

Université de Montréal

**Implication de l'expression et localisation de TDP-43 dans le
mécanisme des granules de stress dans la sclérose latérale
amyotrophique**

par Yousra Khalfallah

Département de Biochimie, Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du
grade de Docteur en Biochimie

Août 2018

© Yousra Khalfallah, 2018

Université de Montréal

**Implication de l'expression et localisation de TDP-43 dans le
mécanisme des granules de stress dans la sclérose latérale
amyotrophique**

Présentée par Yousra Khalfallah

Évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Zenklusen, Président rapporteur

Christine Vande Velde, Directrice de recherche

Greg Fitzharris, Membre du jury

Séverine Boillée, Examinatrice externe

Graciela Pineyro, Représentante du doyen

Résumé

Les granules de stress (GSs) sont des foyers cytoplasmiques qui se forment en réponse à divers stimuli externes ou internes et sont essentiels à la survie cellulaire après un stress. Les GSs sont étudiés dans plusieurs maladies, dont la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence fronto-temporale (DFT), qui entraînent respectivement la dégénérescence des neurones moteurs et corticaux, et dont la pathogénie est en lien avec TDP-43. Cette protéine liant l'ARN, dont l'expression est principalement nucléaire a été découverte comme composante d'agrégats cytoplasmiques positifs pour l'ubiquitine dans les neurones et certaines cellules gliales des patients. Jusqu'à présent, les études sur le rôle de TDP-43 dans les GSs ont principalement utilisé des lignées cellulaires transformées et ont donc nécessité l'extrapolation des mécanismes aux types de cellules affectées par la SLA / FTD, masquant potentiellement les effets spécifiques aux types cellulaires. Dans cette étude, nous avons établi la dynamique des GSs dans les neurones moteurs et corticaux primaires ainsi que dans les astrocytes. Nos données suggèrent une spécificité liée au type cellulaire et au stress et démontrent l'exigence d'expression de TDP-43 nucléaire pour une dynamique efficace des GSs. En outre, sur la base de notre approche *in vitro*, nos données suggèrent que le vieillissement pourrait être un important modificateur de la dynamique des GSs, ce qui pourrait être pertinent pour l'initiation et / ou la progression de maladies neurodégénératives liées à l'âge. Dans notre modèle de souris *in vivo*, nous avons pu observer la formation de granules d'ARNm dans différentes régions du cerveau et dans la moelle épinière après un choc hyperthermique. Cette formation est inhibée avec l'âge. Enfin, la déplétion nucléaire de TDP-43 induit une diminution de G3BP1, une protéine d'échafaudage importante pour l'assemblage des GSs, dans les neurones moteurs suite à la lésion du nerf sciatique chez la souris. Ce résultat montre une perte de fonction nucléaire de TDP-43 *in vivo* pouvant ultimement affecté la réponse au stress. Ensemble, mes travaux de thèse ont fait progresser les études de GSs dans le domaine des maladies neurodégénératives et ont démontré pour la première fois, *in vivo*, la perte de la fonction nucléaire de TDP-43 par suite de la dérégulation de G3BP1.

Mots clés : TDP-43, Sclérose Latérale Amyotrophique, Démence Fronto-temporale, réponse au stress, Granules de Stress, moelle épinière, neurones moteurs et corticaux, astrocytes, G3BP1, ARNm, vieillissement.

Abstract

Stress granules (SGs) are cytoplasmic foci that form in response to various external stimuli and are essential to cell survival following stress. SGs are studied in several diseases, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and fronto-temporal dementia (FTD), which involve the degeneration of motor and cortical neurons, respectively, and are now realized to be linked pathogenically by TDP-43, originally discovered as a component of ubiquitin-positive aggregates within patients' neurons and some glial cells. So far, studies to uncover the role of TDP-43 in SGs have used primarily transformed cell lines, and thus rely on the extrapolation of the mechanisms to cell types affected in ALS/FTD, potentially masking cell specific effects. Here, we investigate SG dynamics in primary motor and cortical neurons as well as astrocytes. Our data suggest a cell and stress specificity and demonstrate a requirement for TDP-43 for efficient SG dynamics. In addition, based on our *in vitro* approach, our data suggest that aging may be an important modifier of SG dynamics which could have relevance to the initiation and/or progression of age-related neurodegenerative diseases. In our *in vivo* mouse model, we can observe formation of mRNA granules in different regions of the brain and in the spinal cord following hyperthermic choc. This formation is inhibited with age. Finally, nuclear depletion of TDP-43 induce a decrease of G3BP1, important scaffolding protein for SG assembly, in motor neurons following sciatic injury, in mice. This result show a loss of nuclear function of TDP-43 *in vivo* with a possible repercussion on the stress response. Together my thesis work has advanced SGs studies in the field of neurodegenerative diseases as well as shown for the first time *in vivo* proof of loss of TDP-43 nuclear function through G3BP1 misregulation.

Key words: TDP-43, Amyotrophic Lateral Sclerosis, Fronto Temporal Dementia, stress response, Stress granules, spinal cord, motor and cortical neurons, astrocytes, G3BP1, mRNA, aging.

Table des matières

Résumé	I
Abstract	III
Table des matières	V
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	VIII
Listes des acronymes et abréviations	IX
Remerciements	XIV
Chapitre 1 : introduction	1
I. MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES	1
II. SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE	2
II.1. Découverte et épidémiologie	2
II.2. Description et diagnostic	2
II.3. Différentes formes et leur étiologie	3
II.3.a. Formes sporadiques.....	3
II.3.b. Formes familiales	7
II.4. Mécanismes moléculaires de la pathologie	9
II.4.a. Mécanismes intrinsèques.....	10
II.4. a.1. Protéostasie et agrégats protéiques	10
II.4. a.2. Dysfonctionnement du métabolisme de l'ARN.....	10
II.4. a.3. Désorganisation du cytosquelette et du transport axonal.....	11
II.4. a.4. Perturbation du transport nucléocytoplasmique	11
II.4.b. Mécanismes extrinsèques.....	12
II.4. b.1. Augmentation de l'excitotoxicité	12
II.4. b.2. L'implication des cellules gliales et exemple du modèle « non-cell autonomous »	12
III. DÉMENCE FRONTO- TEMPORALE	13
III.1. Description	13
III.2. Etiologie et mécanismes moléculaires	14
III.3. Convergence spectrale avec la SLA.....	15
IV. TAR DNA BINDING PROTEIN 43	17
IV.1. Historique.....	17
IV.2. Structure.....	19
IV.3. Fonctions physiologiques.....	20
IV.3. a. Inhibition de la transcription.....	21
IV.3. b. Métabolisme et épissage de l'ARN pré-messager.....	22

IV.3. c. Métabolisme et régulation des micro-ARNs	22
IV.3. d. Stabilisation, transport et traduction de l'ARN messager	23
IV.3. e. Présence aux granules d'ARN	24
IV.4. Fonctions pathologiques	25
IV.4. a. Agrégats pathologiques	25
IV.4. b. Équilibre de la perte ou gain de fonction.....	26
IV.5. Modèles d'étude.....	26
IV.5. a. Cellulaires	26
IV.5. b. Animaux	27
IV.5. b.1. Génétiquement modifiées	27
IV.5. b.1. Chirurgicaux.....	28
V. GRANULES DE STRESS.....	29
V.1. Historique et généralités.....	29
V.2. Définition	30
V.3. Types de stress conduisant à leur formation	30
V.4. Dynamique des granules de stress.....	31
V.4. a. Formation	31
V.4. b. Assemblage.....	32
V.4. c. Désassemblage.....	34
V.5. Composition des granules de stress.....	35
V.6. Granules de stress au travers des différents types cellulaires.....	36
V.7. Les granules de stress <i>in vivo</i>	37
V.8. Lien aux maladies.....	38
V.8. a. Cancers.....	38
V.8. b. Maladies neurodégénératives.....	39
VI. INTRODUCTION ET QUESTIONS DE L'ÉTUDE	41
Chapitre 2	43
<i>Préface</i>	44
TDP-43 regulation of stress granule dynamics in neurodegenerative disease-relevant cell types	45
Chapitre 3	89
<i>Préface</i>	90
TDP-43 cytoplasmic mislocalization and stress granules <i>in vivo</i>	91
Chapitre 4: discussion générale	125
1. Les GSs présentent différentes caractéristiques suivant le type cellulaire.....	126
1.a. Différences morphologiques	126
1.b. Cinétiques différentes.....	127
1.c. Assemblage différencié.....	128
2. Les GSs se forment différemment suivant le type de stress.....	129

3.	<i>TDP-43 régule les mécanismes des GSs</i>	130
3.a.	TDP-43 régule la cinétique des GSs issus d'un stress oxydatif.....	131
3.b.	TDP-43 régule l'assemblage des GSs issus d'un stress oxydatif.....	131
3.c.	TDP-43 indispensable pour la formation des GSs aux suites d'un stress osmotique.....	131
3.d.	La déplétion de TDP-43 induit l'augmentation d'expression d'aquaporine 4.....	132
3.e.	La déplétion nucléaire de TDP-43 affecte l'expression de G3BP1.....	134
4.	<i>L'âge, facteur important dans la dérégulation des mécanismes de GSs</i>	136
4.a.	Le vieillissement <i>in vitro</i> altère l'assemblage des GSs.....	136
4.b.	Le vieillissement <i>in vivo</i> altère la formation des GSs.....	137
5.	<i>Granules d'ARNm ou inclusions pathologiques ?</i>	138
6.	<i>Conclusion et perspectives</i>	139
	Bibliographie	142
	Annexes	159
	<i>Annexe 1 : La durée du stress ne détermine pas la longueur de la cinétique des GSs</i>	<i>I</i>
	<i>Annexe 2 : L'expression de VCP est diminuée dans les neurones corticaux comparé à d'autres types cellulaires</i>	<i>II</i>
	<i>Annexe 3: La surexpression des mutants TDP-43 ne semble pas d'avoir d'effet sur les composants des granules de stress</i>	<i>III</i>
	<i>Annexe 4: G3BP2 est présente aux GSs dans les cultures primaires de cellules microgliales</i>	<i>V</i>
	<i>Annexe 5: HSP27 est présente aux GSs dans les cultures primaires de cellules microgliales sous conditions inflammatoires</i>	<i>VII</i>
	<i>Annexe 6: LPS ne semble pas induire de GSs dans les astrocytes malgré l'activation de NF-κB /p65</i>	<i>VIII</i>
	<i>Annexe 7 : Stress osmotique n'induit pas de granules de stress dans les neurones corticaux</i>	<i>IX</i>
	<i>Annexe 8 : La déplétion de TDP-43 ne semble pas augmenter l'agrégation d'AQP4</i>	<i>XI</i>
	<i>Annexe 9 : Les neurones corticaux sont plus vulnérables aux stress multiples que les astrocytes</i>	<i>XII</i>

Liste des tableaux

Tableau 1. Résumé de certains gènes impliqués dans la SLA familiale et sporadique.....	8
---	---

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1: Différentes formes de la SLA et zones atteintes..	5
Figure 2 : Facteurs de risques et hypothèses conduisant à la SLA.	6
Figure 3 : Représentation non exhaustive des mécanismes conduisant à la SLA.....	9
Figure 4 : La SLA et DFT sont deux extrémités d'un spectre.....	17
Figure 5 : Structure de TARDBP et TDP-43.....	19
Figure 6 : TDP-43 dans tous ses états.....	21
Figure 7 : Cinétique de constitution des granules de stress..	33

ANNEXES

Figure 8: Temps de stress prolongé ne résulte pas en un désassemblage retardé dans les cellules HeLa.....	I
Figure 9: Comparaison de l'expression de TDP-43 et VCP dans différents types cellulaires.....	II
Figure 10: Expression des protéines des GSs en réponse à la surexpression de TDP-43 mutants.	IV
Figure 11: L'implication de G3BP2 dans les GSs..	VI
Figure 12: Présence de HSP27 dans les GSs.....	VII
Figure 13: : LPS ne semble pas induire de GSs dans les astrocytes malgré l'activation de NF- κ B /p65.....	VIII
Figure 14: Stress osmotique n'induit pas de granules de stress dans les neurones corticaux..	X
Figure 15: Conséquence de la déplétion de TDP-43 sur l'agrégation d'AQP4..	XI
Figure 16: Viabilité des astrocytes et neurones corticaux après multiples stress..	XIII

Listes des acronymes et abréviations

aa : Acide-aminé

A β : amyloïdes beta

ADN : acide désoxyribonucléique

AQPs : aquaporines

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ARNi: ARN interférent

ATP: adénosine triphosphate

Cas9: CRISPR associated protein 9

CFTR: Cystic fibrosis transmembrane regulator

ChAT: Choline acetyltransferase

CHMP2B: Charged Multivesicular Body Protein 2B

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CSPi : cellules souche pluripotente induite

CT : choc thermique

C9ORF72: Chromosome 9 open reading frame 72

DFC : domaine de faible complexité

DFT : Démence fronto- temporale

DFT- U : Démence fronto- temporale à inclusions ubiquitinées

DID : domaine intrinsèquement désordonné

DCTN1: Dynactine

EAAT2: Excitotoxic amino acid transporter 2

eIF2 α : eukaryotic Initiation Factor 2 alpha

FISH : fluorescent *in situ* hybridization

FMRP : fragile X mental retardation protein

FUS/TLS: Fused in sarcoma/translocated in sarcoma

GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GRN : progranuline

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

GS: granule de stress

G3BP1/2: Ras GTPase-activating protein-binding protein 1/2
HDAC6: Histone deacetylase 6
hnRNP: *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein*
HSP: Heat shock protein
HSP-27: Heat shock protein -27
HSP-70: Heat shock protein -70
HuR: human antigen R
Iba-1: Ionised calcium-binding adapter molecule -1
IMP1: mRNA binding protein 1
kDa : kilodalton
LPS: Lipopolysaccharides
MA : maladie d'Alzheimer
MAP1B : microtubule-associated protein 1B
ME : moelle épinière
MEFs : mous emryonic fibroblastes
miARN : micro-ARN
min : minutes
MRA : motif de reconnaissance d'ARN
NF: neurofilament
NF- κ B: nuclear factor- κ B
PLA : protéine liant l'ARN
PRD : protéines répétitives de dipeptides
Pré-ARNm : ARN pré-messager
PrLD: *Prion-like domain*
RE : Réticulum endoplasmique
ROS : *reactive oxygen species*
SA : sodium arsenite
SEN : signal d'exportation nucléaire
SLA : sclérose latérale amyotrophique
SLAf : sclérose latérale amyotrophique familiale
SLAs : sclérose latérale amyotrophique sporadique
SLN : signal de localisation nucléaire

SMN : survival of motor neuron
SNC : système nerveux central
SNP : système nerveux périphérique
SOD1 : Superoxide dismutase -1
SPLL : séparation de phase liquide-liquide
TAR : Trans-active response
TARDBP : TAR DNA Binding Protein
TDP-43 : TAR DNA-binding protein de 43kDa
TFRC : Transferrin receptor protein 1
TIA-1: T-Cell-Restricted Intracellular Antigen-1
TIAR: TIA-1-related protein
UTR: *untranslated region*
UPR : Unfolded protein response
UV : ultra-violet
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VCP: Valosin-containing protein
VIH : Virus de l'immunodeficiency humaine
WT : sauvage

*Pour toi Amina, pour vous Mama, Nadjoua et
mama Zakia ; les femmes fortes qui m'ont
éduquée.*

Remerciements

L'accomplissement d'une thèse n'est pas chose aisée, c'est un combat personnel, mais qui nécessite un soutien certain. J'ai de la chance d'avoir une grande liste de personnes à remercier, pardonnez-moi d'avance si j'en ai oublié.

Tout d'abord ma directrice de thèse, Dre Christine Vande Velde, merci de m'avoir fait confiance, offert une place dans votre laboratoire et donner tous les moyens pour que j'accomplisse mon projet. J'espère avoir été à la hauteur.

Merci au CRCHUM d'offrir un endroit de travail agréable et propice aux collaborations. Merci aux plateformes particulièrement celle de microscopie où j'ai passé pas mal d'heures de jour comme de nuit. Merci, Aurélie, pour ton aide précieuse et ton sourire face aux problèmes techniques.

Merci à nos collaborateurs : Dre Heather Durham, Rachel Kuta, Dr Alexandre Prat, Dr Mike Strong, Katherine Volkening, leur aide a été précieuse dans l'accomplissement de mes publications.

Merci aux membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ma thèse, et ce même dans ces délais courts.

Merci aux membres de mon laboratoire, aux anciens : Guillaume Caron, Sarah Pickles, mon mentore Anaïs Aulas, mes stagiaires partielles Charlotte et Corine et celle qui a été mon bras droit cet été Laurie Destroimaisons. Et aux présents : Jade, Myriam, Walters, l'intrépide Mathieu, ma partenaire de thèse et mon amie fidèle Bine, ma sauveuse et mentor animalier Sarah Peyrard et un merci particulier à Hadjara pour la relecture de ma thèse. Merci à tous pour votre bonne humeur et aide tout au long de ces 5 années passées au laboratoire.

On a de la chance d'avoir les meilleurs voisins de laboratoire en les membres du labo Parker. Vous avez été d'un grand soutien. Tout d'abord merci à mes partenaires de gym Gilles et Constantin, vous avez su être motivants des fois, merci à toi Audrey pour ta bonne humeur, ta sensibilité et ton soutien infaillible jusqu'au dernier moment, merci James pour les discussions across the desk.

Une porte plus loin merci, Marie-laure, Anna, Negar, Flo d'avoir toujours sauté sur l'occasion pour m'aider ! Merci, Cyril, pour les pauses pleines de rires.

Je ne peux continuer sans remercier mon laboratoire d'adoption deux portes plus loin... Celui qui a eu mon sang et mes rires. Merci Lyne depuis notre rencontre à Notre Dame jusqu'à ce jour, ta bienveillance, ton aide et ton écoute m'ont toujours touché. Merci Sandra, la sirène du lac Saint-Jean. Merci aux post doc pour leur aide continue, merci au Peelinator qui a su me faire travailler mon coup de raquette, merci Stéphanie pour tes conseils au bench et en dehors

et surtout pour m'avoir initié et me soutenir à l'escalade, merci aux derniers arrivés Chloé, avec son rayon de soleil Sienna, et le normand Antoine qui tel un fidèle allié a corrigé et relu ma thèse. Merci aux filles : Paulette, Catherine, Camille et ma neurologue attitrée Rose-Marie, merci d'être devenues des amies irremplaçables. Merci aux autres étudiants Marc, Jean-Phillipe et Beth.

Merci aux étudiants passés et présents de l'axe de neurosciences pour toujours avoir le bon mot ou verre pour remonter le moral. Loïc, Sandra, et un merci tout particulier à mes amies Julie, Juliette, Alex/Sasha et Vi vous avez été là aux bons et surtout aux mauvais moments un merci ne sera jamais suffisant pour tout votre soutien.

Au cours des années passées à Montréal j'ai eu la chance de croiser le chemin de gens formidables. J'ai eu droit à une famille d'adoption Québéco-brazillienne, merci les Bussières et tout particulièrement Maïra pour m'avoir accueilli comme un membre à part entière dès le premier jour. Merci, Caro pour ton humour toujours au "poing". Merci aux d'ibervillageoies: Chloé, Sarah, Warda, Nini, Steph, Arthur, Briec, Ash, John et Julie qui ont su me remonter le moral et m'aider à continuer malgré les difficultés qu'apporte l'expatriation. Merci à toi Sarah, mon amie, d'être venue me rejoindre au Canada.

Merci aux Montrealez : Sarah, Anne- Sophie, Gabi, Dominique et Dési pour les belles soirées d'été au parc. Un merci particulier à mon trio de feux Blognon et Sorion votre douceur et votre écoute n'ont d'égal que votre humour et votre talent !!

Enfin, un grand merci à ma famille, mes parents, sans qui je ne serai qui je suis. Amina c'est grâce à toi cette thèse, tu m'as poussé à monter dans l'avion et il n'est pas un coup de mou sans que tu viennes me remonter le moral, tu ne m'as jamais laissé baisser les bras, ta force face aux obstacles est une grande inspiration pour accomplir tout ce dont on rêve. Nadjoua, t'as toujours été une seconde maman, tous les mercis du monde ne suffiront pas pour tout ce que t'as fait pour moi, Sarah et Manilou sont mes petits cœurs et rayons de soleil du samedi matin. Mohamed, grand frère ton soutien silencieux ne passe pas sans se faire remarquer. Le Berlinois et le dernier de la famille avec toujours la bonne blague qui fait plaisir. Hani et Christophe je suis vraiment heureuse de vous appeler beaux-frères et que vous fassiez partis de la famille. Mama Zakia ma très forte mamie qui m'a élevé. Et ma mère qui a tout sacrifié pour qu'on puisse accomplir ce qu'on veut dans la vie, je porte, la tête haute, tes valeurs. J'espère te rendre fière, inshallah.

