealed the internal organization of Lewy bodies that could not be observed by conventional fluorescence microscopy. **Conclusions**: STORM imaging of human brain samples opens further gates to a more comprehensive understanding of common neurological disorders. The convenience of this technique should open a straightforward extension of its application for super-resolution imaging of the human brain, with promising avenues to current challenges in neuroscience.

Keywords: amyloid-β, neuropathology, STORM, tau, TDP-43, α-synuclein

***Correspondence:** Dr Philippe Codron, Service de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France. Tel: +33 2 41 35 46 13; Fax: +33 2 41 35 62 14; E-mail: codron.ph@outlook.com

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society.
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

Introduction

Advances in neuroscience are closely linked to the progresses made in cell imaging. The invention of the microscope in the 17th century first allowed the characterization of the human brain at the cellular level and the emergence of clinical neurology, neurosurgery and psychiatry in the 18th and 19th centuries. Likewise, the understanding and classification of neurodegenerative disorders benefited from the development of immunostaining techniques and multichannel fluorescence imaging in the second part of the 20th century.

However, despite these advances, the diffraction barrier remains a resolution limit for conventional light microscopes, hindering the precise characterization of subcellular structures. Indeed, due to the diffraction of light, each fluorescent molecule appears as a spot of at least ~ 250 nm in size, as described by the point-spread function (PSF) [1,2]. In conventional fluorescence microscopy, all the illuminated molecules emit their signal at the same time in a diffraction-limited volume, limiting the spatial resolution of the final acquired image. Moreover, optical aberrations and out-of-focus blur also affect the signal-to-noise ratio and decrease the effectively achievable resolution, especially in the case of complex biological samples. Recently, super-resolution microscopy techniques overcame this barrier using different approaches to distinguish fluorescent molecules that reside within the same diffraction-limited volume [3,4]. One of them, called STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM), is based on single molecule localization by stochastically turning on photoswitchable fluorescent molecules within the diffraction limited volume at different time points so their signal does not substantially overlap [5,6]. When isolated in space, the position of each individual fluorophore can be determined by localizing the centre positions of their signal. A super-resolution image is then generated from numerous molecular localizations accumulated over time, offering a spatial resolution < 50 nm.

By improving the resolution towards the nanometre scale, STORM allows the visualization of nanoscopic structures while retaining the advantages of optical microscopy such as sample preparation, molecular identification through immunostaining and multicolour fluorescence imaging [4]. In the field of neuroscience, this new technique led to the characterization of the periodic structure of axonal cytoskeleton in neurons [7] and the spatial organization of synaptic proteins [8]. However, to date, STORM has mainly been used to image cultured cells and rodent brain samples [9].

In this study, we combined cell imaging protocols with neuropathology techniques to perform 2D-, 3D- and two-colour STORM on human brain samples from control subjects and patients with common age-related neurodegenerative diseases.

Material and methods

Tissue samples

All post mortem brain samples used for STORM imaging were obtained from the Neurodegenerative Diseases Brain Bank of Angers University Hospital. Six patients with neurodegenerative disorders and three age-matched control subjects were selected among the archived histological sections. Samples from prefrontal cortex, parietal cortex, temporal cortex, peri-ventricular white matter and *substantia nigra* were considered. Clinical characteristics of the patients and controls are reported in Table S1.

Immunofluorescence staining

Cryopreserved brain samples were used for STORM imaging (samples bathed 30 s into iso-pentane immersed in liquid nitrogen during brain autopsy and stored dry at $-80°C$). Tissue samples were cryo-sectioned at $-20°C$ into 5-µm-thick sections using a Leica CM3050 S cryostat (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) (Figure S1a). Each frozen section was retrieved onto 22×22 mm^2 N°1 cover glass (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) and air-dried for 45 min. After three washes in phosphate-buffered saline (PBS) (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany), the sections were blocked and permeabilized in 0.1% triton X-100 and 5 % bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) in PBS for 1 h at room temperature (RT). No antigen retrieval was used. The sections were then washed and incubated over night at 4°C with primary antibodies diluted in blocking solution. The next day, the sections were washed and incubated with appropriate AF-conjugated secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) diluted in blocking solution for 2 h at RT. TrueBlack® (Biotium, Fremont, CA, USA) was used to quench lipofuscin autofluorescence following manufacturer's instructions. References and dilutions of antibodies and reagents are reported in Table S2.

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

STORM Acquisition and image reconstruction

For super resolution imaging, the cavity of a clean single depression slide (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) was filled with 50 µl of switching buffer (Abbelight, Paris, France), and covered by a coverslip, the sample side facing downward (Figure S1b). Excess buffer was carefully wiped away, and the coverslip was sealed with a two-component silicone-glue (Twinsil®, Picodent, Wipperfürth, Germany) (Figure S1c). After 10 min drying time, the device was placed on the stage of an inverted motorized microscope NIKON ECLIPSE Ti-E (Nikon Instruments Europe, Amsterdam, The Netherlands) equipped with a CFI SR APO TIRF 100X ON1.49 objective, a Perfect Focus System and a total internal reflection fluorescence ILas2 module (Roper Scientific, Martinsried, Germany) (Figure S2). Image sequences were acquired with a single-photon sensitive camera Evolve 128TM EMCCD 512 × 512 imaging array (Photometrics, AZ, USA). The signal was expanded with a 1.5× lens and focused on the EMCCD with pixel size of 16 µm. The pixel size on the image plane was 107 nm. Acquisitions were performed at fixed 25°C in a dark heating chamber (Okolab NA, Pozzuoli, Italy). Phase contrast was first used for orientation and focus adjustment. The TIRF angle was then adjusted for each channel to reduce the background excitation. The region of interest was defined using the 647 and 532 nm laser line, and the 405 nm laser line was used to assess the autofluorescence signal. Prior to STORM imaging, a multichannel conventional fluorescence microscopy image was acquired for subsequent comparison with STORM image (snapshot). The excitation power of either 647 or 532 nm laser line was then strongly increased (~50 to 100 mW before the objective lens) to induce fluorophore blinking and preform STORM imaging. The em-gain of the camera was set to high amplification (300) to optimize the signal-to-noise ratio. Images were acquired with an integration time of 30 ms per frame.

Wavertracer software (Molecular devices, CA, USA) was used for real time localization and reconstruction [13,14]. Spatial coordinates of each localized molecule were retrieved in real-time in two or three dimensions. The blinking spot was detected using 6x6 pixels region in a 180-250 intensity threshold range. In order to ensure optimal molecule density all along the acquisition process, an automatic feedback control on the 405 laser power was used. WaveTracer module uses a wavelet-based segmentation algorithm filter, improving Gaussian fitting. The *xy* sigma of the PSF was fixed to 1. The localization uncertainty of the system, experimentally measured by imaging a point sample illuminated so that it emits a signal similar to the single molecules (on average), achieved 10.8 nm (R^2 0.96). The PSF Gaussian fitting of the image reconstruction was used to measure the standard deviation of the distribution. The total acquisition time points for each sequence were adapted to the observed structure and to the labelling density (5,000 to 20 000 frames) (Video S1). For high-density STORM data sets (Video S3), we used a super-resolution radial fluctuation (SRRF) analytical approach to prevent artefacts due to fluorophores overcrowding [15]. As in SMLM imaging, the input data were a sequential series of frames of the imaged structure. However, for SRRF analysis there was no requirement for the emitting fluorophores to be sparsely distributed. The following parameters were used for SRRF imaging: 0.3 Ring Radius, 10 Radiality Magnification and 8 Axes in Ring.

Imaris 8.0 software (Bitplane, Zurich, Switzerland) was used for image processing and visualization, and Metamorph 7.7 (Molecular Devices, CA, USA) was used for measurements. To estimate the diameter of filamentous structures (axons, branches of aggregated proteins), cross-sectional widths were manually measured at multiple locations. To measure the area of rounded structures (axons, cores), the border was manually defined, and the area was automatically calculated. More than 300 STORM images have been acquired and analysed in total.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, formalin-fixed tissue samples embedded in paraffin from the same patients were sectioned at room temperature into 4 µm thick sections using a Leica RM125 microtome (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Sections were collected on slides and immunostained using a fully automated IHC stainer Leica-BOND III (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Washes, blocking, antigen retrieval, incubation with appropriate primary and enzyme-conjugated secondary antibody, enzymatic detection and haematoxylin counterstain were automatically performed following manufacturer's instructions. Finally, samples

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

were mounted and analysed under a Zeiss Axioscop40 microscope equipped with an Axio-cam MRC5 camera, using AxioVisio 4.6 software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Electron microscopy

Brain cortical samples from the middle frontal gyrus of the right hemisphere were collected between 1974 and 1986 [16]. Biopsies were immediately fixed in Karnovsky's solution, postfixed in osmium and embedded in Araldite. Samples from a 38-year-old male subject who suffered a brain haemorrhage were used as control (laboratory identification #927). Samples from a 58-year-old male patient affected with a familial form of AD (M146L mutation of the *PSEN1* gene) were used to study neurofibrillary tangles and senile plaques (laboratory identification #1507). Seventy-nm-thick sections were collected on copper grids and contrasted by incubation with 5% uranyl acetate followed by lead citrate for 5 min each. Sections were analysed with a Hitachi HT 7700 (Elexience, Verrieres le Buisson, France) electron microscope. More than 80 TEM images have been analysed in total for each sample.

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using PRISM software version 5.0 for Windows (GraphPad, La Jolla, CA). Comparisons of means were performed using Student's t-test for two groups analysis, and one-way analysis of variance (ANOVA) for multiple groups analysis, after verifying the Normal distribution and the homoscedasticity of data using Shapiro–Wilk's test. In the absence of Normal distribution, the nonparametric Mann–Whitney U-test was used. Differences were considered to be significant at $P < 0.01$.

Ethical approval

Brain tissue samples were stored in the biological resource centre « Neurodegenerative disorders» (national identifier BB-0033-00038) after being authorized by the regional ethics committee West II (declaration number DC-2011-146). The study protocol has been declared to the French commission for information technology and civil liberties (declaration number ar19-0012v0). An anonymous database and a list of correspondence have been generated and stored on a hard disk of the University Hospital of Angers with restricted access.

Results

Super-resolution imaging of human brain samples with STORM

To assess STORM imaging on human brain tissue, we first aimed to resolve well-defined histological structures such as neocortical axon tracts. Frozen samples of prefrontal cortex from control subjects were cut by standard cryostat methods (Figure S1) and immunostained with an anti-neurofilament primary antibody and a secondary antibody conjugated with the photoswitchable fluorophore Alexa Fluor (AF) 647. Coverslips with immunostained brain sections were bathed in a switching buffer (Figure S1) and placed on the stage of an inverted motorized microscope equipped with a high-power laser module, a total internal reflection fluorescence (TIRF) system and an electron multiplying charge coupled device (EMCCD) single-photon sensitive camera (Figure 1A, Figure S2).

STORM is based on separating stochastically the emission of photoswitchable fluorescent molecules in time, so that each individual emitter can be distinguished from the others that reside within the same diffraction-limited volume. For each acquisition, thousands of frames were recorded and the localizations of the activated fluorescent molecules were detected on a per-frame basis with sub-pixel accuracy. The accumulated localizations from all frames were then used to reconstruct a super-resolution image (Figure 1B, Video S1). The total acquisition and reconstruction time for one super-resolved image lasted from 5 to 10 min, depending on the number of acquired frames.

With the aim of assessing the final resolution of the technique, we imaged axon processes with conventional wide field fluorescence microscopy, STORM and transmission electron microscopy (TEM) in prefrontal cortex samples of age-matched control subjects. Although neurofilament fibrils (~10 nm) could not be defined as well as when using TEM, the calibre of axons imaged with STORM was lower than when using conventional wide field fluorescence microscopy (Figure S3). For the same prefrontal axons, the apparent diameters and areas of longitudinally- and transversally-sectioned axons were more than 50% smaller

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

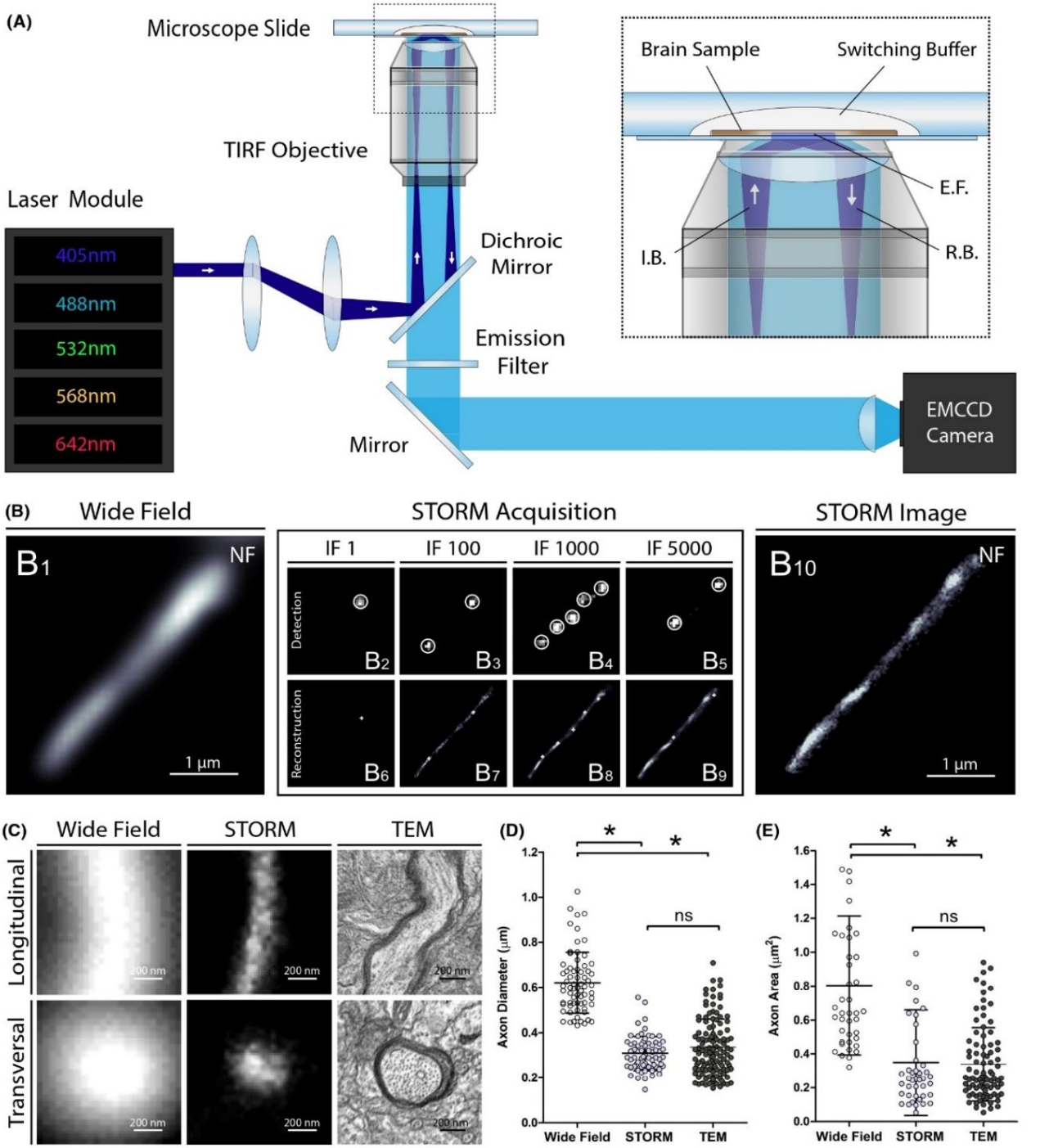


Figure 1. Super-resolution imaging of human brain samples with STORM. **(A)** Schematic of the optical setup used for STORM imaging. I.B., incident beam; E.F, evanescent field; R.B., reflected beam. **(B)** STORM acquisition of a cortical axon in a human brain section immunostained for neurofilaments (NF): a conventional wide field fluorescence microscopy image was first acquired (B1), excitation power was then strongly increased to induce fluorophore blinking and thousands of frames were recorded (*B2-B5*). The localization of the activated fluorescent molecules were detected on a per-frame basis with sub-pixel accuracy (B6-B9). The accumulated localizations from all frames were then used to reconstruct a super-resolution image (B10). IF, imaging frame. **(C)** Representative images of longitudinally and transversally sectioned prefrontal cortex axons acquired with conventional wide field fluorescence microscopy, STORM and transmission electron microscopy (TEM). **(D and E)** Axon diameters (longitudinal sections) and areas (transversal sections) measured in human brain using conventional fluorescence microscopy, STORM and TEM. Error bars indicate means with standard deviations. $*P < .001$

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

when measured with STORM compared to wide field fluorescence microscopy ($P < 0.001$ for the two parameters) (Figure 1C-E, Tables S3 and S4). In contrast, there was no significant difference when comparing apparent diameters ($P = 0.441$) and areas ($P = 0.596$) measured with STORM and TEM (Figure 1D,E, Tables S3 and S4). STORM is thus a reliable technique allowing to image and analyse histological brain structures with a resolution <50 nm.