Chapitre 1 : introduction

I. MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES

Ce terme est défini par le dictionnaire Larousse « Qui concerne la dégénérescence du système nerveux ». Le système nerveux étant principalement composé du cerveau, de la moelle épinière et de la rétine, ce terme regroupe donc bon nombre de maladies.

Au sein de la grande famille des maladies neurodégénératives, il existe plusieurs sous-catégories de pathologies possédant, pour la plupart, une définition plus ou moins élargie tout en ayant un mécanisme pathophysiologique unique et une atteinte de zones cérébrales spécifiques. La maladie d'Alzheimer (MA), par exemple, est la neurodégénérescence la plus commune. Elle est caractérisée par la perte des neurones pyramidaux conduisant à un déficit progressif de mémoire pouvant s'accompagner d'une démence. La démence fronto-temporale, quant à elle est, comme son nom l'indique, associée à la dégénérescence des neurones des lobes frontaux et temporaux. Également, dans le cas de la maladie de Parkinson, on observe une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire tandis que dans le cas de la sclérose latérale amyotrophique, on remarque une dégénérescence des neurones moteurs de la moelle épinière et/ou du cortex moteur. L'étiopathologie de ces maladies est mal connue. Jusqu'à très récemment, elles étaient considérées comme des maladies rares et à ce jour, il n'existe encore aucun traitement curatif. Ces pathologies étant associées à l'âge, ce facteur est considéré comme le déterminant le plus important pour leur développement. Tel que le suggère une récente étude, le stress oxydatif semble être le deuxième facteur de risque le plus important¹.

L'absence de traitement curatif, le manque de compréhension des mécanismes impliqués, et l'augmentation de l'espérance de vie² conduisent à une augmentation de la prévalence des

maladies neurodégénératives³. Ceci représentera un lourd poids sur les coûts du système de santé futur.

II. SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE

II.1. Découverte et épidémiologie

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est également connue sous le nom de maladie de Charcot, d'après le nom du neurologue Jean-Martin Charcot qui l'a précisément décrite en 1875 dans la première partie de son ouvrage « Leçons sur les maladies du système nerveux ». Bien que la découverte ait été effectuée deux décennies plus tôt par Guillaume Duchenne de Boulogne, c'est la mise en place d'une méthodologie concise pour l'étude des maladies neurodégénératives à la suite de l'arrivée du Dr Charcot à l'hôpital de la Salpêtrière à Paris qui a défini le corps de la maladie tel qu'on le connaît à présent.

Les premières études sur l'épidémiologie de la SLA ont émergé dans les années 1990. Ces études se sont basées sur des petits échantillons de populations d'origines diverses ce qui a rendu difficile l'établissement d'un consensus sur l'incidence de la pathologie. Les études les plus récentes établissent l'incidence de la SLA de 1,7 à 2,3 cas pour 100 000 personnes par an⁴⁻⁶, tandis que la prévalence de la maladie est estimée à environ 6 cas pour 100 000^(réf. 7-9) mais elle est plus élevée pour la tranche 60- 80ans. Il est à noter que, due au caractère incurable de la pathologie, sa prévalence ne reflète pas l'aspect commun de la maladie. D'autant plus, que la maladie touche la population âgée.

II.2. Description et diagnostic

La SLA est un trouble progressif associé à la dégénérescence des neurones moteurs de la moelle épinière, du bulbe rachidien ainsi que du cortex moteur (*figure 1¹⁰*). Suivant les zones primaires atteintes, les symptômes cliniques varient drastiquement. On parle d'une forme

bulbaire de la SLA, forme souvent plus agressive, lorsque la maladie est associée à une détérioration des neurones moteurs du bulbe rachidien et du cortex moteur. Ceci entraîne un trouble de la parole, de la déglutition et de la mastication. La forme spinale de la SLA, quant à elle est la forme la plus communément observée. Elle se manifeste par des engourdissements asymétriques des membres pouvant s'accompagner de raideurs musculaires dues à la dégénérescence des neurones de la moelle épinière. Chacune des deux formes tend vers une forme complète, paralysie totale, avec une variabilité de progression malheureusement imprévisible¹¹ et une espérance de vie moyennée, de 3 à 5 ans.

En l'absence de biomarqueurs efficaces permettant de déterminer de manière certaine l'apparition de la maladie, le diagnostic de la SLA s'effectue par élimination. Le neurologue, grâce à l'historique du malade et à différents tests respiratoires, d'un électromyogramme et d'un électroencéphalogramme, élimine toute autre maladie neurodégénérative motrice pour ainsi conclure à une SLA¹². Le diagnostic final est souvent confirmé seulement *post mortem* avec l'autopsie du patient et l'observation de traits spécifiques de la SLA (dégénérescence des neurones moteurs avec présence d'agrégats protéiques qui seront définis plus bas).

II.3. Différentes formes et leur étiologie

II.3.a. Formes sporadiques

Elles représentent 90% des cas répertoriés de SLA (*figure 1*, Tableau 1). Leur dénomination vient du fait qu'elles ne possèdent pas de cause connue et qu'elles semblent d'occurrence aléatoire.

Les facteurs environnementaux tels que les pesticides, les métaux lourds ainsi que le stress oxydatif¹³ semblent être en grande partie responsables de l'avènement de la SLA. Cependant, à ce jour, aucune cible n'a encore été clairement isolée. Les études d'une telle ampleur sont coûteuses et nécessiteraient un très grand nombre de patients afin d'obtenir une différence significative. Aussi les liens entre l'environnement et les susceptibilités génétiques de chaque individu peuvent foncièrement différer. L'aspect multifactoriel de la SLA étant indéniable, un modèle d'interface de causalité entre facteurs environnementaux et génétiques avec une composante d'âge a été avancé dans une revue de Al-Chalabi et Hardiman¹⁴ (*figure 2*). Grâce à un récapitulatif de littérature, ils ont représenté au cours du temps les différentes hypothèses d'apports des facteurs conduisant ou pas au déclenchement de la maladie.

Cependant, il ne faut pas confondre sporadique, et absence de cause génétique. En effet, il a été identifié au sein des cas sporadiques des mutations dans certains gènes responsables et/ou aggravant¹⁵ (*figure 1*, Tableau 1). La différence par rapport aux formes familiales est l'absence d'historique familial et de transmission à la descendance de ces mutations.

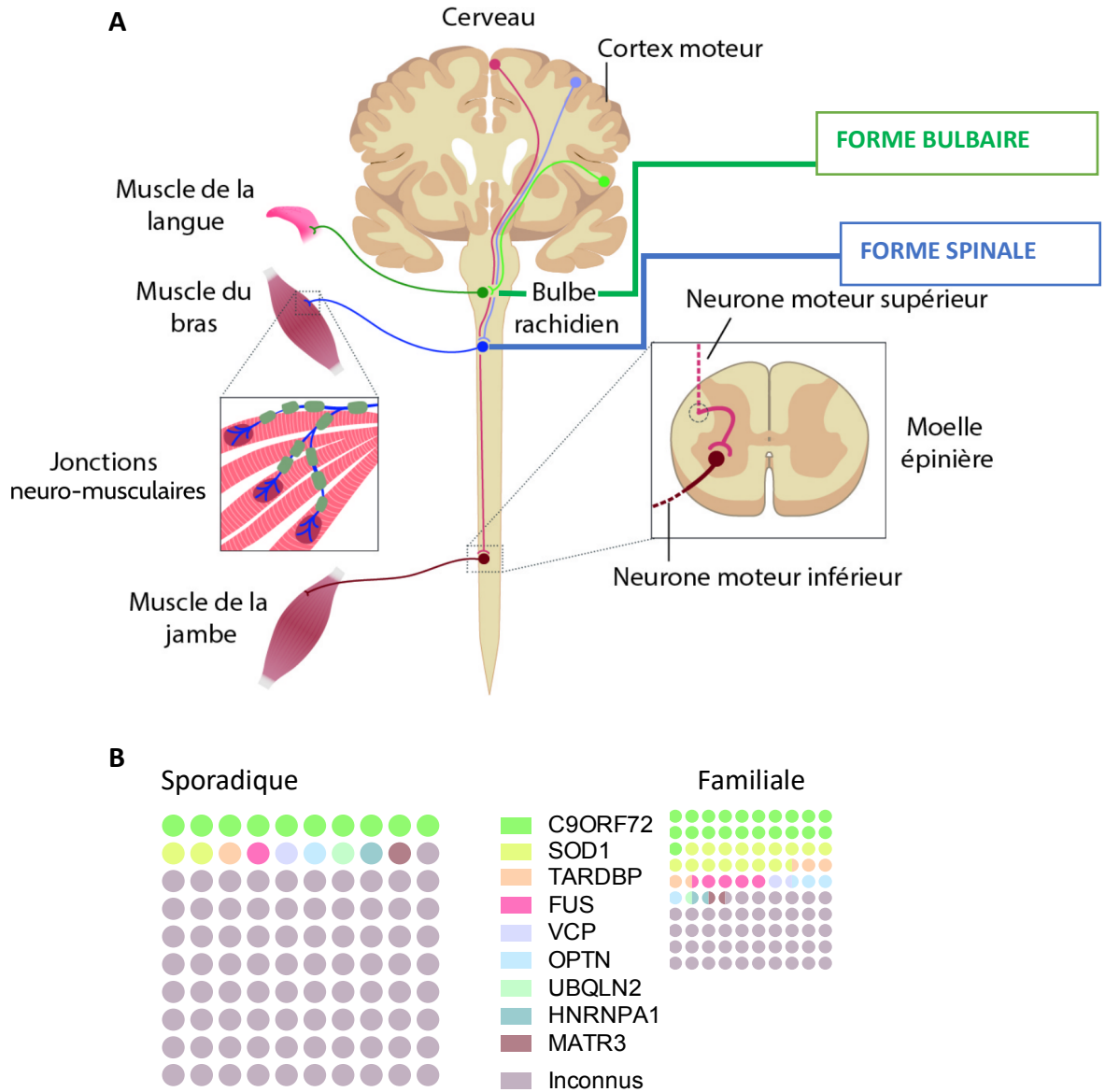
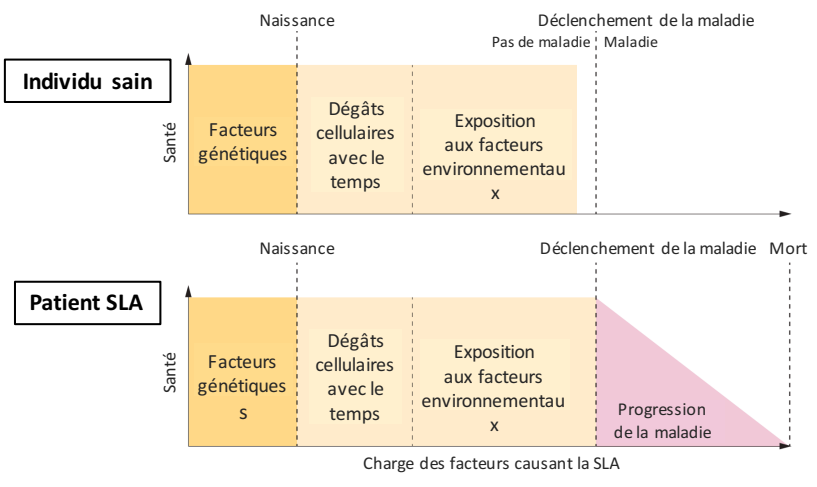


Figure 1: Différentes formes de la SLA et zones atteintes. A) les zones atteintes par la maladie conduisant à des symptômes cliniques différents (adaptée de Taylor *et al* Nature 2016). B) Proportion des gènes impliqués dans les formes sporadiques et familiales de la SLA (graphique établi à partir des chiffres du Tableau 1).



G= facteurs génétiques; T= dégâts cellulaire avec le temps; E= facteurs environnementaux

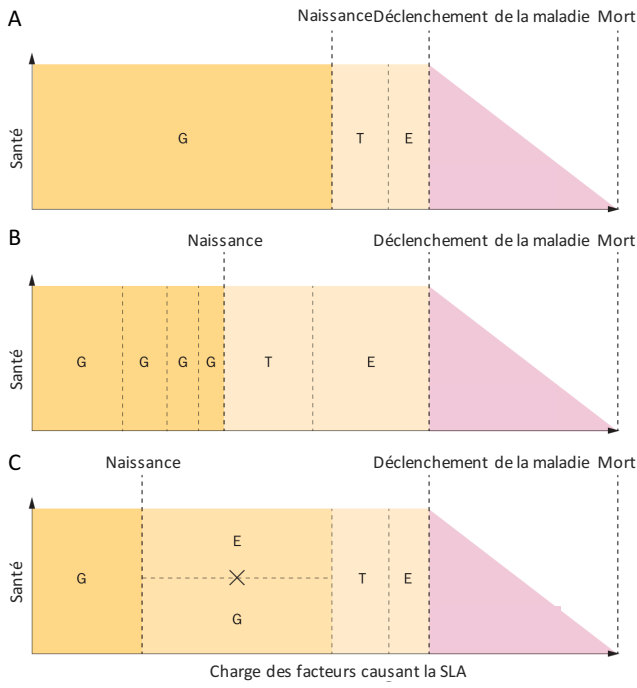


Figure 2 : Facteurs de risques et hypothèses conduisant à la SLA.

La partie du haut représente les deux modèles : **individu sain** dont la charge génétique et facteurs externes n’atteignent pas la zone de déclenchement de la maladie, et **patient SLA** pour qui la combinaison des différents facteurs induit le déclenchement de la pathologie. La partie du bas représente les différentes hypothèses concernant l’interconnectivité des facteurs chez le patient malade. A) La lourde charge de la génétique à la naissance ne laisse pas beaucoup de place à l’accumulation des autres facteurs avant le déclenchement de la maladie. B) L’apport génétique à la naissance est égal aux parts des facteurs de dommages cellulaires et environnementaux causant ainsi la maladie. C) La génétique peut s’associer au cours du temps aux facteurs environnementaux ainsi les aggravant ce qui déclencherait la maladie. (Adapté d’après Al Chalabi et Hardiman 2013.)

II.3.b. Formes familiales

Les formes familiales concernent les cas dont des mutations sur des gènes connus comme étant causatifs de la SLA ont été identifiées au sein d'une même famille. Ils comprennent 10% des patients atteints de la SLA¹⁵. Il existe maints gènes identifiés, mais à ce jour beaucoup restent inconnus (*figure 1*, Tableau 1). Les principaux gènes identifiés sont, dans l'ordre de leur découverte *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72*, *VCP* ou encore *MATR3*. Les mécanismes par lesquels ces derniers causent ou aggravent la pathologie sont multiples et pour la plupart figurent encore au stade d'hypothèses.

Tableau 1. Résumé de certains gènes impliqués dans la SLA familiale et sporadique. (adapté d'après Taylor *et al*, Nature 2016¹⁰)

Nom	Locus chromosomique	Protéine (gène)	Formes Familiale/ Sporadique	Date
		Fonction		
ALS1	21q22	Superoxide dismutase 1 (SOD1) Superoxyde dismutase	20%/ 2%	1993 ¹⁶
ALS6	16p11.2	Fused in sarcoma (FUS) Protéine liant l'ARN	5%/ <1%	2009 ^{17,18}
ALS10	1p36.2	TDP-43 (TARDBP) Protéine liant l'ARN	5%/ <1%	2008 ¹⁹
ALS-FTD1	9q21-q22	Chromosome 9 open reading frame 72 (C9ORF72) Inconnue	25%/ 10%	2000 ²⁰ 2011 ^{21,22}
ALS14	9p13.3	Valosin containing protein (VCP) Remodelage de substrats ubiquitinés	1-2%/ <1%	2010 ²³
ALS12	10p15-p14	Optineurin (OPTN) Adaptateur autophagique	4%/ <1%	2010 ²⁴
ALS15	Xp11.23-Xp13.1	Ubiquilin2 (UBQLN2) Adaptateur autophagique	<1%/ <1%	2011 ²⁵
ALS20	12q13.1	HnRNP/A1 (HNRNPA1) Protéine liant l'ARN	<1%/ <1%	2013 ²⁶
ALS21	5q31.2	Matrin 3 (MATR3) Protéine liant l'ARN	<1%/ <1%	2014 ²⁷

II.4. Mécanismes moléculaires de la pathologie

La profonde variabilité des formes de la SLA rend l'identification d'un mécanisme unique de dégénérescence neuronale peu probable. Les différents mécanismes suggérés sont tous représentés dans la *figure 3*. On sépare les principaux mécanismes proposés entre ceux intrinsèques à la cellule neuronale et ceux extrinsèques, provenant majoritairement de l'environnement direct de la cellule.

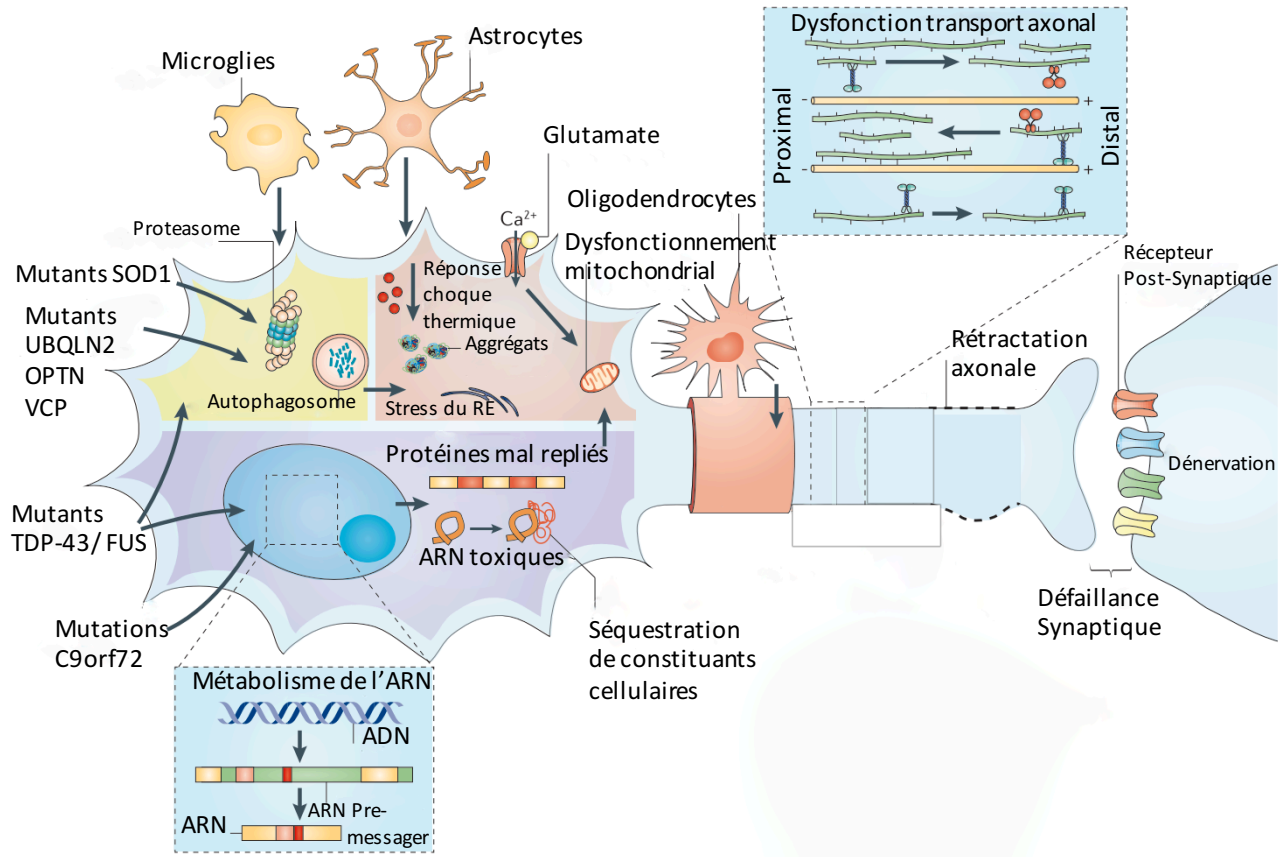


Figure 3 : Représentation non exhaustive des mécanismes conduisant à la SLA. Plusieurs de ces évènements restent débattus dans la littérature au jour d'aujourd'hui. (Adapté d'après Wim Robberecht et Thomas Philips, Nature Reviews Neurosciences, 2013)

II.4.a. Mécanismes intrinsèques

II.4. a.1. Protéostasie et agrégats protéiques

La SLA, comme de nombreuses autres maladies neurodégénératives, est liée à une mauvaise gestion des protéines entraînant des agrégats ubiquitinés²⁸. Cependant, le fait que ces agrégats protéiques soient à l'origine de la maladie ou une cause de cette dernière est encore largement débattu par la communauté scientifique.