3D-STORM and two-colour STORM imaging of human brain samples

Three-dimensional (3D) and multichannel imaging provide fundamental insights into the architectural organization of nanoscale structures. To perform 3D-STORM in human brain sections we used an astigmatism-based method [17]. After setting a cylindrical lens in the detection path of the microscope, the z coordinate of each fluorescent molecule was determined from the ellipticity of its image. Prefrontal cortical samples of control subjects were immunostained for neurofilaments (NF), and after reconstruction, axons were visualized in 3D with high resolution and an imaging depth of ~0.5 µm (Figure 2A, Video S2). The cylindrical shape of axon tracts was discernible and both longitudinal and transversal sections of the 3D modelled axons were similar in size to those obtained with 2D-STORM.

Then, to assess two-colour STORM imaging on cortex samples, we immunostained human brain sections with two primary antibodies detecting nearby structures, the pre and postsynaptic Bassoon and Homer 1 proteins, and with secondary antibodies conjugated with the photoswitchable fluorophores AF 647 and AF 532 (Figure 2B, Figure S4). In conventional fluorescence microscopy, Bassoon and Homer 1 signals appeared diffuse and overlapping, and the synaptic clefts could not be precisely defined. In contrast, two-colour STORM accurately distinguished between pre and postsynaptic protein clusters separated by the synaptic cleft, and defined the size, orientation and organization of the synapses. Interestingly, multichannel imaging combining conventional wide field fluorescence microscopy and STORM was also achievable, allowing super-resolution imaging of brain structures using both photoswitchable and nonphotoswitchable fluorophores. Although less specific than two-colour STORM, this technique provided valuable information about the layout of adjacent structures, as, for example the myelin sheath around axonal tracts (Figure 2C, Figure S4). The dimensions of the super-resolved structures were comparable to those measured using TEM in the same regions (Figure 2B3,C3).

Together, these results demonstrate the possibility of performing 3D and two-colour STORM imaging with a <50 nm resolution on human brain samples, providing valuable information to current topics in neuroscience, such as axonal organization, myelination and synaptic plasticity in the human brain. Understanding the pathophysiology of neurodegenerative disorders to identify novel therapeutic prospects is another major challenge in neuroscience. Since most of these diseases are defined by specific intra or extracellular protein aggregates in distinctive anatomical brain regions, novel insights must be disclosed on the precise characterization of the corresponding lesions. To this end, we performed STORM imaging of Amyloid-β (Aβ), Tau, α-synuclein and TDP-43 aggregates in samples from patients affected with neurodegenerative disorders.

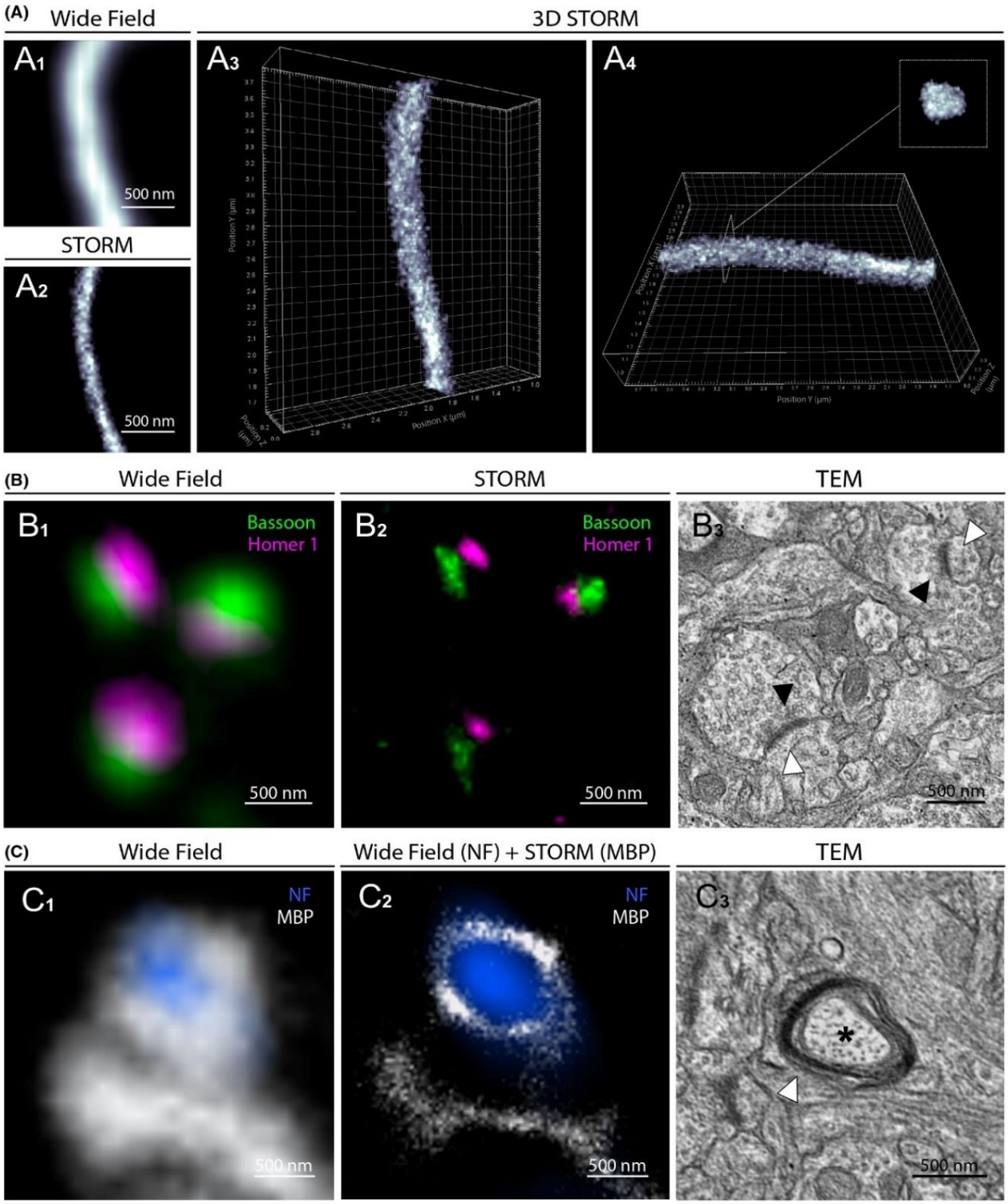
STORM imaging of Amyloid-β and Tau proteinopathy

Alzheimer's disease (AD) is the leading cause of dementia. The two main hallmarks of the disease are extracellular deposits of Aβ peptides, some of which constitute the core of senile plaques, and intraneuronal aggregates of hyperphosphorylated tau protein (p.Tau) called neurofibrillary tangles (NFT) [10]. Since aggregates can measure up to 100 µm, keeping an overall view of the whole lesions is critical to study Aβ and Tau pathology in the brain, whereas high-resolution imaging is mandatory to characterize the nanoscale organization of the misfolded proteins.

Towards this goal, we imaged entire senile plaques and degenerating neurons with STORM. Tissue samples from the prefrontal, parietal and temporal cortex of AD patients were immunostained for Aβ and p.Tau (phospho Ser202, Thr205). Auto-fluorescence quenchers were used to reduce the signal of lipofuscin, an autofluorescent pigment present in senescent neurons [18]. Nevertheless, lipofuscin signal was specifically detectable in neuron but did not preclude STORM acquisitions.

STORM images of ~30 µm diameter senile plaques and ~15 µm degenerating neurons with NFTs were

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society



© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

acquired. While the Aβ fibrils and the paired helical filaments of Tau could not be identified as with TEM, STORM images provided highly resolved details of the nanoscale distribution and size of Aβ and p.Tau aggregates (Figure 3, Figure S5). Aggregated Aβ branches were reticulated and cross-linked in the extracellular matrix, and their widths ranged from 60 to 240 nm (140.8 ± 39.6 nm, mean ± SD) (Figure S6). Intraneuronal p.Tau NFTs appeared denser, with a honeycombed structure in the soma and a filamentous organization in the axon. The presence of unstained spots within the aggregates suggested the inclusion of other components, such as proteins or organelles. These results emphasize that STORM can be used to image Aβ and p.Tau aggregates in brain samples from AD patients with high resolution.

STORM Imaging Of Lewy pathology

Parkinson's disease (PD) and dementia with Lewy bodies (DLB) are two neurodegenerative diseases characterized by the presence of intraneuronal phosphorylated α-synuclein (p.α-syn) immuno-reactive inclusions, called Lewy bodies (LB) [19]. The structure of LBs varies according to their localization within the central nervous system. Two main LB types can be observed by immunohistochemistry: typical Lewy bodies (TLB) with a pale core surrounded by a dense halo mainly found in the brainstem, and smaller cortical Lewy bodies (CLB), lacking the central core and mainly detected in the neocortex. Accumulation of p.α-syn in dystrophic axons called Lewy neurites (LN) can also be observed. To date, the structure of LBs remains unclear, as the resolution of conventional fluorescence microscopy is too low to characterize their internal architecture and TEM does not provide sufficient information about their protein content and organization.

To characterize LB organization at the nanoscale level with a molecular staining approach, we performed STORM imaging on brain samples from PD and DLB patients. *Substansia nigra* and prefrontal cortex sections were immunostained with an anti-p.α-syn (phospho Ser129) antibody and images of TLBs, CLBs and LNs were acquired. The ring-shaped appearance of TLBs were observed both with conventional and super-resolution imaging, although only the STORM images defined precisely their architecture (Figure 4A). The pale core appeared unstained, whereas the peripheral dense halo was made of reticulated p.α-syn. Likewise, STORM imaging of CLBs revealed dense honeycomb structures that could not be observed by conventional fluorescence microscopy (Figure 4B,C). As for p.Tau aggregates, the unstained cores and spots observed in LBs might correspond to protein partners or trapped organelles. Indeed, Lewy bodies are known to be multiprotein complexes composed of more than 100 proteins, including p.Tau [20]. We thus performed two-colour STORM imaging of LBs using antibodies against p.Tau and p.α-syn, to precisely define the internal architecture of the lesion and specifically distinguish one protein from the other (Figure 5A). STORM imaging accurately measured the width of aggregated p.α-syn branches and the area of the unstained cores observed in CLBs, averaging 281.2 ± 95.8 nm and 0.133 ± 0.130 μm^2 respectively (mean ± SD) (Figure 5B). Finally, two-colour STORM imaging of LNs revealed the internal organization of the neurites with a core of aggregated p.α-syn bound to neurofilaments (Figure 5C, Figure S7). These very first STORM images of p.α-syn aggregates hold great promise for characterizing the composition and spatial organization of Lewy pathology in human brain.

STORM imaging of TDP-43 neuronal inclusions

Transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43), encoded by TARDBP gene, is a DNA/RNA binding protein predominantly located in the nucleus of cells under physiological condition, whereas the

Figure 2. 3D-STORM and two-colour STORM images of physiological structures in human brain. **(A1)** Conventional fluorescence microscopy image of a longitudinally sectioned axon immunostained for neurofilament (NF) in the prefrontal cortex. **(A2)** STORM image of the same area. **(A3 and A4)** 3D-STORM reconstruction of the acquired axon. **(B1)** Conventional fluorescence microscopy image of pre and postsynaptic proteins Bassoon and Homer 1 in prefrontal cortex. **(B2)** Two-colour STORM image of the same area resolving distinct synaptic clusters. **(B3)** Comparative TEM image of two synapses with pre (black arrowheads) and post (white arrowheads) synaptic compartments. **(C1)** Conventional fluorescence microscopy image of axonal NF and oligodendrocyte myelin basic protein (MBP) in periventricular white matter. **(C2)** Image of the same area combining conventional fluorescence microscopy (NF) and STORM (MBP). **(C3)** Comparative TEM image of a transversally sectioned axon (asterisk) surrounded by oligodendrocyte processes and myelin sheath (white arrowhead)

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

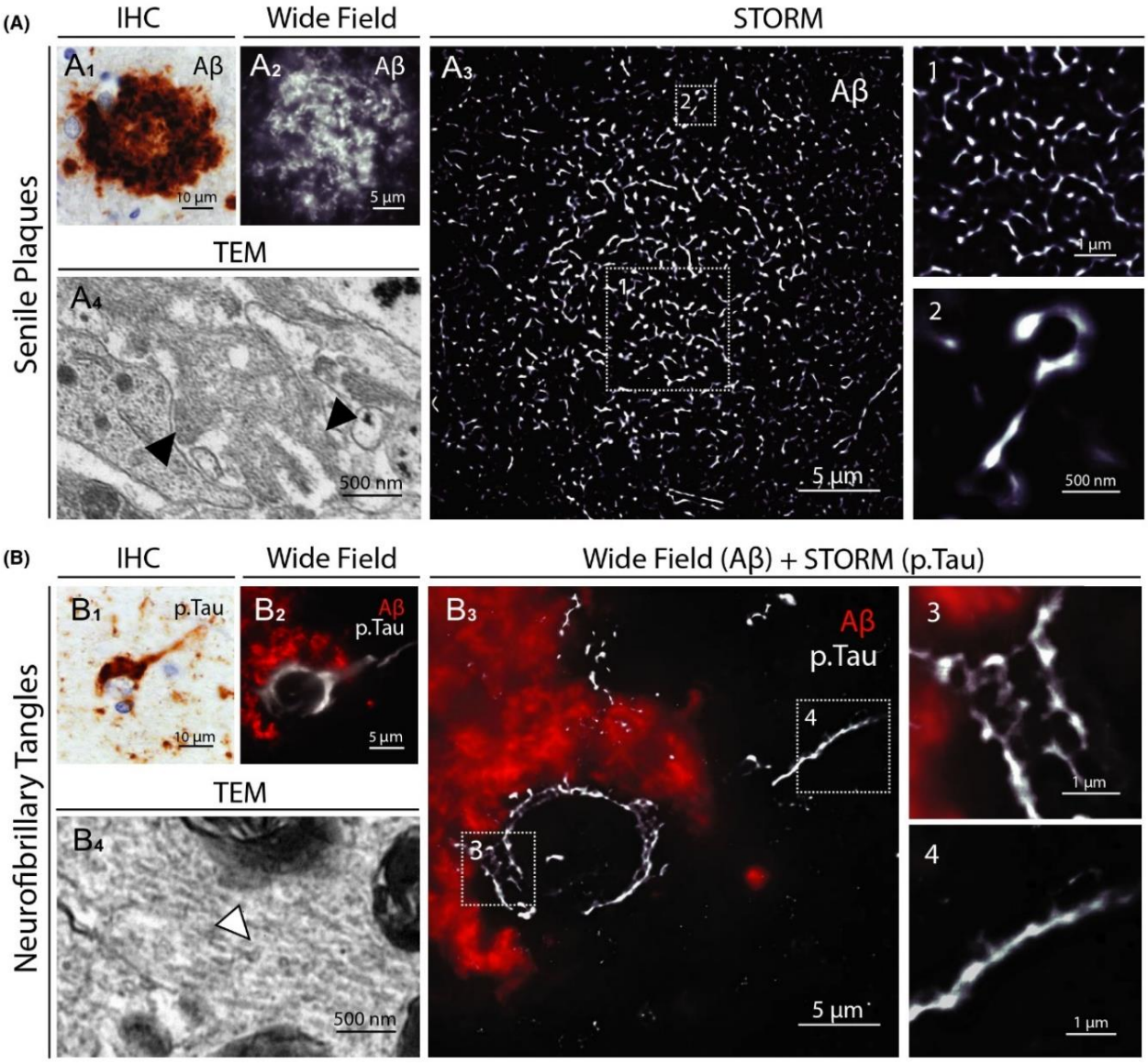


Figure 3. STORM images of senile plaques and neurofibrillary tangles in AD patient brain samples. **(A1)** Representative image of a senile plaque in the neocortex of an AD patient (immunohistochemical detection of Aβ). **(A2)** Conventional fluorescence microscopy image of a whole senile plaque in a neocortex section of the same patient immunostained for Aβ. **(A3)** STORM image of the same area. The insets (1 and 2) show close-up details of the distribution and size of aggregated Aβ branches. **(A4)** Comparative TEM image of Aβ fibrils (black arrowheads) in a senile plaque. **(B1)** Representative image of neurofibrillary tangles in the neocortex of an AD patient (immunohistochemical detection of p.Tau). **(B2)** Conventional fluorescence microscopy image of neurofibrillary tangles within the soma of a whole degenerating neuron surrounded by Aβ deposition in a neocortex section of the same patient. **(B3)** Same neuron imaged by combining conventional fluorescence microscopy (Aβ) and STORM (p.Tau). The insets (3 and 4) show close-up details of the honeycombed structure of p.Tau aggregates in the soma and the filamentous organization in the axon. **(B4)** Comparative TEM image of Tau filaments (white arrowhead) in neurofibrillary tangles

accumulation of misfolded TDP-43 in the cytosol and axons of degenerating neurons is a pathological hallmark of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration (FTLD) [21,22]. TDP-43 aggregates are called neuronal cytoplasmic inclusions (NCI) when located in the cytosol, and dystrophic neurites (DN) when located in axons. The physiopathological mechanism leading to neuronal degeneration in

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

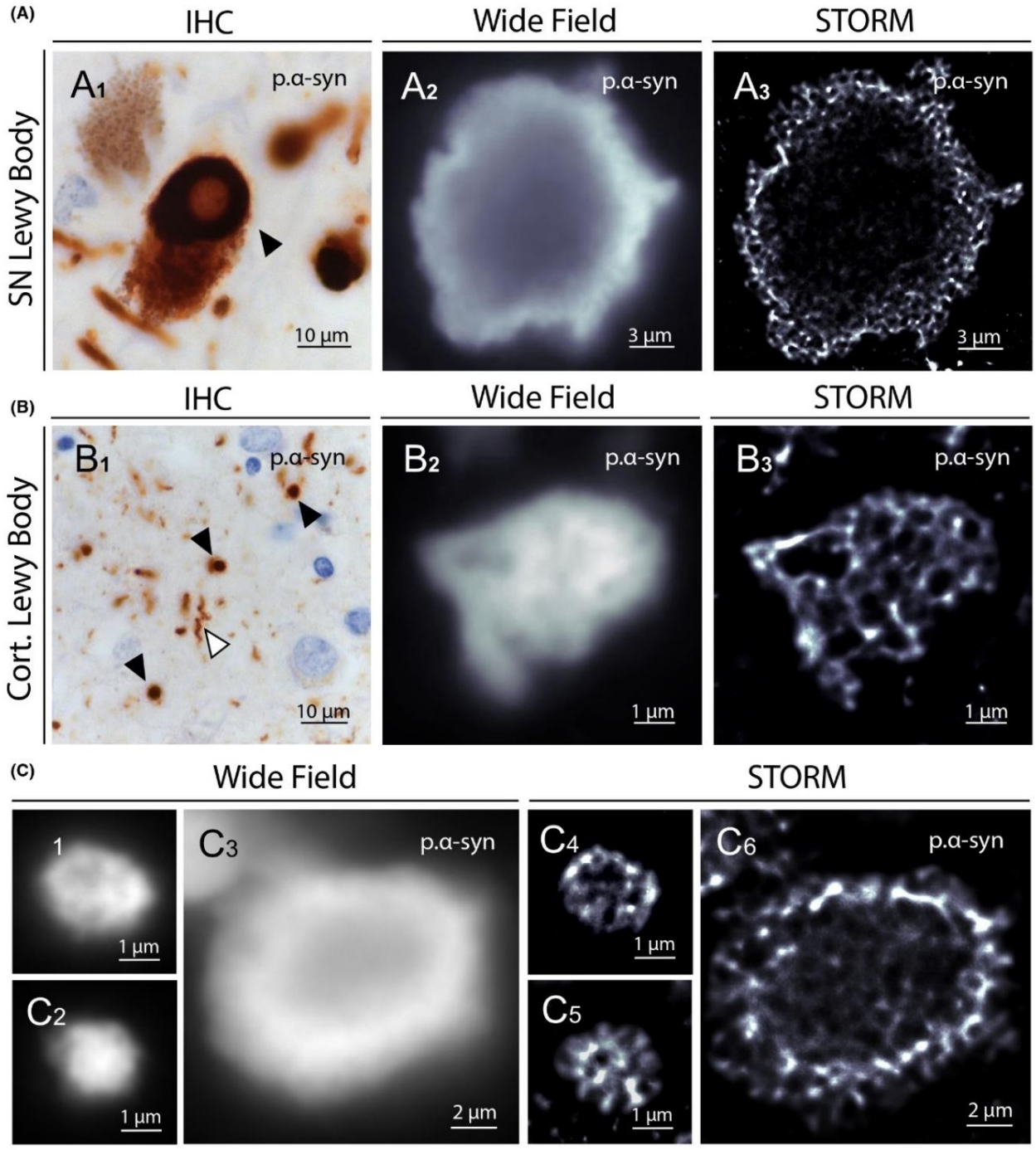


Figure 4. STORM images of Lewy bodies in PD and DLB patients brain samples. **(A1)** Representative image of a typical Lewy body (black arrowhead) in the *substantia nigra* of a PD patient (immunohistochemical detection of p.α-syn). **(A2)** Conventional fluorescence microscopy image of a Lewy body in a *substantia nigra* section of the same patient immunostained for p.α-syn. **(A3)** STORM image of the same LB resolving distinctly the α-synuclein reticulated corona and the unstained core. **(B1)** Representative image of cortical Lewy bodies (black arrowheads) and Lewy neurite (white arrowhead) in the neocortex of an PD patient. **(B2)** Conventional fluorescence microscopy image of a cortical Lewy body in a neocortex section of the same patient immunostained for p.α-syn. **(B3)** STORM image of the same area revealing the dense honeycombed organization of the Lewy body. **(C)** Conventional fluorescence microscopy representative images of cortical **(C1 and C2)** and SN **(C3)** Lewy bodies immunostained for p.α-syn. STORM images of the same areas **(C4, C5 and C6)** highlight the distinct internal organization of the protein aggregates

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

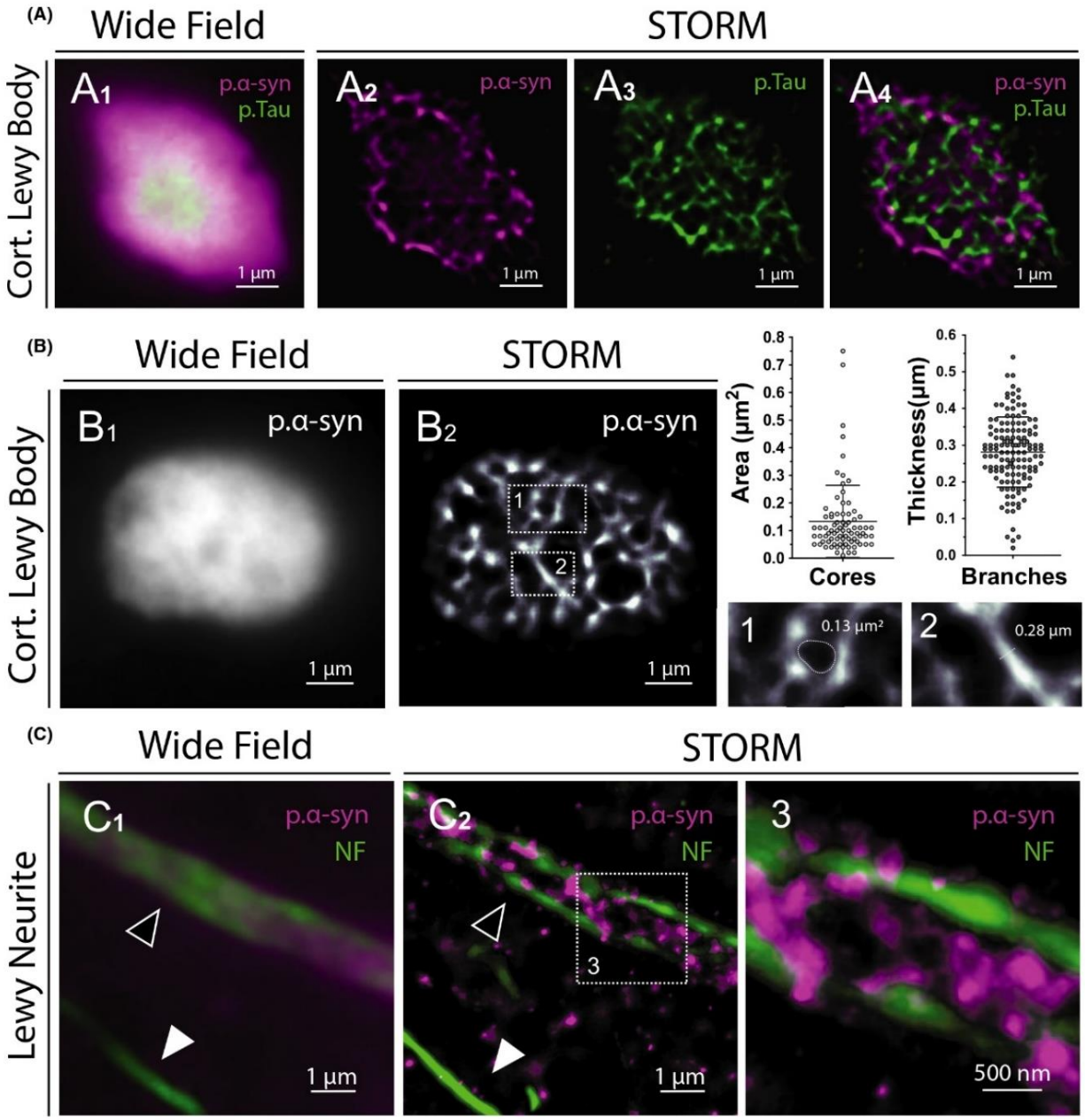


Figure 5. Colocalization and ultrastructural analysis of Lewy bodies and Lewy Neurites. **(A1)** Conventional fluorescence microscopy image of a cortical Lewy body immunostained for p.α-syn and p.Tau. **(A2-A4)** Two-Colour STORM image of the same area revealing the internal architecture of the lesion and allowing to distinguish one protein from the other. **(B)** Ultrastructural analysis of a cortical Lewy body **(B1)** using STORM (B2). Areas of the unstained cores and widths of p.α-syn branches were measured on super-resolved images. Error bars indicate means with standard deviations. **(C1)** Conventional fluorescence microscopy image of a Lewy neurite (black arrowhead) immunostained for p.α-syn and neurofilaments (NF). **(C2)** Two-Colour STORM image of the same area showing p.α-syn dense aggregates bounded by neurofilaments (enlarged in 3). Note the unaffected axon with normal calibre (white arrowhead)

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

both ALS and FTLD associates the cytoplasmic toxicity of aggregated TDP-43 and the nuclear loss of function of the protein. In frontal cortical sections from a control subject, STORM imaging revealed the presence of dense nuclear TDP-43 clusters, whereas other nuclear zones were unstained, whereas the TDP-43 signal appeared diffuse and heterogeneous in conventional wide field fluorescence microscopy (Figure 6A, Figure S8). NCI and DN imaging with STORM in frontal and temporal cortex of patients affected with FTLD revealed compact and granular cytoplasmic structures, slightly denser and less reticulated than p.Tau and p.α-syn aggregates (Figure 6B,C, Figure S8). Interestingly, empty vacuoles were also defined in the core of NCI and DN, suggesting again the presence of additional unstained components within these aggregates. Thus, STORM imaging of TDP-43 allowed to resolve the physiological distribution of the protein in the nuclear compartment, and its spatial organization within pathological cytoplasmic aggregates.

Discussion

In this work, we combined super resolution microscopy and neuropathological techniques to analyse human brain sections. This strategy characterized with a <50 nm resolution the architecture of physiological structures such as axons and synapses, and imaged with unprecedented details Aβ, Tau, α-synuclein and TDP-43 pathological aggregates in samples from patients affected with neurodegenerative disorders.

To date, the main approach to image nanoscopic structures in tissues relies on transmission electron microscopy, a time-consuming technique which requires ultrathin tissue sections (50-70 nm) with stringent sample preparation and limits immune-targeting diversity and 3D acquisition. Conversely, STORM offers the advantages of optical fluorescence microscopy with respect to sample preparation, vast observation fields, multiple molecular labelling and 3D acquisition, with image acquisition and reconstruction taking only a few minutes. The sample preparation workflow developed in this work for human brain tissue observation is timesaving and easily reproducible, as it is inspired by protocols routinely used for conventional fluorescence microscopy. It can be used on samples stored in a brain bank, with reagents and antibodies commonly used in clinical neuropathology departments and neuroscience research laboratories.

Nevertheless, performing STORM on human brain samples requires fine adjustments to generate high resolution images. Two major issues when imaging tissue sections are tissue autofluorescence and sample-induced aberrations that can distort and blur single-molecule emission patterns. Here, to limit optical artefacts and reduce the background generated by fluorophores located outside the focal plane, we used 5 µm thin tissue sections and a TIRF illumination [23], where the incident laser beam is reflected at the coverslip and the sample is excited by the resulting evanescent wave. Imaging thicker brain sections could be considered but will require complementary techniques such as adaptive optics-based correction, self-interferences (SELFI) method or tissue clearing, to avoid excessive background and aberrations [24-26]. Sample preparation and immunostaining are also critical, the used fluorophores requiring high photoswitching kinetics and sufficient brightness to be detected properly. In this work, we used AF 647 and AF 532, as they exhibit appropriate photoswitching characteristics in antioxidant reagents. They also have long excitation and emission wavelengths, thus limiting background signal from tissue autofluorescence. Primary antibodies routinely used for immunostaining in clinical neuropathology departments have been used here for STORM, but the protocol can be adapted to smaller tags (fluorescent probes or primary antibodies directly conjugated with fluorophores) which would reduce linker length errors during the localization procedure.

To date, STORM has mainly been used to image nanoscale structures in cultured cells. However, the technique has recently been extended to rodent brain sections for histological analysis. As in our study, two-colour STORM allowed visualization of the molecular architecture of synapses, accurately identifying pre and postsynaptic protein clusters and defining their size, morphology and orientation [8,27-29]. STORM was also used to image pathological Aβ aggregates in mouse models of Alzheimer's disease, leading to results comparable to ours in human, both for plaque morphologies and Aβ fibril widths, ranging from 50 to 300 nm [25,30]. Finally, STORM imaging of α-synuclein aggregates in a mouse model of Parkinson disease allowed to visualize α-synuclein aggregation in dopaminergic neurons [31], although the inclusions remained scattered and unstructured and no Lewy bodies were observed. These last results underline the

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

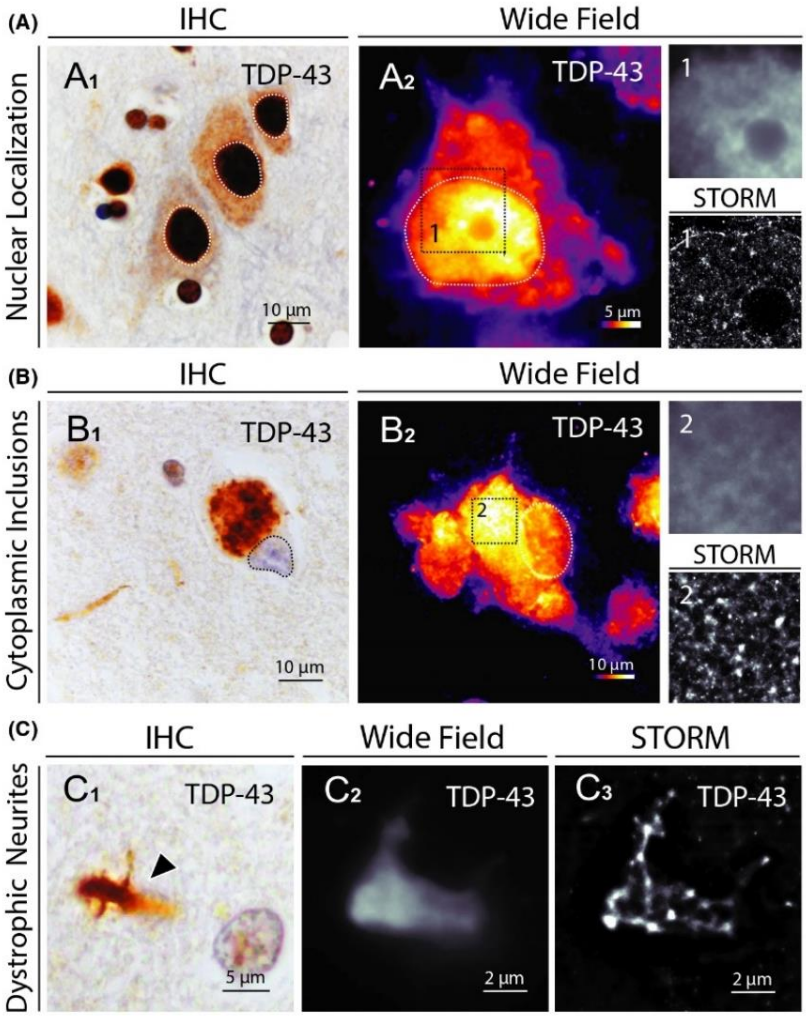


Figure 6. STORM images of TDP-43 aggregates in FTLD brain samples. **(A1)** Representative image of normal TDP-43 localization in cortical neurons (immunohistochemical detection of TDP-43 in the prefrontal cortex of a control subject). **(A2)** Conventional fluorescence microscopy image of TDP-43 distribution in a nondegenerating neuron in the prefrontal cortex of the same subject (signal intensity scale ranging from 1 to 254 UI). Nuclear compartments are defined with dotted lines. The insets (1) show close-up details of TDP-43 distribution within the nucleus as assessed by conventional wide field fluorescence microscopy (up) and STORM (down). **(B1)** Representative image of TDP-43 cytoplasmic inclusions in a cortical neuron (immunohistochemical detection of TDP-43 in the prefrontal cortex of a FTLD patient). **(B2)** Conventional fluorescence microscopy image of TDP-43 distribution in a degenerating neuron in the prefrontal cortex of the same patient (signal intensity scale ranging from 1 to 254 UI). Nuclear compartments are defined with dotted lines. The insets (2) show close-up details of TDP-43 aggregate as assessed by conventional wide field fluorescence microscopy (up) and STORM (down). **(C)** Representative light microscopy, wide field fluorescence microscopy and STORM images of TDP-43 aggregates in dystrophic neurites (black arrowhead in C1) in the prefrontal cortex of a FTLD patient

relevance of human brain analyses for studying the architecture and composition of pathological inclusions that cannot be induced in models.