La découverte des mutations sur le gène de la protéine superoxide dismutase (SOD1)¹⁶ a naturellement conduit aux études de leurs conséquences sur la fonction de la protéine. Des publications pointent le gain de fonction toxique de SOD1 lié à certaines mutations^{29,30}. Cependant, l'attention est aussi portée sur l'agrégation de SOD1 due à son mauvais repliement. Bien que ce mécanisme reste aujourd'hui mal connu, SOD1 se retrouve ubiquitiné et échappe aux processus de dégradation protéiques. Des processus comme le stress du réticulum endoplasmique (RE) qui résulte de l'augmentation du mauvais repliement protéique, est supposé déclencher des cascades signalétiques telles que la réponse de malformation protéique (UPR) lui permettant soit d'augmenter le potentiel de repliement soit d'activer des mécanismes de dégradations protéiques tels que le protéasome. Un dysfonctionnement de tous ces niveaux de contrôles de la bonne expression protéique a été rapportée dans le cas de la SLA³¹⁻³⁴.

Il existe d'autres agrégats ubiquitinés constitués de protéines dans la SLA : il s'agit de TDP-43 et dans une moindre mesure de FUS^{35,36}. Ces agrégats sont observés dans le cytoplasme des neurones et des cellules gliales des patients^{37,38}. Les études étant conduites sur du tissu *post mortem*, la cinétique et cause de l'avènement de ces agrégats demeurent obscures.

II.4. a.2. Dysfonctionnement du métabolisme de l'ARN

Un virage a été observé dans les recherches sur la SLA avec l'identification de mutations sur les gènes de TDP-43 et FUS, deux protéines qui lient l'ARN (PLA) et dont les fonctions

sont pivot dans le devenir de l'ARN³⁹. Depuis des mutations d'autres PLA tels que hnRNP A1, TIA-1 et Matrin-3 ont été rapportées mettant ainsi en évidence le métabolisme de l'ARN comme voie pathogène centrale. Ces protéines agissent au niveau de plusieurs aspects du traitement de l'ARN qu'il s'agisse de son épissage, son transport ou encore sa stabilité⁴⁰⁻⁴³. Les mutations altèrent la fonction de ces protéines. Par exemple, la mutation de TDP-43 : Q331K dont la surexpression change l'épissage de plus de 1000 transcrits⁴⁴.

II.4. a.3. Désorganisation du cytosquelette et du transport axonal

Les neurones sont des entités extrêmement polarisées. Spécifiquement, l'une des caractéristiques des neurones moteurs, neurones touchés dans la SLA, est la longueur de leur axone. Ainsi, ces derniers sont dépendant d'une bonne organisation axonale permettant un transport et un fonctionnement efficace⁴⁵. Des études ont rapidement montré des mutations sur des gènes codants pour des protéines du cytosquelette tel que les neurofilaments^{46,47}. De plus, des mutations liées à la SLA dans le gène de *PFN1*⁴⁸, dont la protéine Profiline 1 joue un rôle dans la dynamique de l'actine, ont été décrites en 2012. Plus tard, une multiplication d'articles rapportent que des variants du gène constituent un facteur de risque⁴⁹⁻⁵². Ces mutations ont été plus tard ajoutées aux mutations de certaines protéines de la machinerie de transport de vésicules. Parmi elles, on trouve la Dynactine (*DCTN1*)⁵³, qui est un important adaptateur du transport intracellulaire bidirectionnel. Pris ensemble, ces évidences tendent vers un mécanisme de dysfonctionnement axonal qui peut conduire vers une dénervation et la mort neuronale.

II.4. a.4. Perturbation du transport nucléocytoplasmique

La découverte de l'expansion de répétition de G₄C₂ dans une région non codante de *C9orf72* et son implication dans un transport nucléocytoplasmique altéré⁵⁴⁻⁵⁶ a conduit à une augmentation de l'intérêt porté à ce domaine d'étude. Dernièrement, de nombreuses études ont

également rapporté un rôle de TDP-43⁵⁷ et des agrégats protéiques cytoplasmiques⁵⁸ dans ce dysfonctionnement. En effet, des composants du complexe tels que ceux de la famille des nucléoporines ; Nup214 et Nup358⁵⁷, ont été retrouvés au sein des agrégats reliés à la pathologie de TDP-43. Ainsi l'inhibition du transport nucléocytoplasmique peut être pivot dans la protéotoxicité observée dans le cytoplasme ou le défaut de métabolisme de l'ARN.

II.4.b. Mécanismes extrinsèques

II.4. b.1. Augmentation de l'excitotoxicité

Un très grand nombre d'études ont rapporté un dysfonctionnement dans le métabolisme du glutamate ayant pour conséquence une augmentation de l'excitotoxicité des neurones au travers d'une sur activation des récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate). Cet excès de glutamate dans la fente synaptique est dû à la perte des transporteurs de glutamate (GLT-1 ou EAAT2) au niveau des cellules gliales astrocytaires^{59,60} dont le rôle est de nettoyer après chaque relargage synaptique grâce à leurs prolongements. Le mécanisme par lequel cet excès de glutamate conduit à la mort neuronale n'est pas encore tout à fait élucidé, mais les évidences tendent vers une action du Ca^{2+} et des effets toxiques des radicaux libres.

II.4. b.2. L'implication des cellules gliales et exemple du modèle « non-cell autonomous »

La SLA étant une maladie neurodégénérative les études se sont principalement intéressées, pendant longtemps, sur le devenir des neurones. Les cellules gliales n'ont pas été tout à fait ignorées, mais plutôt considérées comme des acteurs secondaires intervenants plus tardivement dans la pathogénie avec l'activation de la cascade inflammatoire. Paradoxalement c'est en essayant de restreindre les mutations aux neurones moteurs dans des modèles d'étude

murins que des scientifiques ont découvert soit une absence du déclenchement de la pathologie ou un avènement tardif accompagné d'une progression lente^{61,62}. De là est né l'intérêt au rôle de l'environnement cellulaire des neurones moteurs, et son apport dans la pathologie. Cet environnement est composé, entre autres, de cellules microgliales et d'astrocytes. Des expérimentations, isolants spécifiquement les cellules microgliales et les astrocytes exprimant des mutants SOD1, ont prouvés un rôle central de ces cellules dans la progression toxique de la pathologie⁶³⁻⁶⁵.

Cependant, il semblerait que la certitude d'un modèle de « non-cell autonomous » soit réservée aux mutants SOD1. En effet, après de nombreuses publications contradictoires, aucun consensus n'a été conclu concernant les mutants de TDP-43⁶⁶⁻⁷⁰. Une étude, utilisant des souris génétiquement modifiées avec une déplétion partielle de TDP-43 prédominante dans les astrocytes, a suggéré que la perte, et non nécessairement la mutation de TDP-43 dans les astrocytes, ait un rôle important dans la dégénérescence des neurones moteurs dans la SLA⁷¹. Ces contradictions sont dues aux modèles d'études *in vitro* basés sur des protocoles variables, mais également au fait que l'élément toxique émis par les cellules gliales n'ait pas été identifié. Certaines hypothèses avancent une transmission ressemblant aux maladies à prions. En effet, TDP-43 comme d'autres protéines impliquées dans la SLA, possèdent un domaine intrinsèquement désordonné (DID) communément appelé en anglais « prion-like domain »^{26,72} (ce domaine pouvant hypothétiquement leur conférer une transmissibilité entre cellules).

III. DÉMENCE FRONTO- TEMPORALE

III.1. Description

La démence fronto- temporale (DFT) fait partie du spectre large des maladies neurodégénératives. Dans cette pathologie, on retrouve les mêmes principales caractéristiques

que la MA et de la SLA c'est-à-dire une mort neuronale progressive ayant des conséquences sur ce qui constitue la personne, et dans ce cas, elles sont cognitives. Spécifiquement, la DFT affecte les neurones des lobes frontaux et temporaux. Cependant, il est maintenant reconnu que le système moteur est également impliqué.

D'abord considérée comme une maladie rare, elle a été décrite pour la première fois par le Dr Arnold Pick en 1892 qui a reporté le cas d'un patient avec une aphasie et des troubles du langage. La DFT a par la suite été extensivement étudiée par Alois Alzheimer. Cette maladie se déclare communément aux alentours de 65ans et les symptômes peuvent différer en fonction de la région spécifique des lobes fronto-temporales touchée, allant d'une variante comportementale (diagnostic le plus répandu) à des cas de perturbations du langage ou une aphasie progressive⁷³. Il est possible d'associer les manifestations cliniques à de l'imagerie par résonance magnétique afin de déterminer les régions de cerveau atrophiées et ainsi d'effectuer un diagnostic adéquat à la forme de DFT.

L'épidémiologie de la DFT est, comme pour celle de la SLA, très variable. En effet, en étant très proche de la MA les erreurs de diagnostic sont fréquentes, entraînant une sous-estimation du nombre réel de cas. La prévalence oscille entre 9 et 22 par 100 000^(réf:74,75) personnes, bien que l'incidence soit plutôt aux alentours de 4 pour 100 000 pour la tranche d'âge 45-65 ans^{76,77}.

III.2. Etiologie et mécanismes moléculaires

Originellement, la caractérisation moléculaire des cas de DFT était séparée en deux catégories. En effet comme beaucoup de maladies neurodégénératives, les neurones corticaux touchés dans la DFT comportaient soit des inclusions de la protéine tau appelés DFT-tau soit des inclusions négatives pour tau, mais ubiquitinées appelées DFT-U⁷⁸. Cette classification s'est

précisée en 2006 avec la découverte de TDP-43 (DFT-TDP-43) dans les inclusions ubiquitinées^{35,36}. À cela s'est ajouté FUS (DFT-FUS), portant à deux le nombre de nouveaux acteurs apparus dans pathologie⁷⁹⁻⁸¹.

L'aspect génétique de la maladie est très proéminent. En effet, d'après les derniers recensements jusqu'à 50% des cas de DFT ont un historique familial⁸². Les mutations dans le gène des protéines Tau (aussi notée *MAPT*)⁸³ et Progranuline (*PGRN*)⁸⁴ ont été largement impliqués dans la DFT, suivie dans une moindre mesure par *CHMP2B*⁸⁵ puis *VCP*⁸⁶. La découverte des mutations sur le gène *C9ORF72*^{21,22} en ont fait le plus gros facteur génétique responsable de la maladie (10 à 50% des cas familiaux de la variante comportementale).

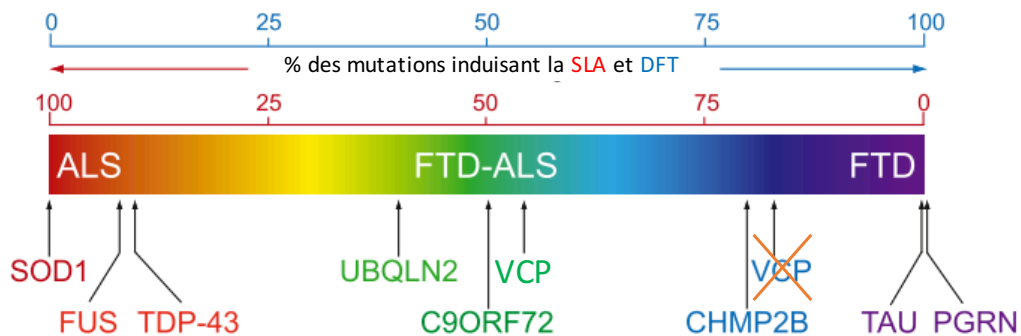
La fonction des protéines associées à la DFT détermine grandement les hypothèses quant aux mécanismes moléculaires sous-jacents à la pathologie. En effet très similaire à ce qui est décrit plus haut pour la SLA les principaux mécanismes mis en cause sont l'homéostasie protéique ainsi que le métabolisme de l'ARN.

III.3. Convergence spectrale avec la SLA

Il est actuellement indéniable que la DFT et la SLA partagent des traits pathologiques communs les plaçant sur un même spectre (*figure 4.A*). D'abord considérée uniquement comme une maladie du système moteur, la SLA a connu un virage avec le diagnostic des premiers cas présentant une déficience cognitive^{87,88}. Les études se multipliant, il est maintenant estimé à 15% la proportion des cas de SLA avec un spectre symptomatique DFT. Parallèlement à ces constatations, dans 15% des cas diagnostiqués⁸⁹, les patients avec une DFT présentaient une atteinte motrice progressive⁹⁰. La convergence génétique des deux maladies était reconnue, mais ce n'est qu'à la découverte des mutations sur le chromosome *C9orf72* comme cause majeure des cas familiaux de SLA et DFT^{21,22,91} que la reconnaissance de ces deux maladies comme

étant deux extrémités d'un même spectre (*figure 4.A*) a été complétée. Enfin derrière les liens cliniques et génétiques entre les deux maladies il existe des liens histopathologiques avec la naissance du terme « TDP-43 proteinopathies » regroupant les inclusions neuronales et gliales de TDP-43 retrouvées chez 97% des cas de SLA et 45% des cas de DFT³⁵⁻³⁷ (*figure 4 .B*).

A Génétique SLA et DFT



B Inclusions pathologiques observés dans la SLA et DFT

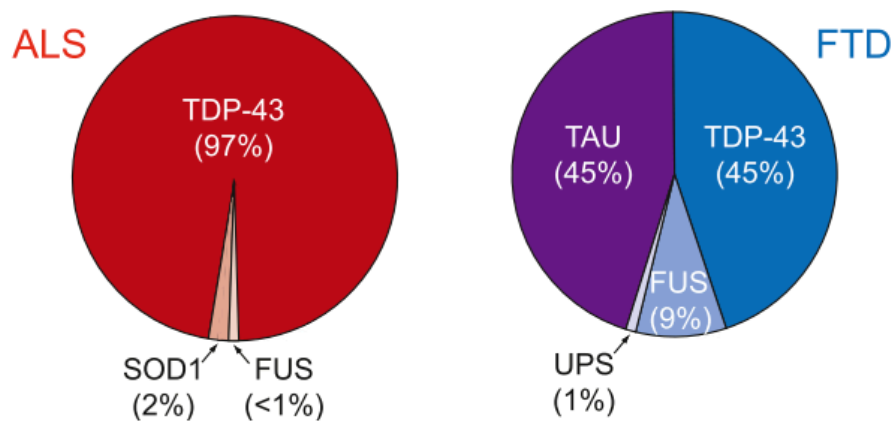


Figure 4 : La SLA et DFT sont deux extrémités d'un spectre. A) La génétique de la SLA et de la DFT : les mutations reconnues pour chaque maladie sont représentées sur un spectre. VCP a été en effet retrouvé dans des cas de SLA d'où le changement effectué sur le spectre. B) Les pourcentages de cas de SLA ou DFT avec des inclusions pathologiques contenant TDP-43 et d'autres protéines. (Adapté d'après Shuo-Chien Ling, Magdalini Polymenidou, and Don W. Cleveland, Neuron, 2013)

IV. TAR DNA BINDING PROTEIN 43

IV.1. Historique

À l'origine, cette protéine a été découverte liant l'ADN de «TAR» (pour trans-active response, un élément du virus d'immunodéficience humaine (VIH)) permettant ainsi la

répression de transcription du virus du VIH⁹². Par la suite, ce facteur nucléaire a été largement étudié par l'équipe de Buratti et Baralle et a fait l'objet de plusieurs publications concernant son rôle dans l'épissage alternatif du gène du récepteur membranaire de la fibrose cystique (CFTR)⁹³⁻⁹⁵. TDP-43 a fait son entrée dans le domaine des maladies neurodégénératives en 2006. En effet au moyen de méthodes biochimiques et histologiques, TDP-43 a été identifié comme principale composante des inclusions cytoplasmiques ubiquitinées et phosphorylées précédemment rapportées chez les patients de SLA et DFT^{35,36}. Cette découverte majeure a accéléré les études sur TDP-43, et conduit à l'identification de multiples mutations sur le gène *TARDBP*⁹⁶⁻⁹⁹ causant les formes familiales et certaines formes sporadiques de SLA et de DFT. Depuis les recherches sur les multiples rôles de TDP-43 et son implication dans les pathologies se multiplient.

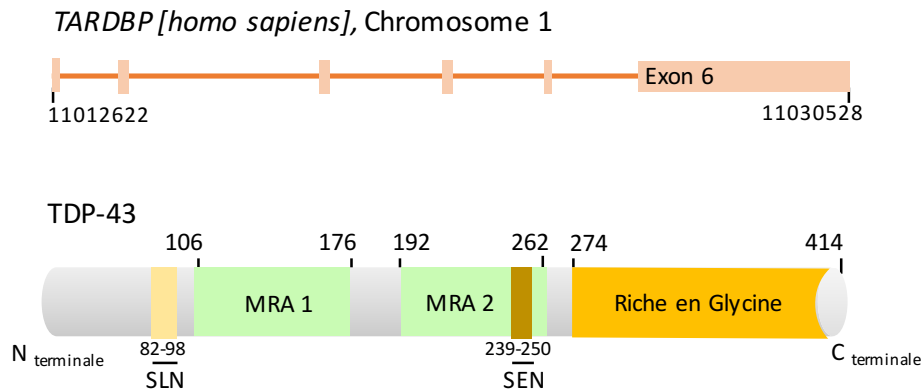


Figure 5 : Structure de TARDBP et TDP-43. Haut, structure du gène humain de TARDBP composé de 6 exons. Bas, structure de la protéine TDP-43. SLN : signal de localisation nucléaire. SEN : signal d'export nucléaire. MRA : motif de reconnaissance d'ARN. En l'extrémité C terminale, il s'agit du domaine riche en glycine aussi connu sous le nom du domaine ressemblant aux prions (« prion-like domain »).

IV.2. Structure

Partant de l'expression du gène *TARDBP* composé de 6 exons, on obtient la protéine TDP-43 composée de 414 acides aminés (*figure 5*). En termes de structure, TDP-43 (*figure 5*) possède les caractéristiques requises pour faire partie de la large famille des ribonucléoprotéines hétérogènes (hnRNPs)¹⁰⁰. Elle possède deux domaines de reconnaissance de l'ARN (MRA 1 et 2) médiant sa liaison à l'ARN. MRA1 lui permet de se lier spécifiquement à certaines ARN^{93,101}. Le domaine C-terminal de TDP-43 est riche en résidus glycine, il est au centre de beaucoup d'études et d'intérêts, car il s'agit d'un domaine intrinsèquement désordonné (DID). Ce dernier est considéré comme un domaine ressemblant aux prions (PrLD : prion-like domain)^{26,102-105} qui contient la majorité des mutations retrouvées sur TDP-43 (*figure 6. C*). Le C terminal permet à TDP-43 de se lier à des protéines, mais également à elle-même, lui conférant ainsi de fortes propensions à s'agréger¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. TDP-43 possède un signal de localisation nucléaire (SLN) en son

extrémité N terminale^{97,109} doublé d'un signal d'export nucléaire (SEN) situé à l'extrémité C terminale du MRA2. La combinaison des deux domaines est supposée permettre à la protéine de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. Cependant, de très récentes études ont remis en cause la fonction de la séquence prédite du SEN^{110,111}, en effet des mutations dans cette séquence n'ont pas aboli l'export de TDP-43 au cytoplasme, ni évidemment son retour au noyau. L'export a été prouvé comme s'effectuant de façon passive¹¹¹.

IV.3. Fonctions physiologiques

TDP-43, en tant que PLA, est principalement nucléaire et exprimée de manière ubiquitaire. Elle est un membre de la famille très conservée des hnRNPs¹¹² et à ce titre possède des rôles très spécifiques¹⁰⁰. TDP-43 a été reconnue comme ayant la capacité à lier plus de 6000 cibles d'ARN dans le cerveau au travers de différentes études chez les rongeurs ou l'humain^{72,113-116}. Son rôle est donc très fortement relié au métabolisme, la liaison et le transport des ARN. Les principales fonctions de TDP-43 au travers de la cellule sont représentées dans la figure 6. A, et seront détaillées par la suite.

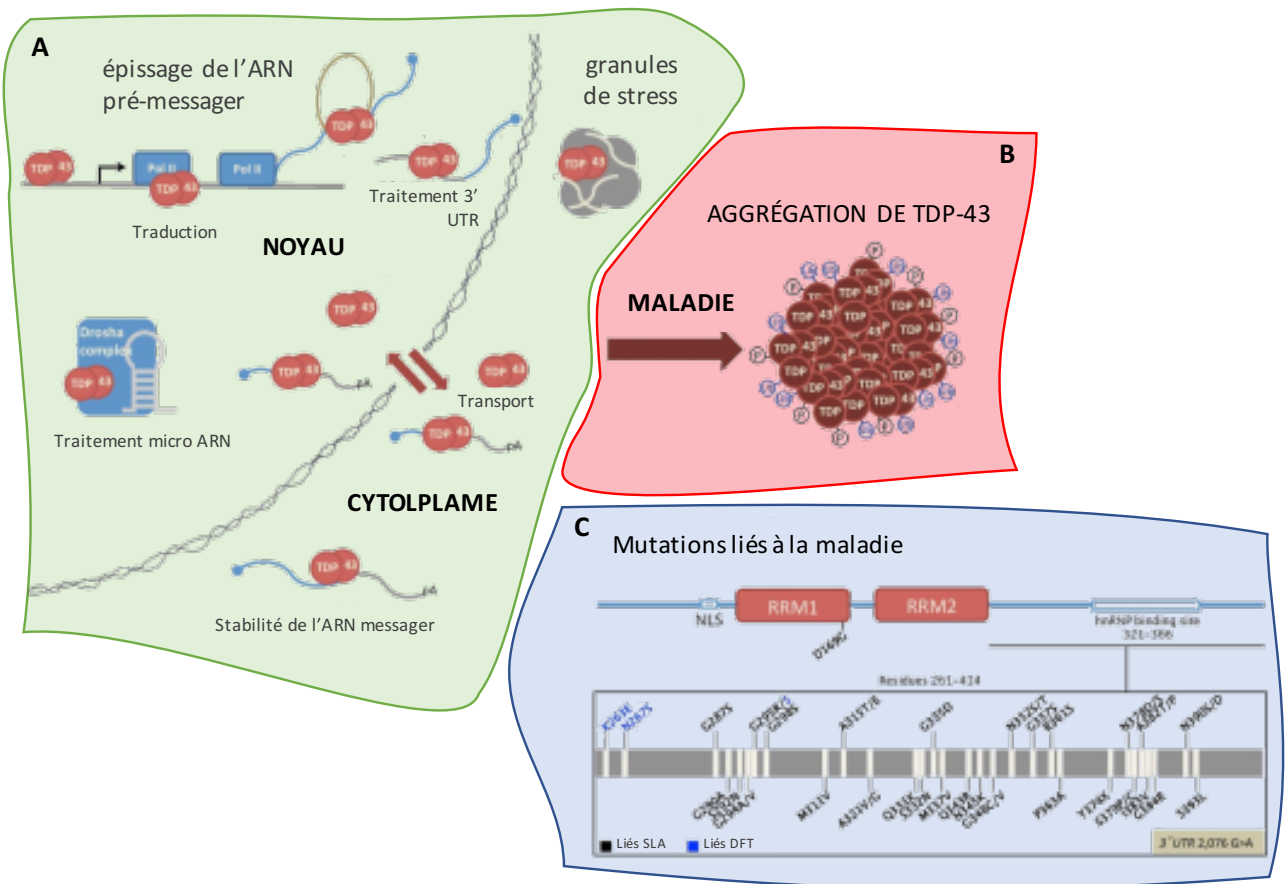


Figure 6 : TDP-43 dans tous ses états. A) Les différentes fonctions physiologiques de TDP-43. B) Agrégats cytoplasmiques ubiquitinés et phosphorylés de TDP-43. C) Les mutations de TDP-43 associés à la SLA et DFT. Majoritairement localisées dans le domaine C terminal de TDP-43. (adapté de http://sciencemission.com/site/index.php?page=news&type=view&id=health-science%2Fmitochondrial_2)

IV.3. a. Inhibition de la transcription

L'exemple le plus probant de la capacité de TDP-43 d'inhiber la transcription est celui même pour lequel elle a été découverte, la répression de l'expression du VIH en se liant à l'ADN

de l'élément TAR du virus⁹². TDP-43 possède la capacité de lier l'ADN, sa localisation nucléaire à des sites de transcription chez les mammifères a été démontrée *in situ* et par immunofluorescence¹¹⁷. De plus, son association avec des protéines régulatrices de la transcription telle que FUS (fused in sarcoma)^{114,118} lui confère un rôle secondaire dans ce mécanisme.

IV.3. b. Métabolisme et épissage de l'ARN pré-messager

L'épissage alternatif est un mécanisme de régulation de l'expression protéique propre à chaque cellule, lui permettant ainsi dans certains cas de se différencier¹¹⁹. Il s'agit du clivage des introns de la séquence d'ARN pré-messager et dans certains cas du clivage même d'exons conduisant à l'expression de variants d'une même protéine. La première preuve de l'action de TDP-43 dans l'épissage de l'ARN pré-messager fut, comme évoquée plus haut, dans le cadre du CFTR⁹⁴. Depuis les études se sont multipliées identifiant d'autres cibles. La plus notable étant la protéine elle-même. En effet TDP-43 se lie au 3'UTR de son propre transcrit, afin d'autoréguler son expression dans la cellule¹²⁰. Le dernier rapport démontrant l'habileté de TDP-43 à réguler l'épissage date d'il y a quelques mois, la cible étant une autre hnRNPs : hnRNP A1⁴⁰. TDP-43 permet l'inclusion de l'exon 7b de hnRNP A1 favorisant ainsi l'expression du variant hnRNP A1B.

IV.3. c. Métabolisme et régulation des micro-ARNs

La biogenèse des micro-ARNs (miARN), facteurs régulateurs des expressions géniques¹²¹, est régulée par deux complexes appelés Drosha et Dicer. Une étude a placé TDP-43 au centre de ces deux complexes¹²². D'après les auteurs de cette étude, TDP-43 fait partie du complexe nucléaire Drosha, lui permettant de lier certaines pri-miARNs spécifiques, conduisant en leur clivage en pre-miARNs. Ces derniers seront à leur tour, cliver en miARN par le

complexe cytoplasmique Dicer dont TDP-43 fait aussi partie. Globalement, TDP-43 régule multiples miARNs dont let-7b et miR-663 pour ne citer qu'eux^{123,124}.

IV.3. d. Stabilisation, transport et traduction de l'ARN messenger

La stabilité d'un ARN messenger (ARNm) nouvellement synthétisé dépend de son extrémité 3' non traduite (3'UTR). En effet, cette extrémité qui se retrouve polyadénylée devient le site de liaison des PLA pour leur transport ou leur stabilité.

TDP-43 est connue pour se lier aux séquences riches en UG⁹³, séquences qui se trouvent en général en abondance à l'extrémité 3'UTR. C'est donc en se liant au 3' UTR de l'ARNm de *NEFL* humain (human low molecular weight neurofilament) que TDP-43 régule sa stabilité^{125,126}. Elle régule aussi celle de l'ARNm de l'histone déacétylase *HDAC6*¹²⁷⁻¹²⁹. TDP-43 apparaît comme déstabilisateur de l'ARNm de *VEGF* (vascular endothelial growth factor) et *GRN* (progranuline)¹¹⁵. En somme, au vu du nombre de transcrits auxquels TDP-43 se lie, il n'est qu'une question de temps avant d'obtenir des confirmations quant aux autres cibles prédites dans le domaine.

Autre que la stabilité, une composante importante du devenir de l'ARNm est son transport dans le cytoplasme, au site de sa traduction ou son confinement. En effet lors de sa synthèse, l'ARNm est immédiatement couplé à une PLA pour former un complexe. Ce dernier ayant sa localisation dans le cytoplasme pourra soit amorcer la traduction des ARNm, être stocké ou être transporté dans des granules de transport^{130,131}. Il est ainsi entendu que TDP-43 y joue aussi un rôle, en effet, sa colocalisation avec certaines PLA, telle que SMN (survival of motor neuron) FMRP (fragile X mental retardation protein) et IMP1 (mRNA binding protein 1), impliqués dans le transport axonal et son transport actif aux extrémités synaptiques a été démontré dans une étude de Fallini et al¹³².

L'action de TDP-43 dans la traduction est intimement liée au transport des ARNm aux sites de traduction. Une étude protéomique publiée en 2010¹³³ a placé TDP-43 au centre de complexes protéiques impliqués dans la régulation de la traduction. Parallèlement, d'autres études ont révélé l'action de TDP-43 dans la traduction de *futsh*, l'orthologue chez la drosophile de MAP1B (microtubule-associated protein 1B)¹³⁴ ainsi que son recrutement du complexe FMRP-CYFIP1 dont le rôle est d'inhiber l'initiation de traduction¹³⁵.

IV3. e. Présence aux granules d'ARN

L'ARNm dans le cytoplasme est en équilibre constant entre un état prêt à être traduit au sein des polysomes, et un état réprimé au sein de petits compartiments appelés granules à ARN, contenant des protéines liantes l'ARN¹³⁶. Ces granules peuvent avoir deux fonctions, la première étant le transport des ARNm dans le cytoplasme vers des sites de traductions, comme c'est le cas dans les neurones (la taille de leur axone impose un transport efficace pour effectuer une traduction locale). La deuxième fonction des granules est la capacité de contrôle de l'expression des gènes lors d'un stress cellulaire en stockant les ARNm réprimés. Ces dernières sont appelées des granules de stress (GSs) et seront longuement détaillées dans la suite. Les granules à ARN sont des organelles sans membranes. L'absence d'une barrière lipidique qui renfermerait les constituants est un avantage permettant à leur environnement de rapidement changer la balance interne du granule¹³⁷. Ce processus de formation des granules cytoplasmiques a longtemps été étudié dans l'organisme du ver *C. elegans*¹³⁸. Cependant, ce n'est que dans les dernières années qu'une caractérisation concrète a été effectuée, et que le nom de séparation de phase liquide-liquide (SPLL) lui a été attribué¹³⁹⁻¹⁴¹. Nombre des protéines liantes l'ARN incluant TDP-43 font partie intégrante des granules à ARN telles que les GSs ou les granules de transport^{133,142}. Le concept de formation des granules par SPLL est d'autant plus cohérent que de récentes études ont démontré la capacité de TDP-43, et d'autres protéines de la

même famille, à subir une SPLL à travers leur domaine intrinsèquement désordonné (DID)^{141,143-146}. De plus, TDP-43 a un rôle majeur au sein des GSs en modulant leur dynamique et le recrutement de certaines composantes de ces granules¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

IV.4. Fonctions pathologiques

IV.4. a. Agrégats pathologiques

L'agrégation de TDP-43, principalement cytoplasmique, dans les neurones et cellules gliales est une marque des protéinopathies de TDP-43. La morphologie de ces inclusions peut varier, incluant des petits granules, des inclusions compactes ressemblantes aux corps de Lewy (qui sont les dépôts de protéine alpha synucléine) ou encore des écheveaux filamenteux. Au sein de ces agrégats pouvant aussi contenir d'autres protéines, on retrouve des formes ubiquitinées, phosphorylées, acétylées et sumoylées de TDP-43^{35,36,150,151} (*figure 6. B*). Des formes tronquées de TDP-43, souvent des variants et/ou les résultats de clivages par caspase-3, sont aussi identifiées dans les agrégats^{152,153}. La génération de fragments de protéines clivées qui ont des propriétés de solubilité anormale peut également jouer un rôle dans la neurodégénérescence en interférant avec les mécanismes de dégradation des protéines. La forme, la localisation ou la fréquence des agrégats ne corrèlent cependant pas avec le cours clinique de la maladie¹⁵⁴, et le domaine reste partagé quant à leurs précurseurs. Il a été suggéré qu'un enrichissement cytoplasmique de TDP-43, qui est une protéine prône à l'agrégation, doublé d'un stress environnemental chronique provoquant la formation persistante des GSs peut pousser à la formation de ces inclusions irréversibles. Il s'agit de l'hypothèse du double coup, mais rien n'indique encore si les GSs sont précurseurs des agrégats ou s'ils se forment indépendamment les uns des autres^{155,156}.

IV.4. b. Équilibre de la perte ou gain de fonction

La déplétion nucléaire de TDP-43, et d'autres protéines, ou l'augmentation de son agrégation à cause des mutations ponctuelles dans le domaine C-terminal¹⁰⁸ sont deux possibilités de mécanismes causant la pathologie.

La perte de TDP-43 du noyau comme elle peut être observée dans les tissus de patients, peut provoquer la perte de l'entièreté des fonctions nucléaires de la protéine, décrites au-dessus. Il s'agit de l'altération de la transcription et de l'épissage alternatif. En effet, un changement majeur dans l'épissage a été rapporté dans le tissu de patients SLA, *postmortem*^{71,157}.

Les fonctions cytosoliques de TDP-43 peuvent aussi être altérées, dues à la séquestration de la protéine dans les agrégats ou bien sa mutation. Des fonctions comme le transport axonal¹⁵⁸ ou la traduction d'ARNm, tels que *MAP1B*^{134,159} évoqué au-dessus. Les agrégats cytoplasmiques de TDP-43 eux-mêmes, peuvent acquérir de nouvelles propriétés toxiques indépendantes de la fonction normale de la protéine¹⁶⁰⁻¹⁶⁴. Le consensus actuel quant à la pathologie, propose un mélange probable de perte de fonction de TDP-43 et d'un gain de fonction toxique dû aux agrégats.

IV.5. Modèles d'étude

Comme pour toute étude d'une maladie, des modèles récapitulant la pathologie sont nécessaires afin d'élucider les mécanismes responsables et sous-jacents. Au cours des années de multiples modèles, ont été produits dans le cas de l'étude des mécanismes pathophysiologique de TDP-43.

IV.5. a. Cellulaires

Les lignées cellulaires dont celles ressemblantes aux neurones ont été la source de multiples découvertes concernant l'effet de la déplétion et des mutations sur des mécanismes de

survie cellulaires. Par exemple, il a été montré à l'aide de trois lignées cellulaires différentes (SH-SY5Y : lignée neuronale humaine, HeLa : lignée humaine et Neuro2A : lignée neuronale murine) que TDP-43 peut se lier au pri-miARN et pré-miARN¹²². Très rapidement, la nécessité d'être au plus proche de la pathologie a poussé les études dans des cultures primaires de neurones moteurs et cellules gliales, vecteurs importants dans les mécanismes de « non-cell autonomous ». Enfin, les progrès génétiques ont rendu possible la reprogrammation cellulaire. Ainsi des fibroblastes issus de patients sont reprogrammés en neurones moteurs (CSPi) et ont permis entre autres de faciliter le dépistage de traitements¹⁶⁵ (l'apport des CSPi dans le domaine est discuté dans la revue de Richard *et al* 2015¹⁶⁶).

IV.5. b. Animaux

IV.5. b.1. Génétiquement modifiées

Deux types de modèles existent, un transgénique, représentant le gain en sur exprimant TDP-43 mutante ou la perte de fonction en supprimant TDP-43 endogène. Les premiers modèles murins développés utilisaient le promoteur de la protéine Prion, mais l'expression de TDP-43 mutant était 2 à 3 fois celle de l'endogène provoquant des artéfacts d'expérimentation¹⁰⁶. Les modèles suivants ont utilisé des promoteurs moins puissants, comme le promoteur endogène murin. L'expression de TDP-43^{sauvage}, TDP-43^{A315T} et TDP-43^{G348C} étant plus modérée dans ces derniers, le phénotype en résultant ressemble à celui observé chez l'humain, avec un développement d'inclusions ubiquitinées et un déficit moteur léger s'aggravant avec l'âge¹⁶⁷. Le groupe Tsai *et al*¹⁶⁸ ont généré un modèle de surexpression de TDP-43 dans la partie antérieure du cerveau s'apparentant à un modèle de DFT-U. Les souris montrent des déficits d'apprentissage et de mémoire, accompagnés par l'apparition d'inclusions cytoplasmiques ubiquitinées au cours de l'âge de la souris.

La suppression de l'expression totale de TDP-43 est létale pour les embryons murins^{169,170}. Une déplétion uniquement dans les neurones moteurs provoque une dénervation musculaire accompagnée d'une réduction des neurones moteurs alpha ainsi qu'une accumulation de neurofilaments phosphorylés, marqueur de la pathologie^{171,172}.

En plus des modèles murins, il existe de nombreux modèles issus du ver *C. elegans* dont l'aide est précieuse pour la compréhension de mécanismes simples et le ciblage thérapeutique. Les mutants TDP-43 présentent tous un déficit moteur¹⁷³, ce dernier étant utilisé comme marqueur de validité de molécules thérapeutiques. Enfin des modèles de *Drosophila* exprimant TDP-43^{sauvage}, TDP-43^{A315T} (réf:174) ou bien même dont TDP-43 est déplété¹⁷⁵ démontrent des dégénérescences oculaires ainsi que des problèmes moteurs récapitulant la pathologie.

L'avènement de la technologie de CRISPR/Cas9 a ouvert un nouveau champ de possibilités concernant les modèles d'études. En effet grâce à une manipulation directe sur le gène d'intérêt, on peut désormais introduire des mutations ponctuelles semblables à celles observées chez les patients, mais également étudier leurs effets sans artéfacts de surexpression. Le premier modèle a très récemment été publié¹⁷⁶ démontrant un gain de fonction de TDP-43^{Q331K} dû à la perturbation de son autorégulation.

IV.5. b.1. Chirurgicaux

Les modèles de blessures induites de façon chirurgicale sont très limités et sont utilisés uniquement pour observer la délocalisation brève de TDP-43 dans le cytoplasme. En effet, l'équipe du Dr Strong¹⁷⁷ a montré que la section du nerf sciatique en proximal et en distal de la moelle épinière provoque une relocalisation de TDP-43 au cytoplasme dans les jours qui suivent la chirurgie. La relocalisation est réversible 28 jours après la section du nerf. Cette étude a permis de voir l'effet de TDP-43 cytoplasmique sur la progranuline. Elle a aussi démontré que

la relocalisation cytoplasmique de TDP-43 peut être un processus physiologique de réponse à une blessure et donc un stress externe.

V. GRANULES DE STRESS

V.1. Historique et généralités

Le stress cellulaire intervient dans la plupart des situations pathologiques et ne semble pas discriminer les cellules de l'organisme. Plus les agressions sont potentiellement dangereuses pour l'organisme, plus leur système de défense est évolué et sophistiqué.

Qu'il s'agisse d'une augmentation du stress oxydatif, d'un choc thermique ou même d'infections virales, les cellules ont besoin de mécanismes pour les aider à survivre. Un de ces mécanismes consiste en l'arrêt de la traduction globale avec une priorité donnée aux protéines et/ou chaperonnes permettant d'éliminer les dommages engendrés par l'exposition au stress. L'ARNm décroché, ainsi que la machinerie ribosomique se retrouve stockée dans des granules cytoplasmiques appelés granules de stress. Ces structures assurent la protection de ces ARNm dont la traduction a été arrêtée ainsi que les composants de la machinerie de traduction¹⁷⁸. Ils sont considérés comme des sites de triages, conservant ainsi les transcrits en vue de leur traduction après résolution du stress. Les transcrits destinés à être détruits seront dirigés, par les GSs, vers les structures responsables de leur destruction. Le dogme dans le domaine est que ces granules protègent certains ARNm en vue d'une traduction rapide après le stress, réduisant ainsi le coût énergétique d'une nouvelle synthèse d'ARNm par la cellule¹⁷⁹.

Il a fallu quelques décennies d'études avant d'arriver à une cristallisation de ce concept. En effet, le premier rapport évoquant clairement ce mécanisme remonte à 1983, année où l'équipe du Dr Neumann étudiait le devenir des protéines de choc thermique (HSP) dans l'organisme des cellules de tomates. Cette étude fait suite à celle de Alfred Tissière qui a

déterminé la synthèse de ces nouvelles protéines suite au choc thermique chez la *Drosophila*¹⁸⁰. C'est ainsi qu'en 1999¹⁸¹ le terme de granules de stress (GSs) a vu le jour.

V.2. Définition

Les granules de stress étant principalement composé d'ARNm non traduits, elles font donc partie de la grande famille des granules à ARN. Il est important de clairement les définir pour être capable de les étudier plus spécifiquement. Leur classification est basée sur leur localisation cellulaire (noyau, cytoplasme, axone, etc.), le type cellulaire (cellules germinales, neurones), leur composition (la présence de certains marqueurs), réponse aux stimuli (stress intrinsèques et extrinsèques), leur état dynamique et leur fonction (stockage ou dégradation d'ARNm, réponse au stress, transport axonal, etc.)^{136,182}.

L'équipe du Dr Anderson est reconnue comme étant la spécialiste des GSs et de leur implication dans la pathologie du cancer. Au cours des années, ils ont été des précurseurs dans l'étude des mécanismes de GSs et ont pu avancer une définition de ces entités. Plusieurs caractéristiques sont requises¹⁸¹, il s'agit de structures cytoplasmiques se formant en conséquence à un stress cellulaire. Ils contiennent des ARN polyadénylés, des sous-unités ribosomales et des PLA (exemple TIA-1, TIAR, HuR etc.). Suite à la phosphorylation de eIF2 α , multiples inclusions se forment et fusionnent au cours du temps. Enfin, la formation des GSs est inhibée par des traitements tels que le cyclohexamide. Cette définition a depuis évolué quant à leur formation, mais les principales caractéristiques telles que la concentration en ARNm restent vraies.