To date, a single study reported STORM imaging on human brain tissue to visualize neurofilaments, myelin and astroglial processes within subcortical white matter [9]. This study found axonal diameters in the same range as our measurements and TEM values, highlighting the reliability and reproducibility of the technique. Nevertheless, the authors faced limitations in sample preparation, hindering multiple immunostaining and limiting STORM acquisition to the white matter.

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

Conversely, the protocol developed in this study allowed us to observe physiological and pathological structures in multiple areas of the human brain with a nanometre-scale precision.

The ultrastructural analysis of neuronal lesions is crucial to understand the pathogenesis and progression of neurodegenerative diseases. In this context and with the aim of improving neuropathological analyses, the development of novel imaging approaches is a current challenge in neuroscience. For instance the use of 3D multicolour STED microscopy correlative light and electron microscopy (CLEM) to analyse post mortem human brain tissue recently highlighted that Lewy bodies show an onion skin-like architecture with a Ser129-p aSyn external layer, and contain crowded membranous material from vesicles and fragmented organelles [32,33]. Moreover, these techniques allowed to identify different pathological phenotypes of Lewy bodies within the CNS of the patients, which may reflect intracellular maturation stages of Lewy pathology [33]. Likewise, another new approach based on biochemical isolation of pathological TDP-43 recently provided evidence that aggregates extracted from patients with different subtypes of FTLD exhibited distinct morphological features and composition [34]. All these results indicate that the clinical and pathological heterogeneity observed in neurodegenerative disorders could originate from alternate ultrastructure and composition of neuronal lesions.

Conclusions

By revealing novel structures and features that had not been previously visualized, STORM imaging of fixed human tissue samples opens further gates to a more comprehensive understanding of the human brain organization and revelations about the underlying mechanisms responsible for common neurological diseases. The convenience of this technique should open a straightforward extension of STORM applications for super-resolution imaging of human brain samples, with promising new avenues to current challenges in neuroscience.

Acknowledgments

The authors are grateful to the donors and their families. We also thank Dr Khalid Hamid El Hachimi for providing biopsies for electron microscopy, and C. Dumez, I. Viau and L. Denechaud for technical assistance. We thank J.-B. Sibarita, R. Galland and F. Cordelières (University of Bordeaux, France) for technical assistance. This work was supported by the University Hospital of Angers (Grant No 2019-264900_036), the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM Research Fellow 2017–2019) and the European Regional Development Fund (ERDF).

Ethical Approval

The use of human biological samples in this study has been given ethical approval by the regional ethics committee West II (biological resource centre national identifier BB-0033-00038, declaration number DC-2011-146). The study protocol has been declared to the French commission for information technology and civil liberties (declaration number ar19-0012v0).

Author Contributions

P.C. initiated and led all aspects of the project, conducted the experiments, analysed data and wrote the manuscript. A.C. and F.L. supervised the project. A.C. optimized the imaging protocol. F.L., L.R., C.D. and J.P.J. helped in developing the tissue preparation method. S.M. conducted TEM acquisitions. P.C., F.L., S.M., L.R., M.D., C.V., G.L., C.D., J.-P.J., J.C. and A.C. proofread the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no Conflict of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

1 Toomre D, Bewersdorf J. A new wave of cellular imaging. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010; **26**: 285–314
2 Baddeley D, Bewersdorf J. Biological insight from super-resolution microscopy: What we can learn from localization-based images. *Annu Rev Biochem.* 2018; **87**: 965–989

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

3 Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, Eggeling C, Sauer M, Biehlmaier O et al Super-resolution microscopy demystified. *Nat Cell Biol.* 2019; **21**: 72–84
4 Sigal YM, Zhou R, Zhuang X. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy. *Science* 2018; **361**: 880–887
5 Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods.* 2006; **3**: 793–795
6 Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS et al Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 2006; **313**: 1642–1645
7 Xu K, Zhong G, Zhuang X. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* 2013; **339**: 452–456
8 Dani A, Huang B, Bergan J, Dulac C, Zhuang X. Super-resolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron* 2010; **68**: 843–856
9 Hainsworth AH, Lee S, Foot P, Patel A, Poon WW, Knight AE. Super-resolution imaging of subcortical white matter using stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) and super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2018; **44**: 417–426
10 Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW et al National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol.* 2012; **123**: 1–11
11 Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003; **24**: 197–211
12 Mackenzie IR, Neumann M, Baborie A, Sampathu DM, Du Plessis D, Jaros E et al A harmonized classification system for FTLD-TDP pathology. *Acta Neuropathol.* 2011; **122**: 111–113
13 Kechkar A, Nair D, Heilemann M, Choquet D, Sibarita JB. Real-time analysis and visualization for single-molecule based super-resolution microscopy. *PLoS One* 2013; **8**: e62918
14 Izeddin I, Boulanger J, Racine V, Specht CG, Kechkar A, Nair D et al Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Opt Express.* 2012; **20**: 2081–2095
15 Gustafsson N, Culley S, Ashdown G, Owen DM, Pereira PM, Henriques R. Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. *Nat Commun.* 2016; **7**: 12471
16 Androuin A, Potier B, Nägerl UV, Cattaert D, Danglot L, Thierry M et al Evidence for altered dendritic spine compartmentalization in Alzheimer's disease and functional effects in a mouse model. *Acta Neuropathol.* 2018; **135**: 839–854
17 Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* 2008; **319**: 810–813
18 Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem.* 1999; **47**: 719–730
19 Braak H, Del Tredici K. Invited article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2008; **70**: 1916–1925
20 Arima K, Hirai S, Sunohara N, Aoto K, Izumiyama Y, Uéda K et al Cellular co-localization of phosphorylated tau- and NACP/alpha-synuclein-epitopes in lewy bodies in sporadic Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Res.* 1999; **843**: 53–61
21 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. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; **351**: 602–611
22 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* 2006; **314**: 130–133
23 Boulanger J, Gueudry C, Münch D, Cinquin B, Paul-Gilloteaux P, Bardin S et al Fast high-resolution 3D total internal reflection fluorescence microscopy by incidence angle scanning and azimuthal averaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; **111**: 17164–17169
24 Bon P, Linarès-Loyez J, Feyeux M, Alessandri K, Lounis B, Nassoy P et al Self-interference 3D super-resolution microscopy for deep tissue investigations. *Nat Methods.* 2018; **15**: 449–454
25 Mlodzianoski MJ, Cheng-Hathaway PJ, Bemiller SM, McCray TJ, Liu S, Miller DA et al Active PSF shaping and adaptive optics enable volumetric localization microscopy through brain sections. *Nat Methods.* 2018; **15**: 583–586
26 Gustavsson AK, Petrov PN, Moerner WE. Light sheet approaches for improved precision in 3D localization-based super-resolution imaging in mammalian cells. *Opt Express.* 2018; **26**: 13122–13147
27 Schoen M, Reichel JM, Demestre M, Putz S, Deshpande D, Proepper C et al Super-resolution microscopy reveals presynaptic localization of the ALS/FTD related protein FUS in hippocampal neurons. *Front Cell Neurosci.* 2016; **9**: 496
28 Sigal YM, Speer CM, Babcock HP, Zhuang X. Mapping synaptic input fields of neurons with super-resolution imaging. *Cell* 2015; **163**: 493–505
29 Dudok B, Barna L, Ledri M, Szabó SI, Szabadits E, Pintér B et al Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling. *Nat Neurosci.* 2015; **18**: 75–86
30 Yuan P, Condello C, Keene CD, Wang Y, Bird TD, Paul SM et al TREM2 haplodeficiency in mice and humans impairs the microglia barrier function leading to decreased amyloid compaction and severe axonal dystrophy. *Neuron* 2016; **90**: 724–739

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

31 Wegrzynowicz M, Bar-On D, Calo' L, Anichtchik O, Iovino M, Xia J et al Depopulation of dense α-synuclein aggregates is associated with rescue of dopamine neuron dysfunction and death in a new Parkinson's disease model. *Acta Neuropathol.* 2019; **138**: 575–595
32 Shahmoradian SH, Lewis AJ, Genoud C, Hench J, Moors TE, Navarro PP et al Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat Neurosci.* 2019; **22**: 1099–1109
33 Moors TE, Maat CA, Niedieker D, Mona D, Petersen D, Timmermans-Huisman E et al Subcellular orchestration of alpha-synuclein variants in Parkinson's disease brains revealed by 3D multicolor STED microscopy. *bioRxiv.* 2019; **470476**: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/470476v3.
34 Laferrière F, Maniecka Z, Pérez-Berlanga M, Hruska-Plochan M, Gilhespy L, Hock EM et al TDP-43 extracted from frontotemporal lobar degeneration subject brains displays distinct aggregate assemblies and neurotoxic effects reflecting disease progression rates. *Nat Neurosci.* 2019; **22**: 65–77

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Figure S1. Sample preparation workflow for STORM acquisition. (a) Cryopreserved brain samples (black arrowhead) were cryo-sectioned at −20°C into 5 µm thick sections and retrieved onto 22 × 22 mm^2 N°1 cover glasses. (b) Once the sample immunostained, the cavity of a clean single depression slide was filled with 50 µl of switching buffer (black arrowhead) and covered by the coverslip. (c) Excess buffer was then carefully wiped away, and the coverslip was sealed on the slide with a two-component silicone-glue.
Figure S2. Detailed microscope setup used for STORM imaging. (a) Inverted motorized microscope NIKON ECLIPSE Ti-E. (b) Central computer equipped with Metamorph 7.7 software. (c) Dark heating chamber. (d) Evolve 128TM EMCCD camera. (e) Andor NEO sCMOS camera. (f) Anti-vibration table. (g) LED bench. (h) Piezoelectric driver system. (i) Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) module. (j) Laser bench.
Figure S3. Conventional wide field fluorescence and STORM imaging of the same axonal process. (A1) Wide field fluorescence image of a longitudinally sectioned axon immunostained for neurofilaments (NF) in prefrontal cortex. (A2) STORM image of the same area. (B) Representation of the cross-sectional profiles (dotted lines in a) through axonal process. Grey values are normalized from 0 (minimum grey value) to 1 (maximum grey value). Error bars indicate mean with standard error, n = 8 measures per image.
Figure S4. Individual colour channel sequences of the composite images in Figure 2B,C.
Figure S5. Individual colour channel sequences of the composite images in Figure 3B.
Figure S6. (A) Conventional wide field fluorescence and STORM imaging of the same amyloid plaque. (B) Aβ fibrils width in senile plaques measured in STORM images.
Figure S7. Individual colour channel sequences of the composite images in Figure 5B.
Figure S8. Delimitation of the nuclear compartment in neurons (Figure 6A,B) using Lamin A/C signal.
Table S1. Controls and patients clinical and pathological characteristics.
Table S2. Antibodies and reagents.
Table S3. Apparent diameters of longitudinally sectioned prefrontal cortex axons acquired with conventional wide field fluorescence microscopy, stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), and transmission electron microscopy (TEM).
Table S4. Areas of transversally sectioned prefrontal cortex axons acquired with conventional wide field fluorescence microscopy, stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), and transmission electron microscopy (TEM).
Video S1. STORM imaging of a cortical axon in a human brain section immunostained for neurofilaments.
Video S2. 3DSTORM imaging of a cortical axon in a human brain section immunostained for neurofilaments.
Video S3. Representative STORM acquisition of a structure with high-density emitting fluorophores (cortical Lewy body immunostained for α-synuclein).

Received 25 April 2020
Accepted after revision 12 July 2020
Published online Article Accepted on 20 July 2020

© 2020 The Authors. Neuropathology and Applied Neurobiology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society

BRIEF REPORT

Stochastic Optical Reconstruction Microscopy Imaging of Multiple System Atrophy Inclusions Suggests Stepwise α-Synuclein Aggregation

Benoît Vovard, MD, MS,[1,2] Alexia Bodin, PhD,[1,2] Julien Gouju, PharmD, PhD,[2,3] Adrien de Guilhem de Lataillade, MD, PhD,[4,5] Pascal Derkinderen, MD, PhD,[4,5] Frédérique Etcharry-Bouyx, MD, PhD,[6] Valérie Chauviré, MD,[6] Virginie Guillet-Pichon, MD, PhD,[6,7] Christophe Verny, MD, PhD,[1,7] Franck Letournel, MD, PhD,[2,3] Guy Lenaers, PhD,[1,7] Arnaud Chevrollier, PhD,[1] and Philippe Codron, MD, PhD[1,2*]

[1]*Univ Angers, Equipe MitoLab, Unité MitoVasc, Inserm U1083, CNRS 6015, SFR ICAT, Angers, France* [2]*Laboratoire de neurobiologie et neuropathologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France* [3]*MINT, UMR Inserm 1066, CNRS 6021, Angers, France* [4]*Université de Nantes, Inserm, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Nantes, France* [5]*Service de Neurologie, CHU Nantes, Inserm U1235 Nantes, Nantes, France* [6]*Service de Neurologie, centre mémoire de ressource et de recherche, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France* [7]*Service de Neurologie, centre de référence des maladies neurogénétiques, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France*

ABSTRACT: Background: The architecture and composition of glial (GCI) and neuronal (NCI) α-synuclein inclusions observed in multiple system atrophy (MSA) remain to be precisely defined to better understand the disease.

Methods: Here, we used stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) to characterize the nanoscale organization of glial (GCI) and neuronal (NCI) α-synuclein inclusions in cryopreserved brain sections from MSA patients.

Results: STORM revealed a dense cross-linked internal structure of α-synuclein in all GCI and NCI. The internal architecture of hyperphosphorylated α-synuclein (p-αSyn) inclusions was similar in glial and neuronal cells, suggesting a common aggregation mechanism. A similar sequence of p-αSyn stepwise intracellular aggregation was defined in oligodendrocytes and neurons, starting from the perinuclear area and growing inside the cells. Consistent with this hypothesis, we found a higher mitochondrial density in GCI and NCI compared to oligodendrocytes and neurons from unaffected donors ($P < 0.01$), suggesting an active recruitment of the organelles during the aggregation process.

Conclusions: These first STORM images of GCI and NCI suggest stepwise α-synuclein aggregation in MSA. © 2024 The Authors. *Movement Disorders* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of International Parkinson and Movement Disorder Society.

Key Words: multiple system atrophy; Parkinson's disease; dementia with Lewy bodies; STORM; α-synuclein

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

*Correspondence to: Dr. Philippe Codron, Service de Neurologie, CHU d'Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France; E-mail: philippe.codron@chu-angers.fr

Relevant conflicts of interest/financial disclosures: The authors report no competing interests with respect to the contents of this manuscript.

Funding agencies: This work was funded by the University Hospital of Angers (21_0266_1), the University of Angers, and the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm).

Received: 22 September 2023; **Revised:** 9 January 2024; **Accepted:** 30 January 2024

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/mds.29744

Introduction

Multiple system atrophy (MSA) is a rare adult-onset disease clinically characterized by progressive parkinsonism, cerebellar dysfunction, and autonomic failure[1] because of glial and neuronal degeneration in the cerebral cortex, basal ganglia, brainstem, and cerebellum. The presence of cytoplasmic inclusions highly immunoreactive for hyperphosphorylated α-synuclein (p-αSyn) in the central nervous system (CNS) of patients is a pathological MSA hallmark.[2-4] MSA is, therefore, considered as a synucleinopathy. Besides MSA, Lewy body diseases (LBD), which include Parkinson's disease (PD) and dementia with Lewy bodies (DLB), are the other major members of the synucleinopathies characterized by neuronal p-αSyn aggregates called Lewy bodies (LB). Compared to LBD, the pathological inclusions observed in MSA show distinctive features. First, the cellular tropism of p-αSyn aggregates differs from that of LBD because cytosolic inclusions can be observed not only in neuronal cells (NCI), but also in glial cell (GCI). Furthermore, in contrast to LB, GCI and NCI

are Gallyas-positive,[5] which is specific for argentophilic inclusion, suggesting distinct architecture and composition. Finally, differences in the structure and seeding activity of α-synuclein fibrils from MSA and LBD patients have been demonstrated using cryo-electron microscopy and amplification-based approaches.[6-9]

All these differences suggest that the clinical and pathological heterogeneity observed in synucleinopathies result from alternative architectures and compositions of pathological inclusions, which remain to be precisely defined. We recently showed that the super-resolution imaging technique called stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) was able to reveal the nanoscale organization of pathological aggregates in human brain sections.[10] We, therefore, used this approach to characterize the ultrastructure of glial and neuronal inclusions in MSA.