V.3. Types de stress conduisant à leur formation

Toute déviation de l'environnement idéal de la cellule peut être considérée comme un stress. L'un des premiers stress avec lequel ces granules ont été découverts était le choc

thermique. Mais depuis une liste non exhaustive apparaît dans la littérature extensivement rapportés¹⁵⁵. Les GSs ont été observées suivant : un stress oxydatif^{147,181,183} et/ou osmotique¹⁸⁴, stress mitochondrial^{185,186}, exposition des cellules aux UV^{187,188}, stress du réticulum endoplasmique^{189,190}, inhibition du protéasome^{142,191}, des infections virales¹⁹²⁻¹⁹⁴. Certains traitements cancéreux¹⁹⁵ peuvent, eux aussi, induire la formation des GSs. Tous ces stress ne conduisent cependant pas aux mêmes types de GSs. En effet, la composition et donc la dynamique des GSs sont reconnues changeantes suivant le type de stress^{179,196,197}. Enfin, il existe aussi des stress qui ne conduisent pas à la formation de GSs telles que les traitements aux cytokines inflammatoires ou bien des facteurs déstabilisateurs des microtubules ou filaments intermédiaires¹⁸¹.

V.4. Dynamique des granules de stress

Les GSs sont des structures extrêmement dynamiques, leur cycle de formation et de désassemblage suit une cinétique chronométrée, mais comportant encore de grandes zones d'ombres.

V.4. a. Formation

Les GSs se forment très rapidement suivant un stress (*figure 7*). La majorité des stress entraînent la formation de GSs, appelés canoniques, déclenché par la phosphorylation de la sous-unité eIF2 α et inhibant ainsi la formation du complexe ternaire censé initier la traduction^{181,198}. Cette inhibition permet le désassemblage des ribosomes et le relargage des ARNm associés à des protéines, l'augmentation de la concentration cytoplasmique en ARNm va pousser vers la formation des GSs¹⁹⁹. Il faut cependant noter qu'il existe des GSs non- canoniques qui se forment suivant certains types de stress¹⁹⁷, mais indépendamment de la phosphorylation de

eIF2 α , la traduction est aussi suspendue à leur formation, mais ce processus n'est pas encore complètement décrit^{197,200,201}.

Les protéines présentes aux GSs possèdent souvent un domaine de faible complexité (DFC) ou DID facilitant l'interaction entre protéines comme le cas, mentionné plus haut, de TDP-43. Il a longtemps été établi que les GSs se forment simplement suite à l'augmentation de la concentration cytoplasmique des PLA, ce qui augmente l'assemblage des protéines médié par leurs interactions hydrophobiques^{26,202}. Une étude plus récente ajoute un niveau de complexité en démontrant qu'il s'agit de l'augmentation de la concentration en ARNm labile dans le cytoplasme suite à l'arrêt de la traduction qui conduit au recrutement des PLA, censés stabiliser les ARNm¹⁹⁹. Ceci va promouvoir la séparation de phase de ces complexes dans le cytoplasme, conduisant à la formation de gouttelettes dynamiques¹⁴¹. Ce mécanisme est strictement régulé, de manière encore inconnue, afin d'éviter la formation aberrante des GSs²⁰³.

V.4. b. Assemblage

À leur formation, les GSs sont petits et dispersés de façon aléatoire dans le cytoplasme. Après un certain temps, ces petits granules fusionnent pour en former des plus gros, moins nombreux, et répartis tout autour du noyau^{179,182,204–206} (*figure 7*).

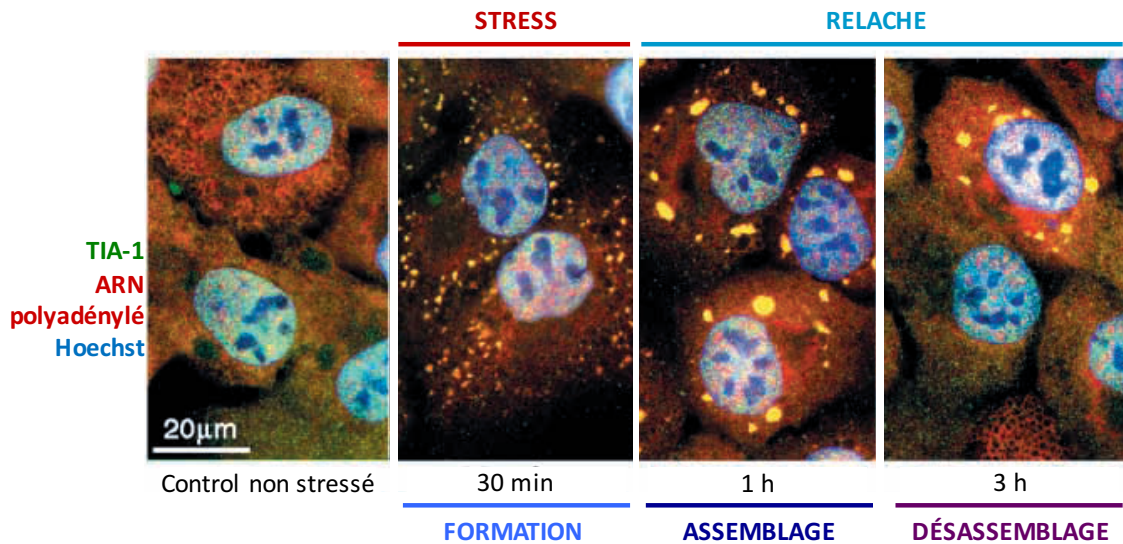


Figure 7 : Cinétique de constitution des granules de stress. Adapté d'après Anderson & Kedersha, 2002. Les cellules DU145 ont été traitées à l'arsénite de sodium (SA) de concentration 1mM pendant 30 min. Le milieu a ensuite été changé et le stress relâché. La formation de multiples petits GS a été reconnue grâce au double marquage cytoplasmique de la protéine TIA-1 et de l'ARNm au moyen de la sonde polyadénylée. L'étape d'assemblage montre bien la coalescence des petites granules formant ainsi des plus grands et moins de GS. Enfin, le désassemblage des granules se produit graduellement.

Cette étape, semblait être clé dans la cinétique des GSs mais sa fonction demeurerait inconnue jusqu'à récemment. En effet grâce à un modèle cellulaire où TDP-43 est déplété, des études ont montré une altération de l'assemblage des GSs ce qui ultimement mène à une protection moindre des ARNm^{148,207}, démontrant ainsi que cette étape est la base du fonctionnement des GSs. Dans ces études, l'assemblage est en fait médié par « Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 » (G3BP1) une PLA régulée par TDP-43¹⁴⁷. Après l'avènement des preuves démontrant la formation des GSs par séparation de phase, il a été proposé qu'ils seraient composés de deux compartiments : un noyau interne compact et moins dynamique entouré d'une couche externe plus lâche entretenue par des interactions labiles²⁰⁸. Deux grandes hypothèses concernant l'assemblage de ces structures sont alors avancées²⁰⁹. La

première est qu'il existe une formation de petites structures de PLA dont la concentration croissante les rend plus rigides et moins labiles²⁰⁸. C'est une hypothèse moins probable étant donné qu'il n'y a pas de changement de taille ou de nombre, observé dans différentes études^{148,149,178,196}. La deuxième hypothèse, qui semble mieux coïncider avec ce qui a été publié jusqu'à lors, propose la nucléation des PLA telle que G3BP1 ou TIA-1 (T-Cell-Restricted Intracellular Antigen-1) en noyaux plus rigides suivis par une seconde étape de coalescence de ces structures pour former ainsi la couche externe plus labile²⁰⁹. Cette couche externe permettrait des échanges entre granules d'ARN, gage de dynamisme et constante signalisation efficace pour la cellule.

L'assemblage des GSs est un mécanisme actif et dynamique, impliquant la machinerie de transport au travers des protéines motrices dynéine et kinésine (transport antérograde et rétrograde respectivement). Il est admis que les microtubules jouent un rôle important dans le transport et l'assemblage des GSs²¹⁰. D'après une étude²¹¹ la déstabilisation des microtubules au moyen d'un traitement au nocodazole a altéré la formation même de GSs. Ce résultat indique que la formation, l'assemblage et même possiblement le désassemblage des GSs dépendent des microtubules et la machinerie de transport.

V.4. c. Désassemblage

L'aspect transitoire des GSs réside dans leur assemblage rapide, mais aussi dans leur désassemblage qui a lieu quelque temps suite à la résolution du stress (*figure 7*). Sans désassemblage la traduction protéique ne peut reprendre^{181,191,212}. En effet, la dissolution des GSs libère leurs composants tels que les ARNm et sous-unités ribosomales permettant la reprise de la traduction. Cette dernière aurait autrement, dû être retardée jusqu'après la synthèse des nouveaux composants. Cependant, il s'agit d'une étape très méconnue et très peu de preuves existent quant à la validation des hypothèses avancées par la communauté.

L'une d'entre elles serait semblable à un assemblage en deux étapes, le désassemblage s'effectuerait en deux étapes aussi. En premier, la dissolution de la couche externe, qui représente la plateforme communicante de ces granules, suivit par la disparition des noyaux, et ce par autophagie. Il a été démontré auparavant que l'autophagie est un mécanisme pouvant désassembler les GSs^{188,213-216}. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que plusieurs composantes du système autophagique sont présentes aux GSs telles que VCP/p97 et HDAC6^{188,213}, pouvant ainsi même directement agir sur le noyau. La déplétion de VCP/p97 ou son inhibition altère la disparition des GSs dans les cellules^{217,218}.

Un autre mécanisme décrit dans la littérature est la dissolution médiée par des protéines chaperon. Il s'agit de la HSP70-72 dont l'expression est induite à la suite de certains stimuli^{191,219}. Il est publié que certaines HSP sont présentes aux GSs^{215,220}. De plus, la surexpression de HSP72 inhibe la formation des GSs provoquée par l'inhibition du protéasome, et au contraire la déplétion de HSP70 aux moyens d'ARN interféron (ARNi) altère le désassemblage des GSs¹⁹¹. L'implication de HSP dans le désassemblage des GSs atteste d'un lien entre ces structures et l'état protéostatique de la cellule²²¹.

Il s'agit ici de fortes preuves appuyant les deux hypothèses de désassemblage des GSs, mais il reste encore du travail pour confirmer le mécanisme d'autant plus qu'il pourrait très bien s'agir d'une combinaison de plusieurs modèles suivant le type et la composition des GSs.

V.5. Composition des granules de stress

Il est établi que la composition des GSs varie suivant les conditions de stress^{179,196}. Mais le dynamisme de ces structures et leur constant échange avec le cytoplasme¹⁰³ rendent l'étude de leur composition par les techniques standards difficile. Au moyen d'immunomarquages très

laborieux et microscopie tels que rapportés dans la revue de littérature d'Aulas *et al*¹⁵⁵, la majorité des protéines présentes aux GSs, 60%, sont des PLA tels que : TDP-43, Staufen, G3BP1, G3BP2, PABP, TIA-1^{147,220,222,223}. Mais aussi des facteurs d'initiation de la traduction eIF2, eIF3 and eIF4E^{179,196,222}. Il faut toutefois noter l'exemple de la protéine FUS qui se retrouve recrutée aux GSs sous sa forme mutée. C'est seulement suivant un stress osmotique (sorbitol ou sucrose) que l'endogène de FUS est recrutée aux GSs²²⁴.

De récentes études se concentrant sur le réservoir d'ARNm, qui constituent la majorité des composants des GSs¹⁹⁶, ont réussi par des approches biochimiques couplées au séquençage d'ARN, à définir une composition plus élargie des GSs^{225,226}. Cette étude décrit la présence d'environ 10% des ARNm totaux de la cellule aux noyaux des GSs. Connaissant la variation de composition des GSs en protéine, la même variation pour les ARNm serait attendue. Par exemple, l'ARNm de l'enzyme GAPDH (glycolysis-related enzyme glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) se retrouve spécifiquement au sein des GSs à la suite d'un stress osmotique ou choc thermique tandis que l'ARNm du récepteur à la transferrine (TFRC) n'y est présent qu'après un choc thermique²²⁶ et enfin celui de HSP70 est exclu malgré le stress¹⁹⁶.

Cette pensée est pertinente étant donné que pour chaque type de stress le dommage en résultant est différent. En gardant à l'esprit que la traduction de certaines protéines est maintenue durant le stress aidant ainsi la cellule à survivre^{191,227}. Il est tout à fait prévisible que la cellule dirige spécifiquement un réservoir de complexes protéine- ARNm différent aux GSs dépendant du type de stress.

V.6. Granules de stress au travers des différents types cellulaires

La spécificité cellulaire quant à la réponse au stress est un fait assumé¹⁷⁸, mais l'ampleur de cette affirmation n'est actuellement pas avérée dans la littérature. D'autant qu'en ce qui

concerne l'étude des GSs la majorité des publications utilisent les mêmes modèles de cellules transformées (45% des publications utilisent des cellules HeLa, d'après la revue de 150 publications, entre 1999 et 2014, faite par Anaïs Aulas dans le cadre de sa thèse).

L'une des premières études évoquant une différence avec une possible répercussion sur le mécanisme des GSs a été celle de Marcuccilli *et al.*²²⁸. Les chercheurs ont examiné la différence d'expression des HSF (heat shock factors) entre les neurones hippocampaux et les cellules gliales et ont découvert que l'expression différentielle des facteurs dans les deux types cellulaires mène à une vulnérabilité différente au stress.

D'autres études ont entrepris l'étude des GSs dans différents types cellulaires¹⁸⁴, mais souvent la comparaison directe entre la réponse des différents types cellulaires ou le recrutement possiblement différentiel des protéines aux GSs n'est pas effectuée.

V.7. Les granules de stress *in vivo*

La première observation des GSs a été effectuée dans un organisme pluricellulaire grâce aux plants de tomates²¹⁹. En outre, une équipe étudiant le *C. elegans* a développé une souche transgénique exprimant la forme humaine de TIA-1 couplée à la GFP, permettant ainsi d'observer *in vivo* les GSs, au travers de la membrane transparente du nématode²²⁹.

De plus, une méthode récemment publiée démontre la formation de GSs *in vivo* chez la souris ayant subi un choc thermique^{230,231}. Ces observations ont été seulement très brièvement rapportées et une étude plus extensive demeure à être effectuée.

L'observation des GSs *in vivo* prouve qu'il ne s'agit pas seulement de l'étude d'un artefact dû aux cultures cellulaires *in vitro*.

V.8. Lien aux maladies

Il est difficile de séparer l'idée d'un stress cellulaire et d'une pathologie quelconque étant donné les dérèglements certains causés par les maladies. Que ce soit les cancers ou les maladies neurodégénératives, qui semblent être les deux extrémités d'un spectre pathologique, l'implication des mécanismes de réponse au stress sont très importants dans le devenir de la cellule pathogène protégée ou de la cellule saine qui meurt.

V.8. a. Cancers

Les cellules cancéreuses ont un environnement de stress constant résultant d'un manque d'irrigation vasculaire, dû à la croissance trop rapide des tumeurs, causant ainsi une hypoxie²³², hyperosmolarité, et un manque de nutriments. Leur métabolisme est également accéléré, causant ainsi une dérégulation de la protéostasie et donc un stress du RE²³³. Leur réponse et adaptation au stress est requise afin de se maintenir face à leur environnement et les traitements anti cancéreux.

Plusieurs études ont relié la survie des cellules cancéreuses à la formation des GSs. En réponse au Bortezomib, un traitement de chimiothérapie, l'équipe de Fournier *et al.*¹⁹⁵ a démontré que certaines lignées de cellules cancéreuses (cancer du côlon (Caco), cancer cervical (HeLa) et cancer des poumons (Calu-I)) développent des GSs. Ces derniers sont déclenchés à la suite de la phosphorylation de eIF2 α et de la déplétion de la kinase spécifiquement responsable de cette activation, que HRI suffit pour augmenter l'apoptose des tumeurs aux suites du traitement au Bortezomib.

Un autre élément qui appuie un lien entre GSs et cancers est la présence de plusieurs PLA, impliquées dans la pathologie, au sein des GSs. En effet le facteur eIF4E qui est reconnu comme ayant un rôle oncogène par son implication dans la prolifération et la survie/mort cellulaire^{234,235} et est aussi présent aux GSs. HuR est un marqueur reconnu des GSs et il se trouve

surexprimé dans les cancers du pancréas et du côlon. De manière intéressante, son expression est corrélée à celle de VEGF^{236,237}.

Les protéines présentes aux GSs semblent altérer l'expression des gènes et l'initiation, ou progression, de certains cancers. Les traitements de chimiothérapie modulant l'assemblage des GSs, ces derniers semblent se présenter comme biomarqueurs pour les thérapies.

V.8. b. Maladies neurodégénératives

La dérégulation du métabolisme de l'ARN est l'un des mécanismes mis en cause dans les maladies neurodégénératives²³⁸⁻²⁴³. En effet de multiples PLA se retrouvent mutées ou agrégées dans des pathologies telles que la SLA et/ou DFT et MA¹⁰. Des protéines telles que TDP-43 sont même impliquées dans les trois pathologies. D'autres protéines comme FUS, TIA-1 et HNRNPA1 sont des composantes importantes des GSs.

La MA est une pathologie classée en tant que tauopathies. En effet, elle est caractérisée par la présence intracellulaire d'amas protéiques en forme de filaments, contenant des formes hyperphosphorylées de Tau, et des plaques extracellulaires d'amyloïdes beta (A β)^{244,245}. Tau est une protéine qui lie les microtubules axonaux, malgré le peu de choses connues sur son rôle il est maintenant admis qu'elle facilite la formation de GSs au travers de TIA-1²⁴⁶. Sa surexpression dans les neurones de l'hippocampe accélère la formation de GSs, et sa forme mutante tau^{P301L} provoque le même effet²⁴⁶. De plus, tau possède un DID lui conférant la capacité de SPL^L²⁴⁷. Aussi elle interagit avec TIA-1 et G3BP1, deux protéines capables de nucléer des GSs^{246,248-250}. La surexpression de TIA-1 réduit la solubilité de tau, insolubilité retrouvée dans la pathologie²⁴⁶. Des immunomarquages de G3BP1 dans du tissu de patient avec une agrégation de tau ont montré une colocalisation entre G3BP1 et tau au sein de ces inclusions²⁵⁰. Des spéculations ont été faites plaçant les GSs à l'origine de ces inclusions. Il manque les preuves pour appuyer cette hypothèse, mais on peut cela dit estimer que la

dérégulation des dynamiques de GSs peut avoir un effet sur la susceptibilité au stress et à la mort neuronale.

Les GSs ont été très rapidement reliés à la pathologie de la SLA/DFT, après la découverte des agrégats positifs pour TDP-43 et où sont présents des marqueurs de GSs tels que TIA-1, TIAR et eIF3^{205,250,251}. Des études de surexpression de mutants de TDP-43 et FUS ont démontré une délocalisation et agrégation anormale de ces protéines des suites d'un stress²⁵¹⁻²⁵³. Dans le cas de TDP-43 les GSs semblent avoir du retard à la formation ou l'assemblage impliquant une altération de leur dynamique, alors que FUS semble plus présente aux GSs, évoquant une augmentation d'interaction^{155,254-256}.

Récemment, des mutations au sein de TIA-1 ont été rapportées comme causant la SLA²⁵⁷. Ces mutations semblent empêcher le désassemblage des GSs et les rendre moins dynamiques. De plus, l'insolubilité de TDP-43 au sein de ces structures a été observée, les plaçant ainsi semblables aux agrégats présents chez les patients²⁵⁷.

Depuis la découverte récente des expansions pathologiques de *C9orf72*, plusieurs études se sont penchées sur le rôle possible lié aux GSs. Il s'avère que l'expression des protéines répétitives de dipeptides (PRD) dans des modèles cellulaires et de *Drosophila* induit une interaction entre ces peptides anormaux et des PLA composantes des GSs telles que TDP-43, FUS et hnRNP A1 et conduit à la formation d'inclusions insolubles²⁵⁸⁻²⁶¹. De plus, l'expression de certains PRD induit à elle seule la formation spontanée de GSs non dynamiques²⁵⁹. Ceci indique que ces PRD altèrent la dynamique des GSs par leur interaction avec des PLA, au travers de leur DFC²⁵⁹.

Les mécanismes moléculaires par lesquels les PLA, impliquées dans la pathologie, mènent à la neurodégénérescence dans le cas de la SLA ne sont pas encore connus, mais il est démontré qu'il existe un lien entre la maladie et les GSs. En se rappelant les deux principales

hypothèses, possiblement liées, de gain ou perte de fonction de TDP-43 causant la pathologie, il est pressant de placer les GSs dans ce contexte. Le gain de fonction suggère que les protéines présentes aux GSs et associées à la SLA, par leur aspect pathologique, altéreraient la fonction des GSs et l'homéostasie de l'ARN. Les inclusions cytoplasmiques formées par ces protéines troublent le dynamisme²⁶² des GSs les rendant persistants et séquestrent des ARNm essentiels, augmentant ainsi la mort cellulaire^{184,205,252,256,263}. La perte de fonction est postulée en la perte de la régulation efficace du métabolisme des ARNm. En effet, plusieurs des protéines présentes aux GSs sont des PLA, leur rôle serait inhibé ce qui conduit à l'altération des dynamiques des GSs. Cette altération a mainte fois été rapportée dans le cas de la perte de fonction de TDP-43^{147,148,207}. Aussi VCP, comme décrit au-dessus, possède un rôle dans le désassemblage des GSs. La mutation R155H de VCP provoque l'augmentation de l'ubiquitination et le stress du RE²⁶⁴. Enfin, l'expression de certains mutants de VCP provoque la relocalisation de TDP-43 au cytoplasme^{264,265}.