Materials and Methods

Brain Tissue Samples

Among the 284 subjects autopsied at the Angers Neuropathology Department between 2005 and 2021, 24 patients with a final diagnosis of synucleinopathy were identified using a dedicated DataBase Management System (DBMS).[11] Immunohistochemistry slides from 20 standardized supra- and sub-tentorial regions were reviewed to assess the p-αSyn burden in each of the 24 patients using a semi-quantitative scale (0: absent; +: low; ++: intermediate; +++: high). Five MSA patients with a typical clinical course, elevated cortical and subcortical burden, and no concomitant proteinopathy were selected for single-molecule localization microscopy analysis. Five patients with LBD and two individuals without α-synuclein pathology were included as controls. The characteristics of the cases and controls are reported in Table 1.

Immunofluorescence Staining and STORM Imaging

Cryopreserved brain samples were cryosectioned at −20°C into 10-µm thick sections and mounted on 22 × 22 mm^2 No 1 coverslips. The sections were then fixed in 4% paraformaldehyde, blocked, and permeabilized in 0.1% Triton X-100 and 5% bovine serum albumin and incubated overnight at 4°C with appropriate primary antibodies diluted in blocking solution. The next day, sections were washed and incubated with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies diluted in blocking solution for 1 hour 30 minutes at room temperature (RT), counterstained with Hoechst for 5 minutes, and washed three times in phosphate-buffered saline. For STORM acquisitions, 50 µL of switching buffer was added to the cavity of a clean single-well slide and covered with a coverslip. The slide was placed on the stage of an inverted motorized microscope NIKON ECLIPSE Ti-E (Nikon Instruments Europe, Amsterdam, The Netherlands) equipped with a CFI SR APO total internal reflection fluorescence (TIRF) 100× ON1.49 objective, a perfect focus system, a TIRF ILas2 module (Roper Scientific, Martinsried, Germany), and a single-photon sensitive camera Evolve 128TM EMCCD 512 × 512 imaging array (Photometrics, AZ). Neurons and oligodendrocytes were identified by their nuclei and neuronal nuclei (NeuN) or myelin basic protein (MBP) staining. A multichannel conventional fluorescence microscopy image was first acquired. The excitation power of either the 647 or 568 nm laser line was then sharply increased to induce fluorophore blinking and to perform STORM imaging. Images were acquired using Wavetracer software (Molecular Devices, CA). A super-resolution radial fluctuation (SRRF) analysis approach was used for image reconstruction.[12] ImageJ software[13] was used for image processing and measurements. Reticulation areas (areas of the unstained cores) were measured in $µm^2$ as in Codron et al.[10] For LBs, the unstained central core was not included in the analysis. Mitochondrial density was automatically assessed using the Mitochondria Analyzer plug-in.[14] References and dilutions of antibodies and reagents are listed in Supplementary Table S1.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using PRISM software version 8.0.1 for Windows (GraphPad, La Jolla, CA). Comparisons of means were performed using Student's *t* test for two group analysis and one-way analysis of variance for multiple group analysis, after testing for normal distribution and homoscedasticity of the data using the Shapiro–Wilk test. In the absence of normal distribution, the nonparametric Mann–Whitney *U* test was used for two group analysis and the Kruskal-Wallis test for multiple group analysis. Spearman's rank correlation test was used to assess the relationship between variables. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

STORM Reveals Reticular Conformation of α-Synuclein Inclusions in MSA

To characterize the subcellular immunoreactivity patterns of glial and neuronal protein inclusions in MSA, conventional fluorescence microscopy and STORM were performed on post-mortem CNS samples. In line with previous findings,[4] immunohistochemical screening indicated high pathology in cortical (frontal, parietal, and entorhinal cortex) and subcortical regions (putamen, pontine nuclei, and substantia nigra) in MSA donors; we, therefore, used cryopreserved samples from

TABLE 1 *Cases and controls*

Subject	Identifier	Sex	Histological diagnosis	Age at diagnosis (years)	Age at death (years)	Post-mortem delay (h)	Cortical αSyn pathology	Subcortical αSyn pathology
MSA1	05N00001	M	Multiple system atrophy (OPCA)	60	66	6	+++	+++
MSA2	13N00087	F	Multiple system atrophy (SND)	70	74	18	++	+++
MSA3	14N00159	M	Multiple system atrophy (OPCA)	42	45	20	++	+++
MSA4	15N00017	F	Multiple system atrophy (SND)	52	57	36	++	+++
MSA5	21N00145	F	Multiple system atrophy (SND)	65	72	22	+++	+++
LBD1	18N00068	F	Parkinson's disease	48	57	14	+++	+++
LBD2	21N00292	M	Parkinson's disease	55	73	37	++	+++
LBD3	13N00013	M	Dementia with Lewy bodies	70	79	21	++	++
LBD4	15N00040	M	Dementia with Lewy bodies	54	64	23	+++	+++
LBD5	17N00238	M	Dementia with Lewy bodies	69	72	9	+++	+++
CTRL1	17N00233	M	Intracerebral hemorrhage	25	25	24	0	0
CTRL2	18N00117	F	Cardiorespiratory arrest	48	48	31	0	0

Abbreviations: αSyn, α-synuclein; CTRL, control; F, female; LBD, Lewy body diseases; M, male; MSA, multiple system atrophy; OPCA, olivopontocerebellar atrophy; SND, striatonigral degeneration. αSyn pathology was assessed using a semi-quantitative scale: 0: absent; +: low; ++: intermediate; +++: high.

these anatomical regions for further analysis. Both GCI and NCI were first imaged by conventional immunofluorescence microscopy. The aggregates were strongly immunoreactive for p-αSyn (phospho-Ser129) and consisted of homogeneous intracytosolic inclusions of various sizes (Fig. 1A). STORM images revealed a dense cross-linked internal structure not seen by conventional fluorescence microscopy in all GCI (n = 59) and NCI (n = 19) imaged (Fig. 1A, Supplementary Figs. S1 and S2). There was no difference in inclusion architecture between GCI and NCI as assessed by reticulation areas ($P = 0.140$), either by cortical or subcortical localization ($P = 0.107$ and $P = 0.114$, respectively) (Fig. 1B,C). There was no correlation between reticulation density within inclusions and age at death or disease duration ($P = 0.322$ and $P = 0.256$, respectively).

Then, we compared the ultrastructure of GCI and NCI with brainstem LB (n = 22) from LBD patients. In contrast to GCI and NCI, LB imaged by conventional microscopy appeared as organized intraneuronal inclusions with an unstained core surrounded by a dense ring-shaped halo (Fig. 1A). STORM images precisely defined the internal architecture of LB with a peripheral ring of reticulated p-αSyn and a lack of staining in the central core. The mean reticulation area was significantly higher in LB compared to GCI and NCI ($P < 0.01$), demonstrating a distinct p-αSyn organization within the two types of aggregates (Fig. 1C).

STORM Suggests Stepwise Intracellular Aggregation of α-Synuclein in MSA with Mitochondrial Trapping

As mentioned above, GCI and NCI imaged with STORM were of various shapes and sizes in glial and neuronal cells. However, perinuclear anchoring was

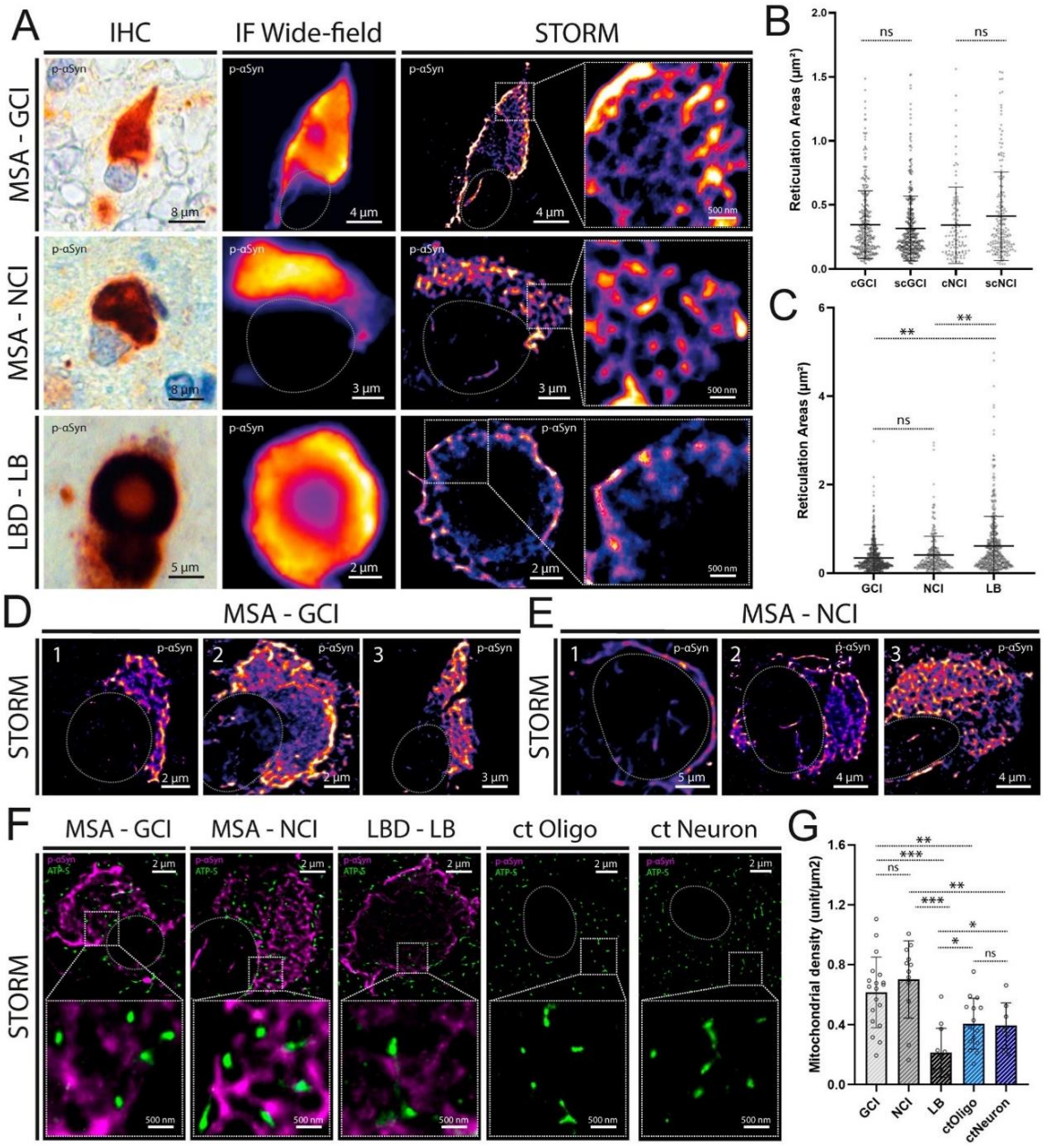


FIG. 1. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) imaging of multiple system atrophy inclusions suggests stepwise α-synuclein aggregation in glial cytoplasmic inclusions (GCI) and neuronal cytoplasmic inclusion (NCI). (**A**) Conventional immunohistochemistry (IHC) immunofluorescence (IF) and STORM microscopy of GCI, NCI, and Lewy bodies (LB) in post-mortem brain samples from multiple system atrophy (MSA) and Lewy body disease (LBD) patients stained for hyperphosphorylated α-synuclein (p-αSyn). IHC and IF show typical triangular GCI, reniform NCI, and the pale core and dense halo of LB. STORM images of the same inclusions reveal the reticular organization of p-αSyn within the aggregates. Nuclei are delimited by dotted lines. (**B**) Mean reticulation area of cortical (c) versus subcortical (sc) p-αSyn inclusion in MSA. Error bars indicate mean with standard deviation. ns: not significant. (**C**) Mean reticulation area of each type of p-αSyn inclusion in synucleinopathies. Error bars indicate mean with standard deviation. $^{**}P < 0.01$, ns: not significant. (**D**,**E**) Representative STORM images of GCI and NCI in post-mortem brain samples from MSA patients immunostained for p-αSyn suggesting stepwise α-synuclein aggregation. Small perinuclear inclusions (**D**1,**E**1) appear to extend to intermediate cytoplasmic aggregates (**D**2,**E**2) and then to typical triangular GCI (**D**3) or reniform NCI (**E**3) inclusions. Nuclei are delimited by dotted lines. (**F**) Representative STORM images of GCI, NCI, LB, and control glial and neuronal cytosols in post-mortem brain samples from MSA and LBD patients and subjects without neurodegenerative disease, immunostained for p-αSyn (magenta) and ATP synthase (ATP-S, green). Glial and neuronal mitochondria appear embedded in reticulated p-αSyn scaffolds. Nuclei are delimited by dotted lines. (**G**) Mitochondrial density in GCI, NCI, LB, control oligodendrocytes, and control neurons. Error bars indicate mean with standard deviation. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, ns: not significant. Abbreviations: ctOligo, control oligodendrocyte; ctNeuron, control neuron. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

observed in all 46 GCI and 15 of 18 NCI. Therefore, we hypothesized that the subcellular phenotypes of p-αSyn aggregates reflect different maturation stages of MSA pathology, starting from the perinuclear area and growing inside the cells to finally form either typical triangular-shaped GCI or reniform-shaped NCI. This temporal sequence of p-αSyn aggregation in glial and neuronal cells is illustrated in Figure 1D,E.

Given the reticulated organization of p-αSyn in GCI and NCI, we hypothesized that intracellular organelles such as mitochondria might be trapped within the unstained parts of the aggregates, as previously described in LB.[15,16] To this end, we performed two-color STORM using anti-p-αSyn and anti-ATP synthase (a mitochondrial inner membrane marker) antibodies to image GCI and NCI. Glial and neuronal mitochondria appeared embedded in reticulated p-αSyn scaffolds, densely and harmoniously distributed within the inclusions (Fig. 1F). There was no correlation between mitochondrial density and reticulation area or reticulation density ($P = 0.961$ and $P = 0.315$, respectively), and no difference was observed in mitochondrial density between GCI and NCI ($P = 0.348$) (Fig. 1G). The latter parameter was significantly lower in LB compared to the other inclusions ($P < 0.001$) (Fig. 1G), because mitochondria were seen between the reticulations of the peripheral halo, but were absent from the core (Fig. 1F). Conversely, mitochondrial density was significantly higher in GCI and NCI compared to oligodendrocytes and neurons from unaffected donors ($P < 0.01$) (Fig. 1F,G), supporting the hypothesis of a stepwise intracellular aggregation of α-synuclein in MSA with active trapping of nearby mitochondria. Additionally, in favor was that the mitochondrial density within the same cell was higher in GCI and NCI than in the cytoplasm ($P < 0.001$).

Discussion

In this study, we characterized for the first time the ultrastructure of glial and neuronal p-αSyn inclusions in post-mortem brain samples from MSA patients with STORM. This approach revealed a dense and homogenous reticular organization of p-αSyn in both GCI and NCI, which was not seen by conventional microscopy. These observations are in addition to previous results obtained with transmission electron microscopy disclosing glial and neuronal cytoplasmic inclusions as dense fibrillar structures.[17,18] The specific immunolabeling used in STORM provides additional information by distinguishing p-αSyn from other molecules and organelles within the aggregates, therefore, revealing its self-organization.

The internal architecture of p-αSyn inclusions was similar in glial and neuronal cells, suggesting common aggregating mechanism. Furthermore, a similar sequence of p-αSyn aggregation was defined in oligodendrocytes and neurons, starting from the perinuclear area and growing inside the cells to finally form characteristic GCI or NCI. We postulate that these sequences characterize different maturation stages in cells, based on a stepwise intracellular aggregation of α-synuclein. Consistent with this hypothesis, we found a higher mitochondrial density in GCI and NCI compared to oligodendrocytes and neurons from unaffected donors, suggesting an active recruitment of the highly dynamic organelles during the aggregation process rather than a stochastic and passive trapping of mitochondria. In line with this, we also found that the mitochondrial density was higher in the GCI or the NCI of affected cells than in their cytoplasm. One possible interpretation is that α-synuclein acts as a mitochondrial membrane tether, actively embedding nearby mitochondria into the developing inclusion. In addition, the resulting disruption of the mitochondrial dynamics is expected to contribute to glial and neuronal degeneration because of mitochondrial dysfunction. The active targeting of α-synuclein by mitochondria and the partners involved in this process remain to be elucidated.