Toutes ces évidences présentées au-dessus poussent vers un lien entre les maladies neurodégénératives et la perturbation des GSs. En cela, il est important de comprendre plus profondément le mécanisme des GSs afin d'identifier plus précisément leurs rôles dans la pathologie.

VI. INTRODUCTION ET QUESTIONS DE L'ÉTUDE

L'hypothèse est que la perte de fonction de TDP-43, due à sa déplétion du noyau, et sa séquestration et/ou son développement des agrégats cytoplasmiques, induit un dysfonctionnement des dynamiques des GSs. Cette altération causerait ultimement la vulnérabilité des neurones moteurs au stress et induisant leur mort. Notre laboratoire a déjà

apporté des éléments de réponses^{147,148,207}, mais il subsiste des zones d'ombres la laissant encore au stade de l'hypothèse celle de notre étude actuelle.

Que la réponse des cellules au stress soit protectrice ou destructrice dépend dans une large mesure de la nature et de la durée du stress ainsi que du type cellulaire. Il s'agit d'une affirmation que très peu clairement démontrée. Partant de ce postulat les questions de notre étude se sont alors développées.

Comme indiqué au-dessus la majorité des études des mécanismes des GSs, même dans le cas de la SLA, a été effectuée dans des lignées transformées (aux alentours de 80%) éloignées des mécanismes propres aux neurones et cellules gliales impliquées dans la pathologie. Aussi ceux qui ont utilisé des cellules pertinentes à la maladie ne se sont pas intéressés aux détails des mécanismes des GSs, seulement à une cinétique globale ou l'observation de leur formation.

Enfin, l'aspect le plus conséquent de cette étude est l'implication de l'âge *in vitro* et *in vivo*, facteur reconnu du développement de la pathologie, ainsi que le modèle de « multiple hits » sur le mécanisme des GSs et d'une réponse au stress qui pourrait être destructive pour la cellule.

Chapitre 2

Publication

TDP-43 regulation of stress granule dynamics in neurodegenerative disease-relevant cell types

Research article published in Scientific Reports (2018) May 15;8(1):7551, PMID: 29765078

Préface

Les granules de stress ont souvent été reliés aux maladies neurodégénératives en général et à la SLA en particulier. Leurs dynamiques ont été étudiées, pour la majorité, dans des lignées transformées très peu liées aux pathologies, et ce, sans prendre en compte la variabilité dans la réponse au stress, très reconnue entre les types de stress et types cellulaires. Le but de cette étude a été d'examiner la dynamique spécifique des GSs dans des cellules pertinentes pour la SLA. Nous nous sommes également intéressés à l'impact de la déplétion de TDP-43 (protéine importante dans cette réponse) sur les mécanismes des GSs et ce en utilisant différents stress. J'ai mis au point des protocoles pour la culture de cellules primaires murines de neurones corticaux, astrocytes et fibroblastes (adultes et embryonnaires) au sein du laboratoire. J'ai effectué des traitements de stress oxydatif et osmotique sur ces cultures dépourvues de TDP-43 (transfections d'ARNi). J'ai effectué et analysé des expériences d'imagerie cellulaire et d'immunofluorescence afin de démontrer des différences majeures dans les cinétiques de GSs entre les types cellulaires cités au-dessus. J'ai montré l'implication de TDP-43 dans la cinétique de stress ainsi que l'assemblage des GSs (Fig. 1-5, Supp Fig 1-4). Grâce à un modèle de vieillissement *in vitro* de neurones que j'ai mis en place, j'ai démontré une altération de l'assemblage des GSs, accompagné par une diminution de niveau d'expression de TDP-43. Par des techniques de biochimie et d'immunofluorescence, j'ai démontré que la déplétion de TDP-43 provoque l'augmentation de l'expression d'AQP4 (Fig. 6, Supp Fig 5). Grâce à une collaboration avec le Dr Alexandre Prat dont l'étudiante Camille Grasmuck a réalisé des acquisitions en cytométrie en flux et analysé les résultats (Fig. 6 C et D), on a montré que les astrocytes dépourvus de TDP-43 présentaient deux fois moins de canaux AQP4 à leur surface comparée aux contrôles. Enfin la collaboration avec la Dre Heather Durham et son étudiante Rachel Kuta, qui a réalisé les injections d'ARNi, nous a permis l'accès à des cultures de neurones moteurs murins qui m'a permis d'effectuer toutes les analyses quant aux dynamiques des GSs dans ce type cellulaire très pertinent pour la SLA. Dre. Christine Vande Velde et moi avons conçu l'étude et écrit le manuscrit, j'ai effectué les expériences et assemblé les figures.

TDP-43 regulation of stress granule dynamics in neurodegenerative disease-relevant cell types

Yousra Khalfallah^{1,3}, Rachel Kuta⁴, Camille Grasmuck^{2,3}, Alexandre Prat^{2,3}, Heather Durham⁴
and Christine Vande Velde^{2,3*}

Departments of ¹Biochemistry and Molecular Medicine and ²Neurosciences, Université de Montréal, ³Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Centre ⁴Montreal Neurological Institute and Department of Neurology/Neurosurgery, McGill University, Montréal, QC, Canada.

***Corresponding author:**

Christine Vande Velde, Ph.D.
Department of Neurosciences, Université de Montréal
CRCHUM-Tour Viger
900, rue Saint-Denis, R09.442
Montreal, QC, CANADA H2X 0A9

Email: c.vande.velde@umontreal.ca
Phone: 514-890-8000 poste 2883

ABSTRACT

Stress granules (SGs) are cytoplasmic foci that form in response to various external stimuli and are essential to cell survival following stress. SGs are studied in several diseases, including ALS and FTD, which involve the degeneration of motor and cortical neurons, respectively, and are now realized to be linked pathogenically by TDP-43, originally discovered as a component of ubiquitin-positive aggregates within patients' neurons and some glial cells. So far, studies to uncover the role of TDP-43 in SGs have used primarily transformed cell lines, and thus rely on the extrapolation of the mechanisms to cell types affected in ALS/FTD, potentially masking cell specific effects. Here, we investigate SG dynamics in primary motor and cortical neurons as well as astrocytes. Our data suggest a cell and stress specificity and demonstrate a requirement for TDP-43 for efficient SG dynamics. In addition, based on our *in vitro* approach, our data suggest that aging may be an important modifier of SG dynamics which could have relevance to the initiation and/or progression of age-related neurodegenerative diseases.

INTRODUCTION

TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) was originally characterized as a transcriptional repressor of the HIV-1 genome via binding to the trans-activation response (TAR) element¹. TDP-43 is a highly conserved, ubiquitously expressed RNA-binding protein associated with the heterogeneous ribonucleoprotein (hnRNP) family. The RNA-binding ability of TDP-43 is conferred by two RNA recognition motifs (RRM1 and RRM2), while the C-terminal glycine-rich region mediates protein-protein interactions. In addition to known roles in alternative splicing and transcriptional regulation in the nucleus²⁻⁴, TDP-43 functions to stabilize and transport mRNA in the cytoplasm^{5,6}. Additionally, TDP-43 is recruited to cytoplasmic RNA granules that are formed following exposure to various environmental stresses (oxidative, osmotic, heat shock, viral infection). These granules, termed stress granules (SGs), are membrane-less organelles that are believed to facilitate cell survival via the storage of non-essential mRNAs, translation factors and RNA-binding proteins during stress exposure^{7,8,9}. SGs follow a linear dynamic featuring an initial nucleation/formation followed by assembly into larger structures, and eventual disassembly as the cell recovers. In transformed cell lines, depletion of TDP-43 has a negative impact on each of these steps^{10,11}, indicating a key role for TDP-43 in the regulation of this essential cell survival mechanism.

The term “TDP-43 proteinopathies” first emerged with the discovery of ubiquitinated cytoplasmic inclusions of TDP-43 in the neurons of patients affected with frontotemporal dementia (FTD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS)^{12,13}. These diseases impact particular neuronal populations, with ALS being due to motor neuron degeneration and accompanying gliosis^{14,15,16} and FTD involving extensive degeneration of cortical neurons. Despite TDP-43-containing cytosolic inclusions in neurons and some glial cells being a pathological hallmark of ALS and FTD, the mechanism(s) by which TDP-43 contributes to neurodegeneration remains unclear.

Furthermore, a persistent question in the field is whether TDP-43 evokes toxicity via the gain of an unknown cytosolic function or via the loss of some nuclear function. This outstanding question stems from the observation that neurons presenting cytoplasmic pathological inclusions usually also demonstrate a depletion of the nuclear pool of TDP-43^{12,13,17}.

Stress response mechanisms are heavily studied in neurodegenerative diseases and there has been a recent convergence on the involvement of SGs in ALS and FTD. Although it is appreciated that SG morphology and composition differ according to the stressful stimuli and the cell type^{9,18}, few studies have been conducted in cell types relevant to neurodegenerative disease¹⁹. Thus, we aimed to investigate SG dynamics and the impact of TDP-43 on these structures in primary neurons and glia. We observed distinct differences in SG morphology and dynamics between cortical and motor neurons, astrocytes, and fibroblasts. The data demonstrate that TDP-43 is required for optimal SG dynamics in primary neurons and glia exposed to oxidative stress. Moreover, the dependence on TDP-43 for SG formation was exacerbated in the context of hyperosmotic stress. Finally, neurons “aged” via prolonged culture times had impaired SG dynamics accompanied by decreased TDP-43 expression.

RESULTS

Variability in stress granule morphology and dynamics in primary cells

To study differences in SG dynamics between cell types, we chose primary cultures of mouse cortical and motor neurons as neuronal subtypes implicated in the spectrum of TDP-43 proteinopathies, especially FTD and ALS^{12,20}; and astrocytes, glia cells implicated in ALS progression¹⁴. As a cell type, unrelated to these disease conditions, we also cultured mouse embryonic fibroblasts. Given that the majority of published studies on SGs utilize sodium arsenite (SA) as the SG-provoking agent²¹, our first goal was to determine if SA can provoke SG formation

in the primary cultures selected. SGs were labelled with an oligo(dT) probe as a marker, since polyadenylated mRNA is obligatorily recruited into SGs following stress exposure regardless of cell type, whereas protein composition can vary between cell types, as demonstrated by the variable colocalization of known SG markers HuR²² (**Fig. 1**) and CAPRIN1²³ (**Suppl. Fig. 1**) with oligo(dT) labelled mRNA. In all of the primary cells examined, SGs were observed following 0.5mM SA treatment, the standard concentration used in SG experiments²¹, albeit qualitative differences in SG shape and size were noted (**Fig. 1, Suppl. Fig. 1**). Specifically, SGs were easily visible and loosely distributed in a perinuclear fashion in SA-treated motor and cortical neurons (**Fig. 1A, C; Suppl. Fig. 1A, C**). In contrast, SGs in astrocytes were more localized at the cell periphery (**Fig. 1B; Suppl. Fig. 1B**) and SGs in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were frequently smaller and randomly dispersed throughout the cytoplasm (**Fig. 1D; Suppl. Fig. 1D**). These qualitative observations of SGs in astrocytes and MEFs were equivalent at a longer SA exposure time (1hr), although cell viability was compromised (**Suppl. Fig. 2**). These observations suggest cell type-dependent difference in SG dynamics, which prompted a more detailed examination over time.

In transformed cell lines exposed to 0.5mM SA, several small SGs assemble within minutes of exposure and then coalesce into a fewer number of larger puncta over a defined time window¹⁰. In primary astrocytes, a similar pattern was observed in that more than 70% of cells contained SGs following a brief 30 min SA exposure; this pattern was maintained until a gradual disassembly of the structures began at 120 min including SA exposure (**Fig. 2B, black line; Suppl. Fig. 3A**). In contrast, SGs were detected in only 60% of primary MEFs after 30 min of SA stress. Surprisingly, there was no maintenance period in this cell type. Instead, SG rapidly disassembled after withdrawal of SA, such that SGs were detected in only 20% of fibroblasts 60 min post SA exposure (**Fig. 2D, black line**). Finally, the most surprising result was that cortical neurons were more resistant to SG formation, and SGs persisted longer. Treatment with 0.5 mM SA for 30 min, the gold-standard in

the field, induced SGs in only 15% of the neurons, whereas treatment for 60 min was required to initiate robust SG formation (**Fig. 2F**, *black line*). (Note, 60 min SA treatment compromised the viability of MEFs and astrocyte cultures, precluding further analysis in these conditions.) This experiment suggests that primary cortical neurons are refractory to a certain level of stress exposure. However, once formed, SGs were maintained until 210 min, much longer than in other cell types, at which point there was a precipitous disassembly of SGs. Taken together, these results indicate there are detectable differences in the timing of SG formation and disassembly amongst different cell types relevant to ALS/FTD.

TDP-43 regulates stress granule dynamics in primary cells exposed to oxidative stress

In transformed cells, TDP-43 depletion via siRNA impedes SG formation, reduces SG assembly (also referred to as secondary aggregation or coalescence)¹¹ and accelerates SG resolution compared to control siRNA-treated cells¹⁰. Given the observations that different cell types have different kinetics of SG formation and disassembly, and our previous data that TDP-43 is central to SG dynamics in transformed cells, we questioned whether the involvement of TDP-43 also varies in cell types relevant to neurodegenerative diseases. In astrocytes in which nuclear TDP-43 expression was reduced to 39% of control levels (**Fig. 2A**), we observed a similar trend for the impact of TDP-43 on SG formation as assessed immediately following 30 min SA exposure, although the reduction did not reach statistical significance (**Fig. 2B**). However, SG disassembly was accelerated significantly in TDP-43-depleted astrocytes such that only 20% of cells demonstrated distinct SGs at 120 min, compared to 59% of siControl-treated primary astrocytes (**Fig. 2B**). In contrast, in MEFs where nuclear TDP-43 was reduced by 61% compared to siControl (**Fig. 2C**), the requirement of TDP-43 in SG formation was evident, with 64% of siControl-treated, but only 35% of siTDP-43-treated, fibroblasts demonstrating SGs at 30 min post-SA exposure (**Fig.**

2D). Similar results were obtained with a second independent siRNA for TDP-43 (**Suppl. Fig. 3**). In cortical neurons, in which TDP-43 expression was modestly reduced by 40%, we did not observe a TDP-43-dependent effect on SG formation by this assay. With regards to disassembly, a minor defect was observed such that only 4% of TDP-43 depleted neurons contained SGs compared to 12% of control neurons at 270 min. Given the relatively weak suppression of endogenous TDP-43 levels by this approach in cortical neurons, we suspect there is a certain threshold for TDP-43 level that must be surpassed for alterations in SG dynamics to manifest. Nonetheless, these data indicate that TDP-43 contributes to efficient SG dynamics in ALS/FTD-relevant cell types.

Requirement of TDP-43 for SG coalescence is conserved in astrocytes and neurons

We previously reported that TDP-43 is required for SG assembly in transformed cell lines¹¹. Thus, the effect of TDP-43 knockdown by siRNA on stress granule dynamics was assessed in astrocytes and neurons. To measure SG coalescence, as indicated by SG size and number per cell, cells were assessed at high magnification over two time points following SA exposure. As expected, in control siRNA-treated astrocytes exposed to SA, the number of SGs per cell significantly decreased over time, from a mean of 26 SGs per cell at 30 min to 14 SGs per cell at 90 min (**Fig. 3A, B, black bars**) while the size of individual SGs increased about 1.2 μm^2 between 30 and 90 min (**Fig. 3C, black bars**). In contrast, in siTDP-43 treated astrocytes, selected based on diminished TDP-43 labelling (as measured by pixel intensity), individual SG size and number per cell remained unchanged when TDP-43 levels were lowered (**Fig. 3B, C, blue bars**). Similar results were obtained with a second independent siRNA for TDP-43 (**Suppl. Fig. 4A-C**).

The same dependency on TDP-43 for SG coalescence was also observed in primary motor and cortical neurons. As visible in representative images (**Fig. 4A, showed by arrowhead**) siControl-injected motor neurons exposed to SA demonstrated the expected increased size of individual SGs

of $\sim 1 \mu\text{m}^2$ and a decrease in the number of SGs per cell from 60 to 120 min as in the previous experiments (**Fig. 4B-C**, *black bars*). In contrast, SG size and the number of SGs per cell did not change in motor neurons depleted of TDP-43 upon exposure to SA (**Fig. 4B, C**, *blue bars*). Similarly, SG coalescence was observed in cortical neurons expressing basal levels of TDP-43 following SA exposure (**Fig. 4E-F**, *black bars*), but not in TDP-43 siRNA-treated cortical neurons (**Fig. 4E-F**, *blue bars*). Specifically, neurons undergo a reduction in the number of SGs per cell over time, and a significant (albeit subtle) increase in individual SG size (**Fig. 4E-F**, *black bars*). These data were replicated with an independent TDP-43 siRNA (**Suppl. Fig. 4D-F**). Note, although TDP-43 depleted cortical neurons do not demonstrate SG coalescence, an unexpected diminution of SG size at 120 mins was observed with one of the two TDP-43 siRNAs. Collectively, these studies demonstrate that TDP-43 is necessary for dynamic SG assembly in cell types relevant to ALS/FTD.

TDP-43 is required for stress granule formation under osmotic stress

It is appreciated that SG composition can vary according to stress exposure^{9,19,24,25}, and thus SG dynamics could also be variable. To determine if the effect of TDP-43 depletion on SG dynamics with SA-induced oxidative stress is stress-dependent or is a cell-intrinsic property, we exposed primary cortical neurons and astrocytes to hyperosmotic stress, a well published stress paradigm that has also been previously published to direct TDP-43 into SGs¹⁹. We tested a range of concentrations (0.4-1M) of D-sorbitol and exposures for up to 3h. Surprisingly, SGs were not observed in cortical neurons exposed to up to 1M D-sorbitol (data not shown), while astrocytes robustly formed SGs in response to 0.8M sorbitol stress, consistent with a previous report¹⁹. Under these conditions, SGs were very small. Indeed, although the SGs were near the diffraction limit and thus not able to be reliably measured, we inferred that the observed cytoplasmic puncta were SGs based on comparison to unstressed siControl astrocytes, which displayed a relatively disperse (*i.e.*

non-granular) cytoplasmic mRNA pattern (**Fig. 5A**). Despite the inability to reliably measure individual SGs, analysis of the number of cells presenting with SGs revealed that the kinetics of SG assembly are severely impaired in astrocytes depleted of TDP-43. Specifically, only ~20% of astrocytes successfully formed SGs by 30 min compared to ~90% in siControl-treated cells, a phenomenon that persisted for the entire 180 min exposure (**Fig. 5B**). However, if cells were permitted to recover in normal growth media, individual SGs were larger, thus permitting an assessment of SG size and number. Specifically, at 30 min post D-sorbitol exposure, TDP-43 depleted astrocytes (**Fig. 5C, D blue bars**) had smaller and fewer SGs compared to siControl treated astrocytes (**Fig. 5C, D black bars**). These data establish the existence of cell type-specific responses to stress and further show that TDP-43 has variable relevance to SG dynamics in response to different stress conditions.

Increased Aquaporin 4 levels in TDP-43 depleted astrocytes

Given the dramatic impact of TDP-43 on the SG response to osmotic imbalance, which is regulated by several different channel proteins, we investigated further. Aquaporins are a family of 13 bidirectional molecular water channels²⁶ that are driven by osmotic gradients, of which two are mainly expressed in the CNS^{27,28}. Of these, Aquaporin 4 (AQP4) is primarily expressed by astrocytes²⁹⁻³¹ and has a prominent role in brain homeostasis and neuronal survival. AQP4 expression is elevated in select brain regions of patients affected with neurodegenerative diseases such as prion disease³², multiple sclerosis²⁷ and ALS²⁶, as well as in rodent models of mutant SOD1-mediated ALS³³. In this study, by immunoblot, we found that AQP4 protein levels were increased 2-fold in TDP-43-depleted astrocytes compared to control siRNA-treated astrocytes and was absent from MEFs, as expected (**Fig. 6A**). A similar TDP-43-dependent elevation in AQP4 expression was also observed by immunofluorescence labelling; however, we noted that AQP4 was dispersed

throughout the cytoplasm rather than at the end feet/processes, as observed in siControl cells (**Fig. 6B**, *arrowhead*). In attempt to determine if this increased expression results in more AQP4 channels at the plasma membrane, where it needs to be inserted to regulate osmotic balance, we performed surface labelling for AQP4 using non-permeabilized cells coupled with flow cytometric detection. Surprisingly, only 50% of TDP-43-depleted astrocytes had surface labelling for AQP4 relative to siControl astrocytes (**Fig. 6C**). In addition, in those siTDP-43 cells that were labelled, fluorescence intensity was reduced compared to control siRNA-treated astrocytes (**Fig. 6D**). Taken together, these data, verified with a second independent TDP-43 siRNA (**Suppl. Fig. 5**), indicate that although total levels of AQP4 are elevated, it is not functional due to its absence at the cell surface.

Aged neurons have compromised SG assembly

As ALS and FTD are age-related diseases and SGs are considered to be a central component of disease pathogenesis, we investigated the impact of ‘aging’ of cortical and motor neurons on SG dynamics by prolonged culture, as a means to model aging *in vitro*^{5,34}. To ensure that viability was maintained in these conditions, neurons were cultured in serum-free medium supplemented with B27, as described previously³⁴. Motor neurons cultured according to this established protocol demonstrated robust axonal branches, the absence of obvious axonal swellings and/or retractions, and were morphologically indistinguishable between 28DIV (when these cultures are typically used for analysis) and 56DIV (**Fig. 7A**). In 28DIV motor neurons exposed to SA, there was a significant decrease in SG number and increased individual SG size between 60 and 120 min (**Fig. 7B, C**, *black bars*), consistent with what we observed in 28DIV siControl-injected motor neurons (**Fig. 4B, C**, *black bars*) indicating effective SG coalescence. However, in aged motor neurons (56DIV), SG coalescence did not proceed; size and number were unchanged over time (**Fig. 7B, C**, *green bars*). The same defect in coalescence was observed in cortical neurons cultured for 21DIV (an established

in vitro aging paradigm for these neurons³⁴) while SG assembly proceeded as expected in 7DIV cultures (**Fig. 7D, E**). Interestingly, TDP-43 levels were reduced by 32% in aged cortical neurons compared to 7DIV cortical neurons (**Fig. 7F**). Thus, these data suggest that aging (at least *in vitro*) compromises normal SG dynamics and may be linked to TDP-43 levels.

DISCUSSION

Environmental stress is considered to play a role in the phenotype of several neurodegenerative diseases, and SGs are a first line mechanism for survival following stress exposure. While much has been done in transformed cells, the molecular events in the cell types implicated in these diseases are not well documented. We used a stress model of primary motor and cortical neurons, as well as astrocytes, to study SG dynamics in primary cells relevant to ALS/FTD neurodegeneration.

We report differences in the morphology and kinetics of SGs formed in different cell types. Small SGs form quickly after arsenite stress and then rapidly disassemble in MEFs. In contrast, SGs formed in the majority of astrocytes within 30 min of arsenite treatment, followed by a plateau and subsequent decline at 150 min, indicative of SG disassembly similar to what we previously showed in SK-N-SH and HeLa cells¹¹. Cortical neurons responded slowly to arsenite stress, with the majority of neurons displaying SGs only after 60 min of exposure. SG disassembly was noted after 300 min; this timeline of SG kinetics was twice as long in these neurons compared to astrocytes. While SG formation has been previously reported in primary neurons and glial cells^{19,35}, this is the first study to detail the differences in SG assembly and disassembly kinetics in cell types relevant to neurodegenerative disease, namely neurons and astrocytes. Inclusions containing TDP-43 are characteristic of most cases of ALS and about half of all FTD cases. It has been proposed that SGs may serve to “seed” these inclusions³⁶. One could speculate that the prolonged time required for SG assembly and disassembly may be relevant in this context and possibly contribute to neuronal vulnerability in these diseases. Indeed, persistent SGs due to delayed or failed disassembly have been reported where mutant forms of TDP-43 or other ALS-related genes have been transiently overexpressed in transformed cells^{19,37}. In addition, SG disassembly is reportedly mediated by autophagy or chaperone-mediated protein degradation³⁸⁻⁴², mechanisms which have

been previously reported to become less efficient as neurons age^{43,44}. That the kinetics of SG disassembly are protracted in neurons, coupled to the natural decline of these mechanisms intended to help dissipate SGs, may be highly relevant to the generation of the large cytoplasmic inclusions that characterize ALS/FTD, and are rich in RNA binding proteins beyond just TDP-43.

Secondly, we demonstrate the importance of TDP-43 in SG assembly and disassembly in neurons and astrocytes. Specifically, reducing the levels of TDP-43 resulted in an acceleration of SG disassembly in astrocytes and cortical neurons. We attribute the more modest effect in cortical neurons to a less efficient depletion of TDP-43 levels. Interestingly, SG coalescence was impaired by TDP-43 depletion in all cell types examined and reaffirms the important role of TDP-43 in regulating this essential cell stress response mechanism previously documented in transformed cells¹¹. We have previously shown that SG coalescence is relevant to SG interactions with processing bodies and the protection of polyadenylated mRNA following stress exposure⁴⁵. Thus, we speculate that reduced nuclear TDP-43 levels would have negative consequences on these aspects of RNA granule homeostasis in neurons and astrocytes as well. This could, in turn, impact RNA homeostasis in general, possibly leading to a complex dysregulation of both transcript levels/stability and miRNA processing.

In primary astrocytes, we discovered that TDP-43 is critically required for proper SG formation in hyperosmotic conditions. Specifically, following assembly, the SGs formed in TDP-43 depleted cells are smaller compared to control siRNA-treated astrocytes. We postulated that the glial-relevant water channel AQP4 may be impacted by TDP-43. Indeed, we observed that AQP4 was less efficiently integrated into the plasma membrane despite a robust TDP-43-dependent up-regulation. AQP4 has been previously reported to be up-regulated in mouse models expressing mutant SOD1^{33,46} as well as in patients²⁷, and a loss of polarity of the protein has been reported⁴⁶. TDP-43-mediated regulation of AQP4 expression and trafficking has not previously been reported

and may represent a novel mechanism for further exploration given that astrocytes are known to play a contributing role to neurodegeneration^{47,48}.

Finally, we explored the impact of aging on SG formation in response to stress by subjecting neurons to long-term culture conditions, an established *in vitro* model of aging. Our data indicate that although aged motor and cortical neurons form SGs in response to oxidative stress, they do not coalesce as expected. With the important caveat that aging cultures *in vitro* is not equivalent to *in vivo* aging, our findings suggest the possibility of a disturbance of RNA granule dynamics during normal aging. In addition, an unexpected observation was that TDP-43 protein levels were diminished in the aged cultures. Aging has long been considered as a risk factor for ALS and FTD²⁰. Indeed, current models propose that these diseases arise due to “two-hits”, genetic susceptibility and a second trigger such as external stress or aging. Although we appreciate that these results are *in vitro*, it is tempting to speculate that aging could be a modifier of SG dynamics and thus may have relevance to the initiation and/or progression of age-related neurodegenerative diseases. Taken together, our data suggest that the cell and stress specificity in SGs dynamics and the impact of aging may be contributing factors to neuronal vulnerability in ALS and FTD cases with TDP-43 inclusions. A better understanding of the molecular mechanisms surrounding this stress response in a cell specific manner will be essential for future ALS/FTD therapeutic strategies aimed at modulating stress granule dynamics.

MATERIAL AND METHODS

Preparation and transfection of mouse primary cells

The use of animals and all procedures were performed according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the CRCHUM Institutional Committee for the Protection of Animals, and MNI/McGill / Animal Care Committee. Primary cultures of dissociated spinal cord along with dorsal root ganglia (DRG) were prepared as described⁴⁹, from embryonic day 13 (E13) CD1 mouse embryos (Charles River Laboratories, St. Constant, QC, Canada). After dissociation in trypsin, cells were plated at a density of ~450,000 per well in 12-well dishes (Greiner Bio-One) containing round glass 18-mm coverslips (Thermo Fisher Canada) coated with poly-D-lysine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) plus Matrigel basement membrane matrix (Corning, Corning, NY, USA). Cultures were maintained in minimum essential medium enriched with 5 mg/ml glucose and supplemented with 1.3% horse serum (Invitrogen), 10 µg/ml bovine serum albumin, 26 ng/ml selenium, 20 µg/ml triiodothyronine, 10 µg/ml insulin, 32 µg/ml putrescine, 9.1 ng/ml hydrocortisone, 13 ng/ml progesterone (Sigma-Aldrich), 200 µg/ml apo-transferrin (US Biological), and 10 ng/ml nerve growth factor (UBI Life Sciences). On days 4-6, cultures were treated with 1.4 µg/ml cytosine-β-D-arabinoside (Calbiochem, San Diego, CA, USA) to minimize growth of non-neuronal cells. The cultures were maintained at 37°C in 5% CO₂. Cultures were used at 21 or 56 days post-playing, as indicated in figure legends. At this age *in vitro*, motor neurons are distinguishable from other neuronal types and glia in the culture because they develop and differentiate to resemble their counterparts in the intact spinal cord, both morphologically and by expression of biological markers. They have large cell bodies (>20 µm in diameter) and dendritic trees, and express choline acetyltransferase, glutamate receptors, neurofilament proteins⁵⁰⁻⁵².

Primary cortical neurons were prepared from E18.5 C57BL/6 mouse embryos (Charles River Laboratories, Kingston, NY, USA), as previously published⁵³. Briefly, cerebral cortices were trypsinized (0.025%, 37°C, 20 min), and then treated with trypsin inhibitor (0.52 mg/ml, Sigma T9003) and DNase (1.7 KU, Sigma D5025). Neurons were dissociated by trituration with a Pasteur pipette. Cells were then plated on glass coverslips coated with polylysine and laminin (Sigma Aldrich) and maintained in Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 0.0025% Glutamax (Invitrogen) and 0.02% B27 (Invitrogen). Cultures were used five days after plating, or as indicated in figure legend.

Primary astrocytes were cultured from C57BL/6 pups (P0-P3) bred in house from stock obtained from Charles River Laboratories (Kingston, NY, USA). Cortices were dissociated with 18G and 21G needles and cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen), supplemented with 10% FBS, 1% glutamine and 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma) on poly-L-ornithine (Sigma) coated plates and coverslips. Cells were used at confluence (~14 DIV).

Primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were prepared from E12.5 C57BL/6 embryos (Charles River Laboratories Kingston, NY, USA). Briefly, the entire body except the liver was treated with trypsin (0.025%, 37°C, 30 mins). The reaction was stopped with 10% FBS supplemented high Glucose DMEM and the cells were dissociated mechanically and plated in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 1% glutamine and 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma).

Astrocytes and MEFs were transfected at 60–70% confluence with 40 pmol of custom siRNAs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions and collected after 72 h. siRNA sequences used were: mouse TDP-43 #1, 5'-AAGCAAAGCCCAGACGAGCCUUGA-3'; mouse TDP-43 #2 (MSS214149, Thermo Fisher

Scientific): 5'-GCAAUCUGGUAUAUGUUGUCAACUA-3'; and the negative control low GC siRNA (#12935-200; Invitrogen). Cortical neurons were transfected at 7 DIV for 5 days with 5 pmol (per 18mm coverslip) of mouse siTDP-43.

Microinjection of mouse primary motor neurons

Motor neurons in mature spinal cord cultures do not transfect; thus, plasmids are expressed by intranuclear microinjection. The protocol was performed as previously published⁵⁰. Specifically, cultures were bathed in EMEM without sodium bicarbonate, titrated to pH 7.2. Solutions of Tris-EDTA (5 mM Tris and 0.5 mM EDTA), pH 7.2, containing 125 pmol of siRNA (negative control low GC and mouse TDP-43) plus 70 kDa dextran (25 mg/ml; Molecular Probes Inc., Eugene, OR) were clarified by centrifugation at 11,000xg for 15 min and microinjected into neuronal nuclei using glass microcapillaries (World Precision Instruments) coupled with a microinjector (composed of InjectMan NI 2 and FemtoJet; Eppendorf). After completion of the injection, cultures were returned to the incubator in culture medium plus 0.75% gentamicin (Gibco, Burlington ON).

Induction of stress granules

To induce SGs, cells were treated with 0.5 mM SA (Sigma-Aldrich) for the indicated times at 37°C. Recovery was initiated by changing the media. For osmotic stress, astrocytes were treated with 0.8M-1M D-Sorbitol (Sigma) for indicated times. Cover slips were collected and fixed with 1% paraformaldehyde (PFA) at 30, 60, 120, and 180 min after the start of the stress.

Fluorescence in situ hybridization and immunofluorescence

Cells grown on coverslips were fixed in 1% PFA in PBS and then permeabilized with 0.1%

Triton X-100 in 2X saline sodium citrate (SSC) for 15 mins, then washed with 1 M Tris, pH 8 for 5 mins. Coverslips were blocked with 0.0005% BSA, 10 mg/ml yeast RNA diluted in 2X SSC, washed with 1 M Tris, pH 8 for 5 mins, and incubated with hybridization buffer (1.3 ng FITC or Cy3 labelled oligo(dT) probe, 0.005% BSA, 1 mg/ml yeast RNA, 10% dextran sulfate, and 25% formamide, diluted in 2X SSC) for 1 h in a humid chamber. Coverslips were subsequently washed twice with 4X SSC for 5 min and once with 2X SSC for 5 mins. Coverslips were incubated for 1 h with primary antibody: rabbit TDP-43 (1/200, Proteintech 10782-2-AP), and when indicated with SMI32R (1/2000, Covance 801701), GFAP (1/20000, Abcam ab4674; or mouse anti-GFAP conjugated with Cy3, Sigma C9205), HuR (1/200, Millipore 07-468), CAPRIN1 (1/200, Proteintech 15112-1-AP). After washing twice with 4X SSC for 5 min and once with 2X SSC for 5 min, labelling was visualized with fluorescently conjugated secondary antibodies against the desired species (Jackson ImmunoResearch). Coverslips were washed twice with 4X SSC, once with 2X SSC, and then mounted with ProLong Antifade reagent (Invitrogen). Images were collected using 40X (1.25 NA) and 63X oil (1.7 NA) objective lenses on a confocal microscope (SP5; Leica) equipped with LAS AF software (Leica) for acquisition. Total cellular fluorescence intensity of the oligo(dT) probe and TDP-43 was determined using Photoshop CS4 (Adobe). Discrimination of TDP-43 levels was based on measurements of TDP-43 pixel intensity in controls/at baseline in the accompanying experiment. Importantly, all images were acquired with the same settings.

Quantification of SGs number and size

SGs parameters were quantified using ImageJ, as previously published^{10,11}. Briefly, to assess SG kinetics at different time points, SGs were identified by oligo(dT), and cells were scored as positive when they had at least two foci. A minimum of 100 cells were counted per time point,

per condition and per experiment. For SG number and size, we used automatic recognition by ImageJ (function: Analyse particles) using the following parameters: all SGs ranging from 0.2 to 15 μm^2 in 10 randomly selected cells per condition in each experiment.

Western Blot

As we previously published¹¹, cells were collected by scraping in ice-cold PBS. Lysis was performed with RIPA buffer (150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, and protease inhibitors), incubated 10 min on ice, 10 min at room temperature then centrifuged 10 min at 13500g. The collected supernatants were quantified with the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). 20 μg of lysates were loaded for standard SDS-PAGE. The antibodies used were: rabbit anti-TDP-43 (1:10 000; 10782-2-AP Proteintech, Chicago, IL, USA), rabbit anti-AQP4 (1:2000; 16473-1-AP Proteintech), and mouse anti-Actin (1:200 000; 69100 MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) as a loading control. Blots were visualized with peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL Western Blotting Substrate (Pierce, Waltham, MA, USA). Images were acquired using a range of acquisition times using the BIO-RAD ChemiDoc MP imaging system, and then exported as tifs via the Image Lab application without any manipulation. Chosen images were those just below overexposure (easily seen by the red pixels on the image). Densitometry was then performed with Adobe PhotoShop. No post-acquisition modifications were made.

Flow Cytometry

Extracellular staining of AQP4 was performed as previously described⁵⁴. Briefly, cells were detached and labelled for surface AQP4 with primary antibody (Proteintech 16473-1-AP) and secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). Note, the recognized epitope is resistant to trypsin

digestion. Non-specific background staining was assessed using an appropriate fluorochrome-matched secondary antibody. Cells were processed the same day for analysis on a BD LSR II flow cytometer and data was analyzed using FACSDiva (BD Bioscience).

Statistics

Data were compared via two-tailed Student *t* test as indicated in the figure legends, with statistical significance established at $p < 0.05$.

Acknowledgements

We thank the CRCHUM Cytometry, Cell Imaging and Molecular Pathology platform for access to flow cytometry. This work was supported by the ALS Society of Canada (CVV and HDD) and the ALS Canada/Brain Canada Hudson Translational Team Grant (CVV). CVV is a CIHR New Investigator.

Author contributions

YK helped in the project design, analyzed and assembled the data, and wrote the manuscript with CVV. RK and HD prepared and planned motor neuron cultures, respectively. CG and AP performed and planned flow cytometry acquisition and data analysis, respectively. CVV designed and directed the project. All authors reviewed and approved the manuscript prior to submission.

Conflict of interest: The authors have no conflict of interests to declare.

REFERENCES

1. 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**, 3584–96 (1995).
2. Buratti, E. & Baralle, F. E. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front. Biosci.* **13**, 867–78 (2008).
3. Bose, J. K., Wang, I.-F., Hung, L., Tarn, W.-Y. & Shen, C.-K. J. TDP-43 Overexpression Enhances Exon 7 Inclusion during the Survival of Motor Neuron Pre-mRNA Splicing. *J. Biol. Chem.* **283**, 28852–28859 (2008).
4. Ayala, Y. M. *et al.* Human, Drosophila, and C.elegans TDP43: nucleic acid binding properties and splicing regulatory function. *J. Mol. Biol.* **348**, 575–88 (2005).
5. Alami, N. H. *et al.* Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron* **81**, 536–43 (2014).
6. Wang, I.-F., Wu, L.-S. & Shen, C.-K. J. TDP-43: an emerging new player in neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* **14**, 479–85 (2008).
7. Colombrita, C. *et al.* TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J. Neurochem.* **111**, 1051–1061 (2009).
8. Anderson, P. & Kedersha, N. 壽Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* **7**, 213–221 (2002).
9. Anderson, P. & Kedersha, N. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 141–150 (2008).
10. McDonald, K. K. *et al.* TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1400–1410 (2011).

11. Aulas, A. s, Stabile, S. phanie & Velde, C. Vande. Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP. *Mol. Neurodegener.* **7**, 1 (2012).
12. Neumann, M. *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (80-.).* **314**, 130–133 (2006).
13. 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**, 602–11 (2006).
14. Yamanaka, K. *et al.* Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* **11**, 251–3 (2008).
15. Boillée, S., Vande Velde, C. & Cleveland, D. W. ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron* **52**, 39–59 (2006).
16. Zhang, H. *et al.* TDP-43-immunoreactive neuronal and glial inclusions in the neostriatum in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. *Acta Neuropathol.* **115**, 115–122 (2007).
17. Lagier-Tourenne, C. & Cleveland, D. W. Rethinking ALS: The FUS about TDP-43. *Cell* **136**, 1001–1004 (2009).
18. Guil, S., Long, J. C. & Cáceres, J. F. hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5744–58 (2006).
19. Dewey, C. M. *et al.* TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1098–108 (2011).
20. Geser, F., Martinez-Lage, M., Kwong, L. K., Lee, V. M.-Y. & Trojanowski, J. Q. Amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia and beyond: the TDP-43 diseases. *J. Neurol.* **256**, 1205–14 (2009).
21. Aulas, A. & Vande Velde, C. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and

- FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 423 (2015).
22. Gallouzi, I. E. *et al.* HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3073–8 (2000).
 23. Solomon, S. *et al.* Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha, entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 2324–42 (2007).
 24. Anderson, P. & Kedersha, N. Stress granules. *Curr. Biol.* **19**, 397–398 (2009).
 25. Aulas, A., Fay, M. M., Lyons, S. M., Achorn, C. A. & Kedersha, N. Stress-specific differences in assembly and composition of stress granules and related foci. 927–937 (2017). doi:10.1242/jcs.199240
 26. Badaut, J., Fukuda, A. M., Jullienne, A. & Petry, K. G. Aquaporin and brain diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 1554–65 (2014).
 27. Satoh, J. I., Tabunoki, H., Yamamura, T., Arima, K. & Konno, H. Human astrocytes express aquaporin-1 and aquaporin-4 in vitro and in vivo. *Neuropathology* **27**, 245–256 (2007).
 28. Jung, J. S. *et al.* Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 13052–6 (1994).
 29. Nagelhus, E. A., Mathiisen, T. M. & Ottersen, O. P. Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* **129**, 905–913 (2004).
 30. Oshio, K. *et al.* Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord. *Neuroscience* **127**, 685–693 (2004).