Although the prion-like properties of α-synuclein have been well described in MSA,[19-21] leading to the hypothesis of cell-to-cell transmission within the CNS, the dynamics of the protein aggregation in cells remain to be clarified. Specifically, α-synuclein intracellular aggregation in MSA appears different from that observed in LBD patients. Indeed, based on LB super-resolution images from PD and DLB brain samples, Moors et al[15,16] suggested that diffuse and unstructured early α-synuclein inclusions in neurons gradually converge into compact and organized LB. Highly aggregated proteins and lipids are centralized at the core of the resulting inclusion, encapsulated by a peripheral reticulated framework of p-αSyn, cytoskeleton, and mitochondria, as also observed in our study. These differences in aggregate architecture and composition support distinct intracellular pathways in MSA and LBD, possibly related to the structure and seeding activity of α-synuclein strains, which are consistently different in these diseases.[6-9] Further studies in cellular and animal models are needed to complement these initial findings on the intracellular dynamics of α-synuclein in MSA, with the aim of better defining the disease pathophysiology. ●

Acknowledgments: We are grateful to the donors and their families and to C. Dumez, I. Viau, and L. Denechaud for technical assistance.

Ethical Approval Statement

All brain donors and their relatives gave informed consent for the use of brain tissue for research. Brain

tissue samples were stored at the Biological Resource Center of the University Hospital of Angers (national identifier, BB-0033-00038). The use of human biological samples in this study was ethically approved by the Regional Ethics Committee West II (Biological Resource Center national identifier, BB-0033-00038; declaration number, DC-2011-146). The study protocol has been declared to the French Commission for Information Technology and Civil Liberties (declaration number, AR21-0007v0). ■

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

1. Wenning GK, Stankovic I, Vignatelli L, et al. The Movement Disorder Society criteria for the diagnosis of multiple system atrophy. Mov Disord 2022;37:1131–1148.
2. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, et al. Alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. Nat Cell Biol 2002;4:160–164.
3. Trojanowski JQ, Revesz T, Neuropathology Working Group on MSA. Proposed neuropathological criteria for the post mortem diagnosis of multiple system atrophy. Neuropathol Appl Neurobiol 2007;33:615–620.
4. Cykowski MD, Coon EA, Powell SZ, et al. Expanding the spectrum of neuronal pathology in multiple system atrophy. Brain 2015;138:2293–2309.
5. Uchihara T, Nakamura A, Mochizuki Y, et al. Silver Stainings distinguish Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions: comparison between Gallyas-Braak and Campbell-Switzer methods. Acta Neuropathol 2005;110:255–260.
6. Schweighauser M, Shi Y, Tarutani A, et al. Structures of α-synuclein filaments from multiple system atrophy. Nature 2020;585:464–469.
7. Shahnawaz M, Mukherjee A, Pritzkow S, et al. Discriminating α-synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy. Nature 2020;578:273–277.
8. Yamasaki TR, Holmes BB, Furman JL, et al. Parkinson's disease and multiple system atrophy have distinct -synuclein seed characteristics. J Biol Chem 2019;294:1045–1058.
9. Van der Perren A, Gelders G, Fenyi A, et al. The structural differences between patient- derived α- synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies. Acta Neuropathol 2020;139:977–1000.
10. Codron P, Letournel F, Marty S, et al. STochastic optical reconstruction microscopy (STORM) reveals the nanoscale Organization of Pathological Aggregates in human brain. Neuropathol Appl Neurobiol 2021;47:127–142.
11. Journe-Mallet I, Gouju J, Etcharry-Bouyx F, et al. Design and application of a customizable relational DataBase to assess clinicopathological correlations and concomitant pathology in neurodegenerative diseases. Brain Pathol 2023;33:e13138.
12. Gustafsson N, Culley S, Ashdown G, Owen DM, Pereira PM, Henriques R. Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. Nat Commun 2016;7:12471.
13. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods 2012;9:676–682.
14. Chaudhry A, Shi R, Luciani DS. A pipeline for multidimensional confocal analysis of mitochondrial morphology, function, and dynamics in pancreatic β-cells. Am J Physiol Endocrinol Metab 2020;318:E87–E101.
15. Moors TE, Maat CA, Niedieker D, et al. The subcellular arrangement of alphasynuclein proteoforms in the Parkinson's disease brain as revealed by multicolor STED microscopy. Acta Neuropathol 2021;142:423–448.
16. Shahmoradian SH, Lewis AJ, Genoud C, et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. Nat Neurosci 2019;22:1099–1109.
17. Papp MI, Kahn JE, Lantos PL. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (Striatonigral degeneration, Olivopontocerebellar atrophy and shy-Drager syndrome). J Neurol Sci 1989;94:79–100.
18. Papp MI, Lantos PL. Accumulation of tubular structures in Oligodendroglial and neuronal cells as the basic alteration in multiple system atrophy. J Neurol Sci 1992;107:172–182.
19. Reyes JF, Rey NL, Bousset L, Melki R, Brundin P, Angot E. Alpha-synuclein transfers from neurons to oligodendrocytes. Glia 2014;62:387–398.
20. Mavroeidi P, Arvanitaki F, Karakitsou AK, et al. Endogenous oligodendroglial alpha- synuclein and TPPP/p25α orchestrate alpha-synuclein pathology in experimental multiple system atrophy models. Acta Neuropathol 2019;138:415–441.
21. Teil M, Dovero S, Bourdenx M, et al. Brain injections of glial cytoplasmic inclusions induce a multiple system atrophy-like pathology. Brain 2022;145:1001–1017.

Supporting Data

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Bodin Alexia | Etude de la dynamique de la protéine TDP-43 en conditions physiologique et pathologique : implication et perspectives en recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique 218

Manuscripts submitted to Brain Communications

OXFORD UNIVERSITY PRESS | Brain Communications

Opa1 and MT-Nd6 mutations induce early mitochondrial changes in the retina and prelaminar optic nerve of hereditary optic neuropathy mouse models

Journal:	*Brain Communications*
Manuscript ID	BRAINCOM-2024-240.R1
Manuscript Type:	Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Bureau, Jacques ; Univ Angers, Equipe MitoLab, Unité MitoVasc, Inserm U1083, CNRS 6015, SFR ICAT, Angers, France; University Hospital Centre Angers, Neurology Manero, Florence; Université d'Angers, SFR-ICAT Baris, Olivier; Univ Angers, Equipe MitoLab, Unité MitoVasc, Inserm U1083, CNRS 6015, SFR ICAT, Angers, France Bodin, Alexia; Univ Angers, Equipe MitoLab, Unité MitoVasc, Inserm U1083, CNRS 6015, SFR ICAT, Angers, France Verny, Christophe; University Hospital Centre Angers, Neurology; Univ Angers, Equipe MitoLab, Unité MitoVasc, Inserm U1083, CNRS 6015, SFR ICAT, Angers, France Chevrollier, Arnaud; Univ Angers, Equipe MitoLab, Unité MitoVasc, Inserm U1083, CNRS 6015, SFR ICAT, Angers, France Lenaers, Guy; Université d'Angers, INSERM U1083, CNRS 6015, Equipe MitoLab, Unité MitoVasc Codron, Philippe; University Hospital Centre Angers, Neurology; Univ Angers, Equipe MitoLab, Unité MitoVasc, Inserm U1083, CNRS 6015, SFR ICAT, Angers, France
Keywords:	hereditary optic neuropathy, Leber hereditary optic neuropathy, dominant optic atrophy, mitochondria, Opa1, lamina cribrosa

SCHOLARONE™ Manuscripts

https://mc.manuscriptcentral.com/braincom

Opa1 and *MT-Nd6* mutations induce early mitochondrial changes in the retina and prelaminar optic nerve of hereditary optic neuropathy mouse models

Jacques Bureau,[1,2] Florence Manero,[3] Olivier Baris,[2] Alexia Bodin,[2] Christophe Verny,[2,4] Arnaud Chevrollier,[2] Guy Lenaers[2,4*] and Philippe Codron.[1,2,4*]

***These authors contributed equally to this work.**

For Review Only

Abstract

Hereditary optic neuropathies (HON), including dominant optic atrophy and Leber's hereditary optic neuropathy, are genetic disorders characterized by retinal ganglion cell (RGC) degeneration leading to vision loss, mainly associated with mitochondrial dysfunction. In this study, we analyzed mitochondrial distribution and ultrastructure in the retina and longitudinal optic nerve sections of presymptomatic HON mouse models with Opa1 and Nd6 deficiency to identify early mitochondrial changes. Our results show significant mitochondrial fragmentation and increased mitophagy in *Opa1*$^{+/-}$ mice, indicating early mitochondrial changes prior to neuronal loss. Conversely *Nd6*^{P25L} mice exhibited mitochondrial hypertrophy, suggesting an adaptive response to compensate for altered energy metabolism. These pre-symptomatic mitochondrial changes were mainly observed in the unmyelinated portion of the RGC axons, where the transmission of the visual information requires high energy expenditure, constituting the specific point of vulnerability in HON. These findings highlight early focal mitochondrial

changes prior to neuronal loss in HON and provide insight into presymptomatic therapeutic approaches.

Author affiliations:

1 Laboratoire de neurobiologie et neuropathologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France.

2 Univ Angers, Equipe MitoLab, Unité MitoVasc, Inserm U1083, CNRS 6015, SFR ICAT, Angers, France

3 Univ Angers, SCIAM Microscopy core facility, SFR ICAT, F-49000, Angers, France

4 Service de neurologie, centre de référence des maladies neurogénétiques, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France.

Correspondance to:

Dr Philippe CODRON, Orcid: 0000-0003-1745-8299

Service de neurologie, CHU d'Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France

Mail : Philippe.codron@chu-angers.fr

Tel: +33 2 41 35 79 33 - Fax: +33 2 41 35 62 14

Running title: Early mitochondrial changes in hereditary optic atrophy

Keywords: hereditary optic neuropathy, Leber hereditary optic neuropathy, dominant optic atrophy, mitochondria, Opa1, *lamina cribrosa*.

For Review Only

Abbreviations: DOA: dominant optic atrophy, HON: Hereditary optic neuropathy, LC: lamina cribrosa, LHON: Leber's hereditary optic neuropathy, ON: optic nerve, RGC: retinal ganglion cell, TEM: transmission electron microscopy.

Introduction

Hereditary optic neuropathies (HON) are genetic conditions characterized by a progressive or acute degeneration of the retinal ganglion cells (RGC) responsible for the loss of central vision.[1] Most HON are related to mitochondrial dysfunction, with mainly autosomal dominant or maternal inheritance patterns corresponding to dominant optic atrophy (DOA, MIM#165500) and Leber's hereditary optic neuropathy (LHON, MIM#535000). DOA is the most frequent form of HON, and is caused in most patients by mutations in the mitochondrial fusion gene *Opa1*.[2,3,4] LHON is associated with mutations in mitochondrial DNA encoding subunits of the respiratory chain complex I, mainly the m.3460G>A, m.11778G>A and m.14484T>C mutations in the *MT-ND1*, *MT-ND4* and *MT-Nd6* genes, respectively.[2,5,6]

Since DOA and LHON are associated with mutations in ubiquitous genes, the effect on mitochondrial dynamics and oxidative phosphorylation is likely to be systemic. However, both diseases primarily affect the optic nerve (ON), resulting in severe visual impairment. Identifying the susceptibility of RGCs to such mutations in *Opa1* or mitochondrial DNA is therefore essential to a fundamental understanding of these diseases.

The peculiar structure of the ON may provide a clue.[7] Indeed, since RGC axons are not myelinated in the eye, high energy expenditure is required to ensure optimal non-saltatory transduction of action potentials. Conversely, after crossing the *lamina cribrosa* (LC) of the ON, RGC axons become myelinated and action potentials are maintained in an energy-saving mechanism based on saltatory propagation between the nodes of Ranvier. Initial works have

Bodin Alexia | Etude de la dynamique de la protéine TDP-43 en conditions physiologique et pathologique : implication et perspectives en recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique 222

shown that in response to this difference in energy demand, mitochondria in RGCs are distributed differently on either side of the LC, with numerous mitochondria in the anterior part of the ON and sparse mitochondria posterior to the LC.[7,8,9]

In this study, we hypothesized that the high energy demand in the unmyelinated portion of RGC axons underlies their susceptibility to mutations that affect either mitochondrial dynamics in DOA or respiratory chain complex I in LHON, and may induce mitochondrial changes before neuronal loss. To this end, we studied the ultrastructure of mitochondria in the retina and throughout the emergence of the optic nerve of presymptomatic HON mouse models carrying mutations in the *Opa1* or *MT-Nd6* genes to identify early mitochondrial changes preceding RGC dysfunction and degeneration.

Material and methods

Mice models

Opa1$^{+/-}$ C57BL/6 mice carrying the recurrent *Opa1* c.2708_2711delTTAG mutation,[10] *Nd6*^{P25L} C57BL/6 mice carrying the *MT-Nd6* G14600A mutation[11] and C57BL/6 wild-type (WT) control mice were housed in clear plastic boxes in the animal facility of the SCAHU (Service commun d'animalerie Hospital-universitaire, Angers, France) and subjected to standard light cycles (12 h: 90 lux light, 12 h: dark). After being anaesthetised with isoflurane, *Opa1*$^{+/-}$ (n = 3 males and 3 females) *Nd6*^{P25L} (n = 3 males and 3 females) and WT (n = 3 males and 3 females) mice were sacrificed at 5 months old by decapitation to ensure a preserved structure of the optic nerves. Mice carrying mutations were considered presymptomatic at 5 months based on previous seminal studies by Sarzi et al. and Lin et al.[10,11]

Tissue preparation

For Review Only

Optic nerves were removed from the base of the skull, from the retrochiasmatic pathways to the eyeball and divided into two parts by cutting through the optic chiasm.[12] One optic nerve was fixed and frozen in isopentane/liquid nitrogen for immunofluorescence. The other optic nerve was immersed in a 0.1M pH 7.4 cacodylate fixative buffer containing 2% PFA and 2.5% glutaraldehyde for electron microscopy.

Immunofluorescence

After freezing in pre-cooled isopentane, optic nerves were cryosectioned at -20°C into 20-µm thick sections and mounted on 22 x 22 mm2 N°1 coverslips. The sections were then fixed in 4% paraformaldehyde, blocked and permeabilized in 0.1% Triton X-100 and 5% bovine serum albumin and incubated overnight at 4°C with appropriate primary antibodies diluted in blocking solution. The next day, sections were washed and incubated with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies diluted in blocking solution for 1 hour 30 minutes at RT, counterstained with Hoechst for 5 minutes, and washed three times in phosphate-buffered saline. Acquisitions were performed using a Zeiss Axioscop40 microscope equipped with an Axio-cam MRC5 camera, using AxioVisio 4.6 software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). References and dilutions of antibodies and reagents are listed in Supplementary Table 1.

Electron microscopy

Optic nerves were postfixed in 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium ferrocyanide for 2 hours at room temperature, and dehydrated in a graded series of ethanol concentrations, with an intermediate stain in 3% uranyl acetate in ethanol 70° for 1 hour at 4°C. After 2 baths in propylene oxide and 1 overnight bath containing both propylene oxide and Epon resin, tissues were embedded in Epon resin. Longitudinal sections were cut with an ultramicrotome UC7 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at 1 µm thickness for methylene blue + azure blue II

For Review Only

staining, 60 nm thickness for electron microscopy. Contrast staining was performed with 3% uranyl acetate in 50° ethanol for 15 minutes, rinsed on 3 drops of water, then with lead citrate for 3 minutes, and finally rinsed on 3 drops of water. Samples were analyzed with a JEOL JEM 1400 (JEOL, Tokyo, Japan) at 120 kV, at a 15.000x magnification and photographed with a GATAN ORIUS 832 camera. All samples were imaged in a standardized manner. The optic nerve was divided into 4 zones: (1) retina, (2) prelaminar ON (prior to the LC), (LC) LC (junction of the unmyelinated and myelinated fibers), and (3) retrolaminar (post-LC). A minimum of 10 images were taken in each zone at 15,000x magnification. Mitochondrial density, area and circularity were measured manually in all images using ImageJ software.[13]

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using PRISM software version 8.0 for Windows (GraphPad, La Jolla, CA). Comparisons of means were performed using the Mann-Whitney U test for two group analyses. Statistical significance thresholds were determined at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) values.

Study approval

All protocols carried out on animals were approved by the Animal Care and Use Committee Ministry of Higher Education, Research and Innovation and recorded under the reference DUO #10627. All efforts were made to minimize the number of used animals and their suffering, according to the European directive 2010/63/UE.

Results

For Review Only

Mitochondrial enrichment in the retina and prelaminar ON in physiological conditions

None of the mice in the 3 study groups showed any visual, neurological, or general symptom during the study, in agreement with their initial description.[10,11] Mice were sacrificed at 5 months for histologic examination of the optic nerves. In total, 900 images were acquired, and 21.894 mitochondria were analyzed. As previously reported, higher mitochondrial density was observed by immunofluorescence microscopy in the prelaminar ON compared to the retrolaminar ON in WT mice, where almost no mitochondrial staining was seen (Fig 1A). Similarly, TEM analysis showed that mitochondrial density (mitochondria/μm^2) was 2-fold higher in the pre-LC zone compared to the retrolaminar ON ($p < 0.001$, Fig 1B to 1D). Mitochondria also had a smaller area ($p = 0.0043$) in the retina and in the pre-LC area (Fig1C and 1E). Taken together, these results demonstrate that mitochondrial morphology and density differ between the unmyelinated and myelinated portions of the RGC under physiological conditions, supporting distinct dynamics and energy metabolism depending on the action potential transmission mode.

Mitochondrial fragmentation, increased mitophagy, and protein aggregation in the retina and prelaminar ON of presymptomatic *Opa1*$^{+/-}$ mice

We then analyzed the density and morphology of mitochondria on both sides of the LC in *Opa1*$^{+/-}$ mice carrying the most frequent *Opa1* mutation found in human DOA patients.[10] In the retina and the prelaminar ON of *Opa1*$^{+/-}$ mice, a major phenotype was already visible within axons with more mitochondria (/μm^2, $p = 0.002$) of smaller area ($p = 0.026$) compared to WT mice (Fig 2A to 2C), suggesting a fragmentation of the mitochondrial network. These features

For Review Only

were also observed in the retrolaminar ON although not significantly (p = 0.649 and p = 0.589 respectively). In addition, TEM images revealed numerous clusters of mitophagy in enlarged axons in the retina and prelaminar ON of *Opa1*$^{+/-}$ mice (Fig 2D). The density of these prelaminar clusters was significantly higher in *Opa1*$^{+/-}$ mice compared to WT mice (p=0.002), Fig 2E). No cluster was observed in the retrolaminar ON of the *Opa1*$^{+/-}$ mice. Finally, multiple protein aggregates were seen in the retina and prelaminar ON of *Opa1*$^{+/-}$ mice, which were not seen in the other genotypes (Fig 2F). These data indicate that the *Opa1* c.2708_2711delTTAG mutation causes pre-symptomatic mitochondrial changes in the anterior part of the ON, which are indicative of mitochondrial fragmentation, increased mitophagy and axonal transport defects.

Mitochondrial hypertrophy in the retina and throughout the optic nerve of pre-symptomatic *Nd6*^{P25L} mice

We next focused on the density and morphology of mitochondria in *Nd6*^{P25L} mice. No difference in mitochondrial density (mitochondria/µm^2) was observed between *Nd6*^{P25L} and WT mice in the retina and pre- and post-LC areas (p = 0.937, p = 0.783, and p = 0.621 respectively, Fig 3 A and 3B). However, mitochondria had a significantly larger area in *Nd6*^{P25L} mice compared to WT mice, on both sides of the LC, but more pronounced in the retina and the prelaminar ON (p = 0.002 and p = 0.004 respectively, Fig 3A and 3C). In contrast to *Opa1*$^{+/-}$ mice, no mitophagy cluster or protein aggregate was observed in the optic nerves of *Nd6*^{P25L} mice. These data indicate that the *MT-Nd6* mutation causes pre-symptomatic mitochondrial changes indicative of mitochondrial biogenesis or enhanced mitochondrial fusion, which are more pronounced in the anterior part of the ON.

For Review Only

Absence of mitochondrial alteration in astrocytes in the optic nerves of *Opa1*$^{+/-}$ and *Nd6*^{P25L} mice

Mitochondria from astrocytes were normal all along the optic nerve regardless of the mouse genotype. In addition, astrocytic mitochondria differed from those of axons in having a higher density of cristae (Supplementary Fig 1). These observations indicate that presymptomatic mitochondrial alterations are specific to pre-LC region of RGC in *Opa1*$^{+/-}$ and *Nd6*^{P25L} mice.

Discussion

In this study, we demonstrate early mitochondrial changes in the retina and the prelaminar ON of mouse models of hereditary optic atrophy carrying mutations in the *Opa1* and *MT-Nd6* genes. We first examined mitochondria longitudinally along RGC axons from the retina to the retrolaminar ON in wild-type mice. As previously reported, we observed a higher mitochondrial density in the retina and prelaminar ON, supporting the hypothesis that these unmyelinated sites require more mitochondrial oxidative phosphorylation and ATP to transmit visual information in a non-saltatory mode, constituting a specific point of vulnerability in HON. Based on this observation, we hypothesized that mutations affecting mitochondrial dynamics or metabolism result in early visible changes in the ON.

We first examined the retina and ON of presymptomatic mice carrying the *Opa1* c.2708_2711delTTAG mutation responsible for DOA in patients.[10] Opa1 is a mitochondrial protein that, together with Mfn1 and Mfn2, participates in mitochondrial fusion and maintains the integrity of the mitochondrial network.[14,15] Haploinsufficiency has been proposed as the predominant disease mechanism underlying *Opa1*-related DOA, as the majority of disease-causing variants result in premature translation termination.[16] Downregulation of *Opa1* in cells leads to fragmentation of the mitochondrial network with increased mitophagy.[17] Interestingly,

For Review Only

these features were observed in the retina and the anterior part of the ON in *Opa1*$^{+/-}$ mice at an early stage, before initiation of neuronal loss. Although located in a different prelaminar RGC region, our data parallel previous observations showing increased mitophagy and autophagosome accumulation at the RGC hillock associated with local activation of the AMPK-ULK1 axis.[18] We also observed protein aggregates within prelaminar RGC fibers, which could represent markers of axonal transport defects due to altered energy metabolism and/or mechanical congestion by mitophagy clusters.[19] This is an additional and, to our knowledge, undescribed mechanism of neuronal toxicity that may contribute specifically to neurodegeneration in HON diseases, especially since small-caliber axons show a higher vulnerability to *Opa1* mutation in an aged mouse model of DOA.[20] The nature of these proteins observed aggregated in the ON is important to define in future studies to better understand their origin and pathogenesis in DOA.

Examination of the optic nerve in *Nd6*^{P25L} mice also revealed early mitochondrial changes, strikingly, different from those found in *Opa1*$^{+/-}$ mice. Mitochondria were enlarged throughout the optic nerve, but more so in the retina and prelaminar ON. This hypertrophy, which has been reported in tissues from LHON mutation carriers,[21] may reflect increased mitochondrial biogenesis and metabolism to compensate for altered energy production due to the mutations of complex I subunits. We can also hypothesize that transport of hypertrophic mitochondria might be more compromized in small caliber axons than in larger ones, explaining why the former are more susceptible to dysfunction and degeneration than the latter. Our data are somehow divergent with previous studies that disclosed increased mitophagy in LHON cell lines, including IPS-derived neurons,[22] suggesting that according to the cell-type and environmental conditions, LHON mutations can display divergent mitochondrial and cellular phenotypes, although converging to a balance between mitochondrial degradation and biosynthesis. In any case, this mitochondrial adaptive response could maintain unaffected

For Review Only

mutation carriers until compensatory mechanisms are overcome, explaining the incomplete penetrance of LHON and the rapid visual impairment observed in the disease.[23,24] No mitophagy clusters or protein aggregates were observed, conversely to what was disclosed in *Opa1*$^{+/-}$ mice.

The early mitochondrial changes observed in the unmyelinated parts of RGC in mouse models of hereditary optic atrophy are reported here for the first time. Indeed, previous ultrastructural analyses of the optic nerve in mouse models with impaired Opa1, Nd4, or Nd6 function were performed on the post-laminar myelinated portion of the ON, with transverse sections, and at late time points after significant axonal loss.[10,11,25-30] The early and pronounced mitochondrial changes observed in our study in a site of high energy demand indicate a presymptomatic zone of increased fragility in HON. These findings underscore the potential for targeted mitochondrial therapies in the early stages of hereditary optic neuropathies and suggest that local treatment could preemptively mitigate neuronal loss. Furthermore, the distinct mitochondrial alterations associated to *Opa1* and *MT-Nd6* mutations highlight the importance of personalized therapeutic approaches, tailored to the specific mitochondrial dysfunction underlying different forms of HONs. Finally, our results provide evaluation criteria for presymptomatic treatments under experimental conditions.

For Review Only

Funding

This work was supported by the French National Scientific Research Council (CNRS), the French National Institute for Health and Medical Research (Inserm), the University of Angers (research fellowship to JB), and Retina France, Ouvrir-Les-Yeux and Kjer-France patient associations.

Competing interests

The authors report no competing interest.

Supplementary material

Supplementary materials are available at *Brain Communications* online.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

1. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet.* 2009:145-158.
2. Rocatcher A, Desquiret-Dumas V, Charif M, *et al.* The top 10 most frequently involved genes in hereditary optic neuropathies in 2186 probands. *Brain*. 2023;146:455-460.
3. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, *et al.* OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet.* 2000;26:211-215.
4. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, *et al*. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet.* 2000;26:207-110.
5. Wallace DC, Singh G, Lott MT, *et al.* Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science.* 1988;242:1427-1430

For Review Only

6. Mackey DA, Oostra RJ, Rosenberg T, *et al.* Primary pathogenic mtDNA mutations in multigeneration pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet*. 1996;59:481–485.

7. Lenaers G, Neutzner A, Le Dantec Y, *et al*. Dominant optic atrophy: Culprit mitochondria in the optic nerve. *Prog Retin Eye Res*. 2021;83:100935.

8. Bristow EA, Griffiths PG, Andrews RM, *et al*. The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Arch Ophthalmol*. 2002;120:791-796.

9. Barron MJ, Griffiths P, Turnbull DM, *et al*. The distributions of mitochondria and sodium channels reflect the specific energy requirements and conduction properties of the human optic nerve head. *Br J Ophthalmol*. 2004;88:286-290

10. Sarzi E, Angebault C, Seveno M, *et al.* The human OPA1delTTAG mutation induces premature age-related systemic neurodegeneration in mouse. *Brain*. 2012;135:3599-3613.

11. Lin CS, Sharpley MS, Fan W, *et al.* Mouse mtDNA mutant model of Leber hereditary optic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:20065-20070.

12. Pozyuchenko K, Shouchane-Blum K, Brody J, *et al.* Investigating animal models of optic neuropathy: An accurate method for optic nerve and chiasm dissection in mice. *J Neurosci Methods*. 2020;331:108527.

13. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, *et al.* Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat Methods* 2012;9:676-682.

14. Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:15927–15932.

15. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, *et al*. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol.* 2003;160:189–200.

For Review Only

16. Le Roux B, Lenaers G, Zanlonghi X, *et al.* OPA1: 516 unique variants and 831 patients registered in an updated centralized Variome database. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14:214.
17. Kane MS, Alban J, Desquiret-Dumas V, *et al.* Autophagy controls the pathogenicity of OPA1 mutations in dominant optic atrophy. *J Cell Mol Med*. 2017;21:2284-2297.
18. Zaninello M, Palikaras K, Naon D, *et al.* Inhibition of autophagy curtails visual loss in a model of autosomal dominant optic atrophy. *Nat Commun*. 2020;11:4029.
19. Okan ICT, Ozdemir F, Agca C. Axonal Transport Defects in Retinal Ganglion Cell Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2023;1415:223-227.
20. González-Menéndez I, Reinhard K, Tolivia J, *et al.* Influence of Opa1 Mutation on Survival and Function of Retinal Ganglion Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:4835-4845.
21. Giordano C, Iommarini L, Giordano L, *et al.* Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2014;137:335-353.
22. Danese A, Patergnani S, Maresca A, *et al.* Pathological mitophagy disrupts mitochondrial homeostasis in Leber's hereditary optic neuropathy. *Cell Rep*. 2022;40:111124.
23. Kerrison JB, Newman NJ. Clinical spectrum of Leber's hereditary optic neuropathy. *Clin Neurosci*. 1997;4:295-301.
24. Yu-Wai-Man P, Chinnery P, Adam M, *et al.* Leber Hereditary Optic Neuropathy. *GeneReviews*; Initial Posting: October 26, 2000; Last Update: March 11, 2021.
25. Alavi MV, Bette S, Schimpf S, *et al.* A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain*. 2007;130:1029-1042.
26. Davies VJ, Hollins AJ, Piechota MJ, *et al.* Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum Mol Genet*. 2007;16:1307-1318.

For Review Only

27. White KE, Davies VJ, Hogan VE, *et al.* OPA1 deficiency associated with increased autophagy in retinal ganglion cells in a murine model of dominant optic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:2567-2571.

28. Williams PA, Piechota M, von Ruhland C, *et al.* Opa1 is essential for retinal ganglion cell synaptic architecture and connectivity. *Brain*. 2012;135:493-505.

29. Yu H, Ozdemir SS, Koilkonda RD, *et al.* Mutant NADH dehydrogenase subunit 4 gene delivery to mitochondria by targeting sequence-modified adeno-associated virus induces visual loss and optic atrophy in mice. *Mol Vis*. 2012;18:1668-1683.

30. Yu H, Koilkonda RD, Chou TH, *et al.* Consequences of zygote injection and germline transfer of mutant human mitochondrial DNA in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:E5689-5698.

For Review Only

Figure Legends

Figure 1: Mitochondrial enrichment in the retina and prelaminar ON in physiological conditions. (A) Optic nerve (ON) of a wild-type mouse immunostained for ATP synthase (ATP-S, mitochondrial marker) and myelin basic protein (MBP, myelin marker). Immunofluorescence imaging reveals a mitochondrial enrichment at the anterior part of the ON, prior to the lamina cribrosa. **(B)** Optic nerve of a wild-type (WT) mouse stained with methylene blue and azure blue II. All transmission electron microscopy (TEM) images were acquired in a standardized manner, with 4 anatomical zones defined: 1) retina, 2) prelaminar ON, LC) lamina cribrosa, and 3) retrolaminar. **(C)** Representative TEM images acquired in the different parts of the ON nerve of WT mice. **(D)** Mean mitochondrial density (mitochondria/µm2) in retinal ganglion cells (RGCs) at the different parts of each WT (n = 6) mouse. Error bars indicate mean with standard deviation, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (Mann-Whitney U test). **(E)** Mean mitochondrial area (µm2) in RGCs at the different parts of the ON of each WT (n = 6) mouse. Error bars indicate mean with standard deviation, *ns*: not significant, **: $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test).

Figure 2: Mitochondrial fragmentation, increased mitophagy, and protein aggregation in the retina and prelaminar ON of presymptomatic *Opa1*$^{+/-}$ mice. (A) Representative TEM images acquired in the different parts of the ON nerve of *Opa1*$^{+/-}$ mice. **(B)** Mean mitochondrial density (mitochondria/µm2) in retinal ganglion cells (RGCs) at the different parts of the ON of each *Opa1*$^{+/-}$ (n = 6) and WT (n = 6) mouse. Error bars indicate mean with standard deviation, *ns*: not significant, **: $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test). **(C)** Mean mitochondrial area (µm2) in RGCs at the different parts of the ON of each *Opa1*$^{+/-}$ (n = 6) and WT (n = 6) mouse. Error bars indicate mean with standard deviation, *ns*: not significant, *: $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test). **(D)** Representative TEM image of mitophagy clusters observed in RGCs in the retina and

For Review Only

prelaminar ON of *Opa1*$^{+/-}$ mice. **(E)** Mean cluster density (/µm2x10^2) in the different prelaminar ON of each *Opa1*$^{+/-}$ (n = 6) and WT (n = 6) mouse. Error bars indicate mean with standard deviation, **: p < 0.01 (Mann-Whitney U test). **(F)** Representative TEM image of proteinaceous aggregates observed in the prelaminar ON of *Opa1*$^{+/-}$ mice (surrounded by dotted lines).

Figure 3: Mitochondrial hypertrophy in the retina and throughout the optic nerve of pre-symptomatic Nd6^{P25L} mice. (A) Representative TEM images acquired in the different parts of the ON nerve of *Nd6*^{P25L} mice. **(B)** Mean mitochondrial density (mitochondria/µm2) in retinal ganglion cells (RGCs) at the different parts of the ON of each *Nd6*^{P25L} (n = 6) and WT (n = 6) mouse. Error bars indicate mean with standard deviation, *ns*: not significant (Mann-Whitney U test). **(C)** Mean mitochondrial area (µm2) in RGCs at the different parts of the ON of each *Nd6*^{P25L} (n = 6) and WT (n = 6) mouse. Error bars indicate mean with standard deviation, *: p < 0.05, **: p < 0.01 (Mann-Whitney U test).

For Review Only

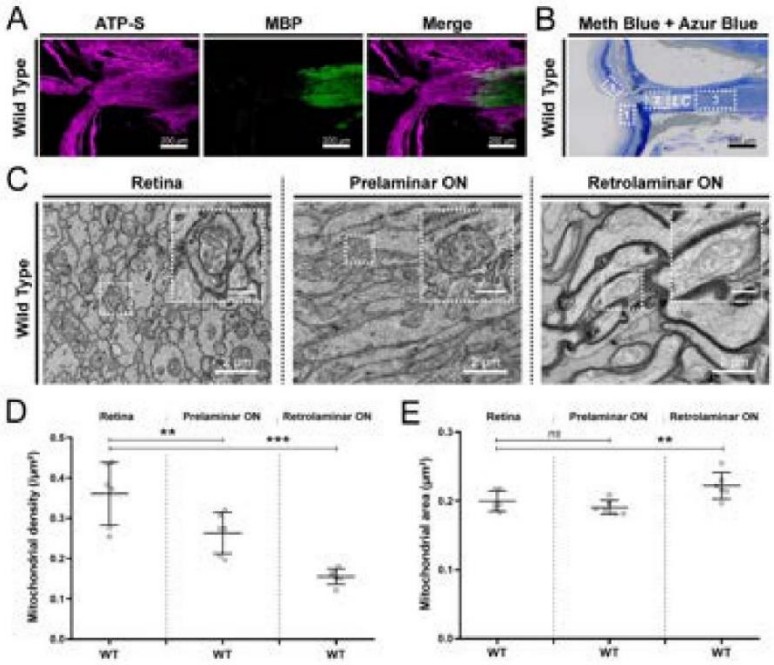


FIGURE 1

196x165mm (600 x 600 DPI)

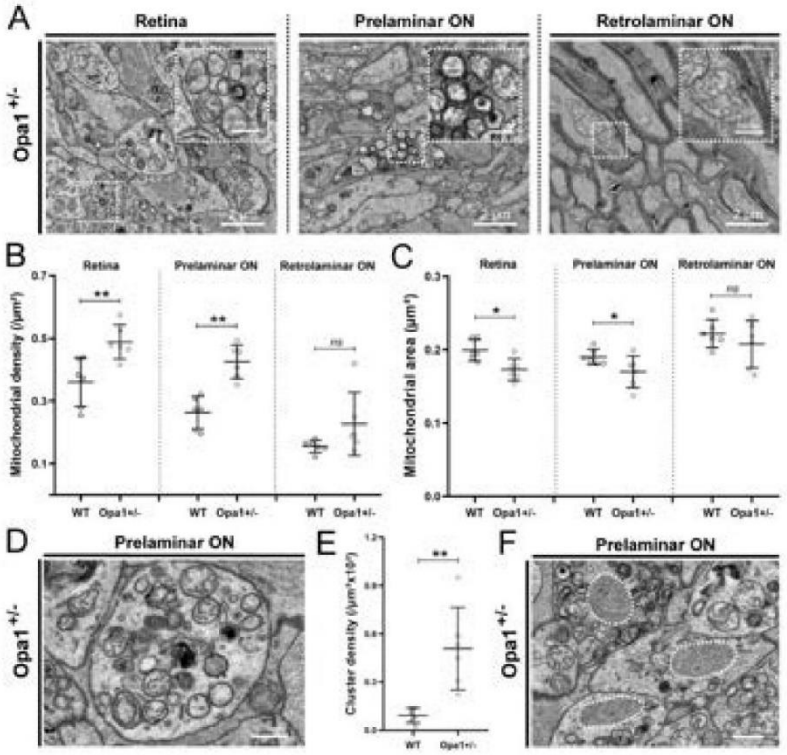


FIGURE 2

192x185mm (300 x 300 DPI)

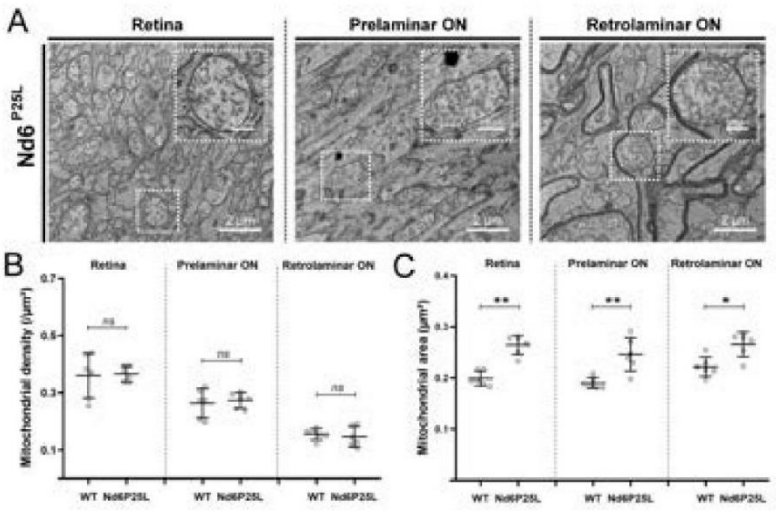
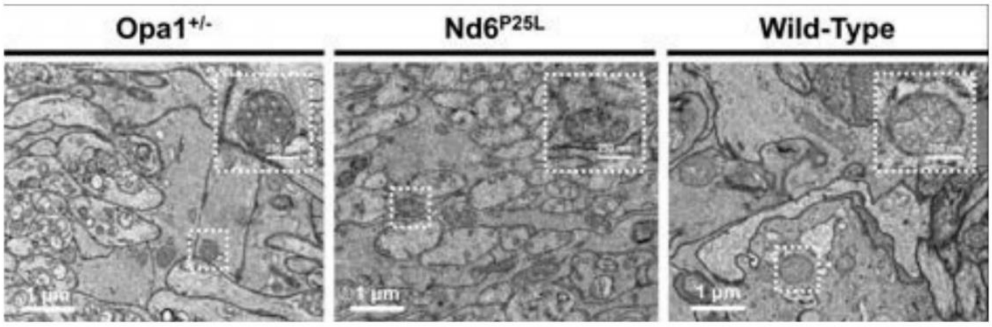


FIGURE 3

196x131mm (600 x 600 DPI)



Supplementary Figure 1: Representative images of mitochondria from astrocytes in the optic nerve of *Opa1*$^{+/-}$, *Nd6*^{P25L} and WT mice.

For Review Only

Supplementary Table

Supplementary Table 1: Antibodies and reagents.

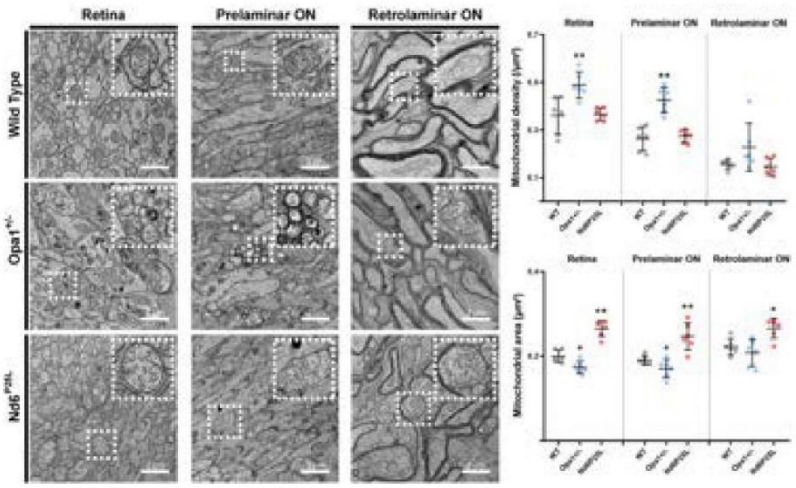
Primary antibodies	Host	Company	Catalog Number	Dilution
ATP synthase (subunit β)	Mouse	Thermo Fisher Scientific	A21351	1:1000
Myelin Basic Protein	Rabbit	Dako-Agilent	A0623	1:250
Secondary antibodies	**Host**	**Company**	**Catalog Number**	**Dilution**
Alexa Fluor 488 anti-Rabbit IgG	Goat	Thermo Fisher Scientific	A-11008	1:3000
Alexa Fluor 568 anti-Mouse IgG	Goat	Thermo Fisher Scientific	A-11004	1:3000

Reagents or Resources	Company	Catalog Number
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich	A6003
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific	H3570
Microscope cover glasses	Paul Marienfeld	0102052
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich	P6148
Phosphate Buffered Saline	Pan Biotech	P04-53500
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T9284

For Review Only

Bureau et al. report that early mitochondrial changes, including fragmentation and increased mitophagy in *Opa1*$^{+/-}$ mice and mitochondrial hypertrophy in *Nd6*^{P25L} mice, occur before neuronal loss in hereditary optic neuropathies. These changes are predominantly observed in the unmyelinated portion of retinal ganglion cell axons, suggesting potential early therapeutic targets.

For Review Only



Graphical Abstract

42x25mm (600 x 600 DPI)

NOTE: Please save this file locally before filling in the table, DO NOT work on the file within your internet browser as changes will not be saved. Adobe Acrobat Reader (available free here) is recommended for this purpose.

The ARRIVE guidelines 2.0: author checklist

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Item		Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Study design	1	For each experiment, provide brief details of study design including: a. The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. b. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals).	Opa1+/- (n = 6) Nd6P25L (n = 6) and WT (n = 6) mice Cages of Animals
Sample size	2	a. Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. b. Explain how the sample size was decided. Provide details of any *a priori* sample size calculation, if done.	No experiments on mice. n = 12. As no similar experiment had been performed before, the sample size could not be calculated. The sample size was defined a priori based on previous data from WT
Inclusion and exclusion criteria	3	a. Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established *a priori*. If no criteria were set, state this explicitly. b. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. c. For each analysis, report the exact value of *n* in each experimental group.	Not applicable. Not applicable. Not applicable.
Randomisation	4	a. State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. b. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly.	Not applicable. Not applicable.
Blinding	5	Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).	Investigators responsible for monitoring and sacrificing the mice and those performing histological and statistical analyses were aware of the group allocation.
Outcome measures	6	a. Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). b. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size.	Not applicable. Not applicable.
Statistical methods	7	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. b. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met.	Statistical analyses were performed using PRISM software version 8.0 for Windows (GraphPad, La Jolla, CA). Comparisons of means were performed using Student's t-test for two group analyses and one-way The methods were defined a priori and applied once all the data had been obtained; conclusions were drawn on the basis of appropriate test results without
Experimental animals	8	a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.	Opa1+/- C57BL/6 mice carrying the recurrent OPA1 c.2708_2711delTTAG mutation,10 Nd6P25L C57BL/6 mice carrying the MT-ND6 G14600A mutation11 and C57BL/6 wild-type (WT) control mice
Experimental procedures	9	For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including: a. What was done, how it was done and what was used. b. When and how often. c. Where (including detail of any acclimatisation periods). d. Why (provide rationale for procedures).	Mice were housed in clear plastic boxes in the animal facility of the SCAHU (Service commun d'animalerie Hospital-universitaire, Angers, France) and subjected to standard
Results	10	For each experiment conducted, including independent replications, report: a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). b. If applicable, the effect size with a confidence interval.	Not applicable. Not applicable.

For Review Only

RÉSUMÉ

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative affectant les motoneurones, provoquant une paralysie progressive et entraînant le décès des patients en moyenne cinq ans après le diagnostic. Malgré les progrès de la recherche, les mécanismes physiopathologiques de la SLA restent partiellement élucidés, et l'absence de modèles représentatifs de la forme sporadique constitue un obstacle à la découverte de nouvelles thérapies. Pour améliorer la compréhension de cette maladie, nous avons étudié la protéine TDP-43, un acteur central de la SLA. Dans la première partie de cette thèse, l'étude de TDP-43 en condition physiologique a révélé une nouvelle localisation de cette protéine au sein du centrosome. Grâce à la microscopie super-résolutive, nous avons précisé son ultra-localisation dans la matrice péricentriolaire et identifié des partenaires (ARNm et protéines) interagissant avec TDP-43. Cette localisation suggère de nouvelles fonctions potentielles de TDP-43, possiblement impliquées en pathologie. Dans la deuxième partie de cette thèse, afin de poursuivre nos recherches en condition pathologique et contribuer à la recherche sur les modèles de la SLA, nous avons travaillé à la genèse d'un modèle *in vivo* par induction la pathologie via les propriétés prion-like de TDP-43. La réussite de ces modèles fournirait un support de recherche pour approfondir la compréhension de la SLA sporadique, étudier l'implication de la fraction centrosomale de TDP-43 en pathologie, et tester de nouvelles approches thérapeutiques sur des modèles plus fiables et représentatifs de cette forme, qui touche la majorité des patients.

Mots-clés : SLA, TDP-43, centrosome, microscopie STORM, prion-like, modèle murin.

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease affecting motor neurons, causing progressive paralysis and leading to death on average five years after diagnosis. Despite advances in research, the pathophysiological mechanisms of ALS remain partially elucidated, and the lack of representative models of the sporadic form is an obstacle to the discovery of new therapies. To improve our understanding of this disease, we studied the TDP-43 protein, a central player in ALS. In the first part of this thesis, the study of TDP-43 under physiological conditions revealed a new localization of this protein within the centrosome. Using super-resolving microscopy, we clarified its ultra-localization in the pericentriolar matrix and identified partners (mRNA and proteins) interacting with TDP-43. This localization suggests potential new functions for TDP-43, possibly involved in pathology. In the second part of this thesis, in order to pursue our research in pathological conditions and contribute to research on ALS models, we worked on the generation of an *in vivo* model by inducing pathology via the prion-like properties of TDP-43. The success of these models would provide research support to deepen our understanding of sporadic ALS, study the involvement of the centrosomal fraction of TDP-43 in pathology, and test new therapeutic approaches on more reliable and representative models of this form, which affects the majority of patients.

keywords: ALS, TDP-43, centrosome, STORM microscopy, prion-like, murine model.

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

université angers

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée **Alexia Bodin**
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **01** / **08** / **2024**

Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint à tous les rapports, dossiers, mémoires.

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

université angers

Titre : Etude de la dynamique de la protéine TDP-43 en conditions physiologique et pathologique : implication et perspectives en recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique

Mots clés : SLA, TDP-43, centrosome, microscopie STORM, prion-like, modèle murin

Résumé : La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative affectant les motoneurones, provoquant une paralysie progressive et entraînant le décès des patients en moyenne cinq ans après le diagnostic. Malgré les progrès de la recherche, les mécanismes physiopathologiques de la SLA restent partiellement élucidés, et l'absence de modèles représentatifs de la forme sporadique constitue un obstacle à la découverte de nouvelles thérapies. Pour améliorer la compréhension de cette maladie, nous avons étudié la protéine TDP-43, un acteur central de la SLA. Dans la première partie de cette thèse, l'étude de TDP-43 en condition physiologique a révélé une nouvelle localisation de cette protéine au sein du centrosome. Grâce à la microscopie super-résolutive, nous avons précisé son ultra-localisation dans la matrice péricentriolaire et identifié des partenaires (ARNm et protéines) interagissant avec TDP-43. Cette localisation suggère de nouvelles fonctions potentielles de TDP-43, possiblement impliquées en pathologie. Dans la deuxième partie de cette thèse, afin de poursuivre nos recherches en condition pathologique et contribuer à la recherche sur les modèles de la SLA, nous avons travaillé à la genèse d'un modèle *in vivo* par induction la pathologie via les propriétés prion-like de TDP-43. La réussite de ces modèles fournirait un support de recherche pour approfondir la compréhension de la SLA sporadique, étudier l'implication de la fraction centrosomale de TDP-43 en pathologie, et tester de nouvelles approches thérapeutiques sur des modèles plus fiables et représentatifs de cette forme, qui touche la majorité des patients.

Title: Study of the dynamics of the TDP-43 protein in physiological and pathological conditions: implications and perspectives for research on Amyotrophic Lateral Sclerosis

Keywords: ALS, TDP-43, centrosome, STORM microscopy, prion-like, murine model.

Abstract: Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease affecting motor neurons, causing progressive paralysis and leading to death on average five years after diagnosis. Despite advances in research, the pathophysiological mechanisms of ALS remain partially elucidated, and the lack of representative models of the sporadic form is an obstacle to the discovery of new therapies. To improve our understanding of this disease, we studied the TDP-43 protein, a central player in ALS. In the first part of this thesis, the study of TDP-43 under physiological conditions revealed a new localization of this protein within the centrosome. Using super-resolving microscopy, we clarified its ultra-localization in the pericentriolar matrix and identified partners (mRNA and proteins) interacting with TDP-43. This localization suggests potential new functions for TDP-43, possibly involved in pathology. In the second part of this thesis, in order to pursue our research in pathological conditions and contribute to research on ALS models, we worked on the generation of an *in vivo* model by inducing pathology via the prion-like properties of TDP-43. The success of these models would provide research support to deepen our understanding of sporadic ALS, study the involvement of the centrosomal fraction of TDP-43 in pathology, and test new therapeutic approaches on more reliable and representative models of this form, which affects the majority of patients.