31. Costa, C. *et al.* Mapping of aggrecan, hyaluronic acid, heparan sulphate proteoglycans and aquaporin 4 in the central nervous system of the mouse. *J. Chem. Neuroanat.* **33**, 111–123 (2007).
32. Rodríguez, A. *et al.* Increased expression of water channel aquaporin 1 and aquaporin 4 in Creutzfeldt-Jakob disease and in bovine spongiform encephalopathy-infected bovine-PrP transgenic mice. *Acta Neuropathol.* **112**, 573–585 (2006).
33. Nicaise, C. *et al.* Aquaporin-4 Overexpression in Rat ALS Model. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* **292**, 207–213 (2009).
34. Lesuisse, C. & Martin, L. J. Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *J. Neurobiol.* **51**, 9–23 (2002).
35. Tsai, N. P., Tsui, Y. C. & Wei, L. N. Dynein motor contributes to stress granule dynamics in primary neurons. *Neuroscience* **159**, 647–656 (2009).
36. Li, Y. R., King, O. D., Shorter, J. & Gitler, A. D. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J. Cell Biol.* **201**, 361–372 (2013).
37. Bosco, D. A. *et al.* Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4160–75 (2010).
38. Ganassi, M. *et al.* A Surveillance Function of the HSPB8-BAG3-HSP70 Chaperone Complex Ensures Stress Granule Integrity and Dynamism. *Mol. Cell* **63**, 796–810 (2016).
39. Krisenko, M. O. *et al.* Syk Is Recruited to Stress Granules and Promotes Their Clearance through Autophagy. *J. Biol. Chem.* **290**, 27803–15 (2015).
40. Ryu, H.-H. *et al.* Autophagy regulates amyotrophic lateral sclerosis-linked fused in sarcoma-positive stress granules in neurons. *Neurobiol. Aging* **35**, 2822–2831 (2014).
41. Matus, S., Bosco, D. A. & Hetz, C. Autophagy meets fused in sarcoma-positive stress granules. *Neurobiol. Aging* **35**, 2832–2835 (2014).

42. Monahan, Z., Shewmaker, F. & Pandey, U. B. Stress granules at the intersection of autophagy and ALS. *Brain Res.* **1649**, 189–200 (2016).
43. Calderwood, S. K., Murshid, A. & Prince, T. The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology* **55**, 550–8 (2009).
44. Nixon, R. A. & Yang, D.-S. Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
45. Aulas, A. *et al.* G3BP1 promotes stress-induced RNA granule interactions to preserve polyadenylated mRNA. *J. Cell Biol.* **209**, 73–84 (2015).
46. Dai, J. *et al.* Alterations in *AQP4* expression and polarization in the course of motor neuron degeneration in *SOD1G93A* mice. *Molecular Medicine Reports* **16**, (D.A. Spandidos, 2017).
47. Estes, P. S. *et al.* Motor neurons and glia exhibit specific individualized responses to TDP-43 expression in a *Drosophila* model of amyotrophic lateral sclerosis. *Dis. Model. Mech.* **6**, 721–33 (2013).
48. Di Giorgio, F. P., Carrasco, M. A., Siao, M. C., Maniatis, T. & Eggan, K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat. Neurosci.* **10**, 608–14 (2007).
49. Roy, J., Minotti, S., Dong, L., Figlewicz, D. A. & Durham, H. D. Glutamate potentiates the toxicity of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in motor neurons by postsynaptic calcium-dependent mechanisms. *J. Neurosci.* **18**, 9673–84 (1998).
50. Durham, H. D., Roy, J., Dong, L. & Figlewicz, D. A. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**, 523–30 (1997).

51. Gingras, M., Gagnon, V., Minotti, S., Durham, H. D. & Berthod, F. Optimized protocols for isolation of primary motor neurons, astrocytes and microglia from embryonic mouse spinal cord. *J. Neurosci. Methods* **163**, 111–118 (2007).
52. Durham, H. D. An Antibody against Hyperphosphorylated Neurofilament Proteins Collapses the Neurofilament Network in Motor Neurons but not in Dorsal Root Ganglion Cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **51**, 287–297 (1992).
53. Mohamed, N.-V., Plouffe, V., Rémillard-Labrosse, G., Planel, E. & Leclerc, N. Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons. *Sci. Rep.* **4**, 5715 (2014).
54. Larochelle, C. *et al.* Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain* **135**, 2906–2924 (2012).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Differences in SG morphology amongst cell types. Primary cultures of (A) motor neurons, (B) astrocytes, (C) cortical neurons and (D) mouse embryonic fibroblasts treated (or not) with 0.5 mM of sodium arsenite (+SA). Cytoplasmic SGs were co-labelled with an oligo(dT) probe, to track polyadenylated mRNA, and an antibody against HuR (a known SG marker, that can also serve as a nuclear marker by its presence in the nucleus). Note, motor and cortical neurons were treated for 60 min while astrocytes and fibroblasts were treated with 30 min. Scale bar, 10 μ m.

Figure 2. SG kinetics vary according to cell type and are modulated by TDP-43. (A, B) Primary astrocytes (n=3, average N=100 per time point), (C, D) mouse embryonic fibroblasts (MEF) (n=3, average N=100 per time point), and (E, F) cortical neurons (n=4, average N=70 per time point) were transfected with siRNA (siTDP-43 #1) and subjected to 0.5 mM SA. (A, C, E) TDP-43 expression levels expressed relative to control cultures, as determined by measurement of TDP-43 signal intensity. (B, D, F) Percentage of cells displaying SGs at different time points following SA exposure. Data of 3-4 independent experiments are expressed as the mean \pm SEM; Student *t* test **p* < 0.05.

Figure 3. TDP-43 is required for SG assembly in astrocytes. (A) Representative images of primary astrocytes transfected with TDP-43 siRNA (siTDP-43 #2) and exposed to SA with cytoplasmic SGs marked with an oligo(dT) probe. Scale bar, 10 μ m. (B) Number of SGs per cell and (C) size of individual SGs measured at the indicated time points post-SA exposure (n=3, N=10). Data is expressed as the mean \pm SEM; Student *t* test **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ns: not significant.

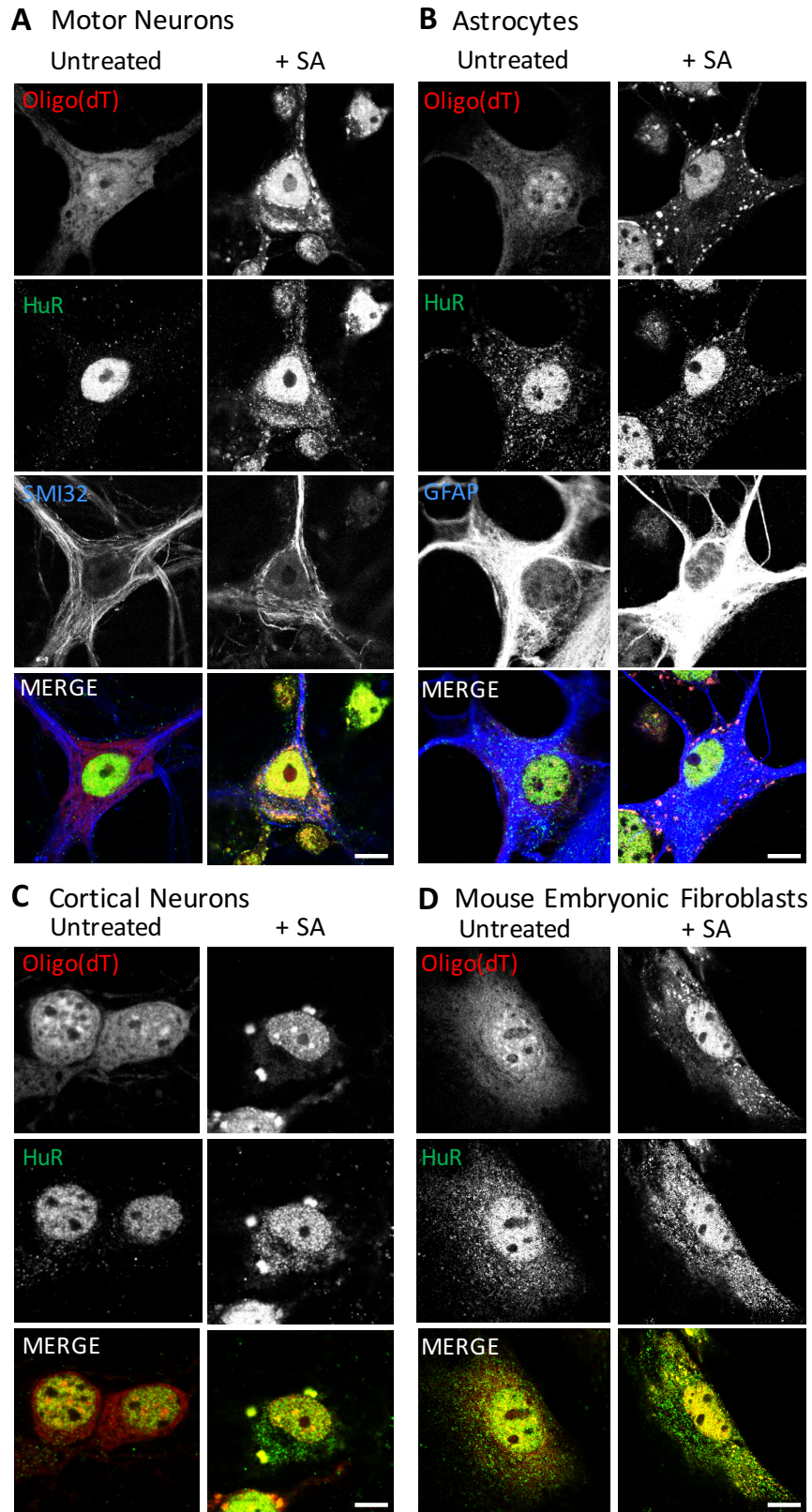
Figure 4. SG coalescence is mediated by TDP-43 in motor and cortical neurons. (A, D) Representative images of siRNA-microinjected motor neurons and siRNA transfected cortical neurons (both siTDP-43 #1) treated with SA and labelled for polyadenylated mRNA (oligo(dT)). Arrowheads shows SGs of interest. Scale bar, 10 μ m. Number of SGs per cell and individual SG size in (B, C) motor neurons (n=3, N=10) and (E, F) cortical neurons (n=4, N=10) measured at the indicated time points post-SA treatment. Data is expressed as the mean \pm SEM is shown; Student *t* test *p < 0.05, **p < 0,005, ns: not significant.

Figure 5. Astrocytes depleted of TDP-43 have abnormal SG kinetics and properties in response to hyperosmotic stress. (A) Representative images of siRNA transfected astrocytes (siTDP-43 #1) treated with 0.8M D-Sorbitol. NT: non treated cells; 60': 60 min of stress. Scale bar, 10 μ m. (B) Number of cells with SGs at different time points during continual exposure to 0.8M D-sorbitol (n=3). (C) Number of SGs per cell and (D) size of individual SGs, induced with 0.8M D-sorbitol for 60 min followed by 30 min of recovery (n=3). Data is expressed as the mean \pm SEM; Student *t* test *p < 0.05, **p < 0.005.

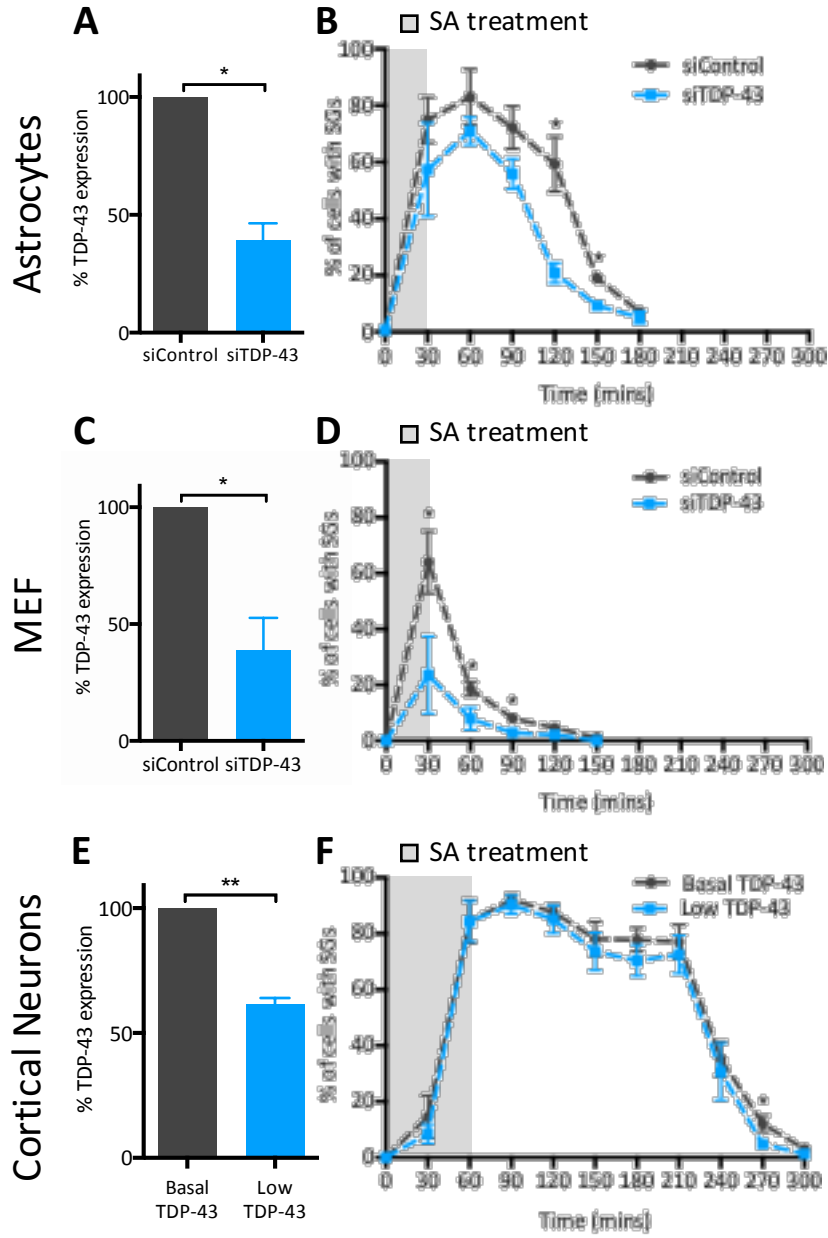
Figure 6. AQP4 is modulated by TDP-43. (A) Whole cell lysates of astrocytes and MEFs, treated with indicated siRNAs (siTDP-43 #1) were examined by immunoblotting for AQP4. Bands of interest were cropped from unmodified images, quantified via densitometry and normalized to Actin. (Uncropped blots are in Supplemental Material.) A representative experiment and quantification of 6 independent experiments are shown. (B) Immunofluorescence of siRNA-treated astrocytes showing localisation of AQP4 (green) on GFAP (red) positive cells. Arrowhead show astrocytes end feet. Scale bar, 10 μ m. (C) AQP4 surface labelling of siRNA-treated astrocytes as assessed by flow cytometry (n=4). (D) AQP4 median fluorescence intensity (Δ MFI over control secondary only) in astrocytes treated by siControl or siTDP-43 #1. Cells were analysed by flow

cytometry n=4. Student *t* test **p* < 0.05, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001.

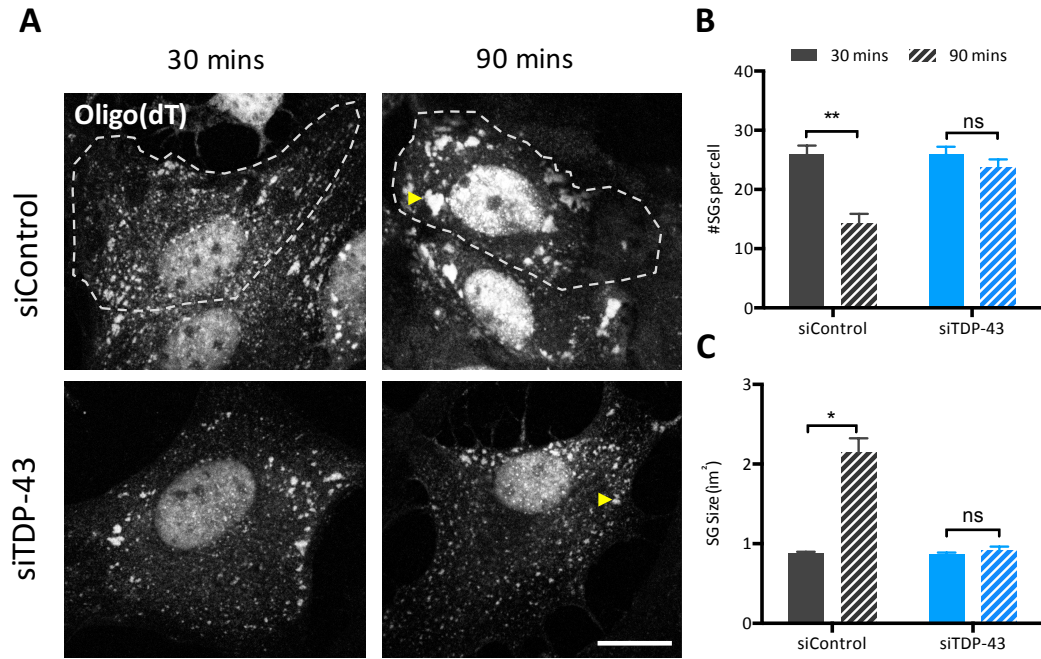
Figure 7. Aging negatively impacts SG assembly in neurons *in vitro*. (A) Representative micrographs of primary motor neurons aged in culture for 28 and 56 days and then subjected to 0.5mM SA. SGs are marked with oligo(dT) (red) and neuronal processes marked with phosphorylated neurofilaments (SMI32, blue). Scale bar, 10 μ m. Quantification of the number of SGs per cell and individual SG size in (B-C) motor neurons cultured for 28DIV and 56DIV (n=3) and (D, E) cortical neurons cultured for 7DIV and 21DIV (n=3). (B, D) Number of SGs per cell. (C, E) Size of individual SGs. Number and size were measured at two time points with ImageJ. (F) Whole cell lysates of cortical neurons at 7DIV and 21DIV immunoblotted for TDP-43. Bands of interest were cropped from unmodified images, quantified via densitometry and normalized to Actin. (Uncropped blots are in Supplemental Material.) A representative blot and the mean \pm SEM of densitometric quantification of three independent experiments are shown. Student *t* test **p* < 0.05.



Khalfallah et al, Figure 1

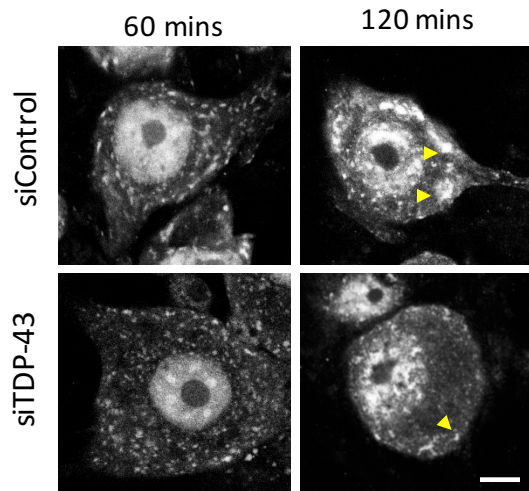


Khalfallah et al, Figure 2

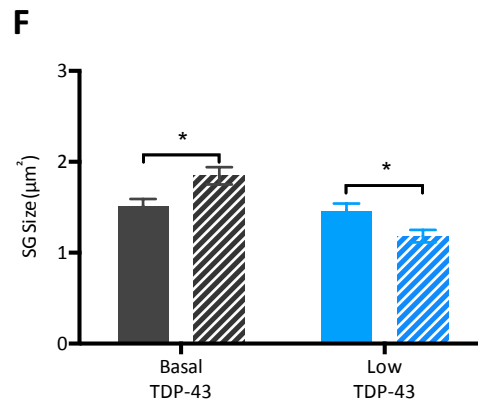
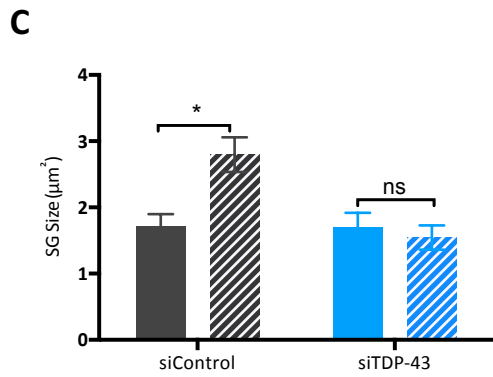
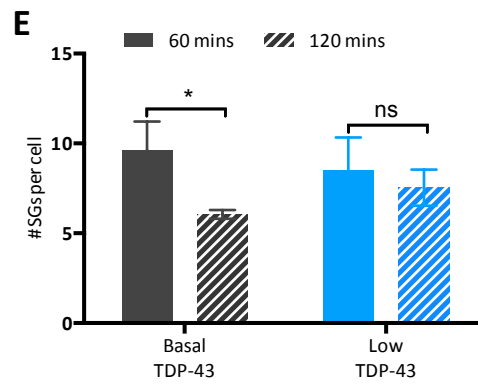
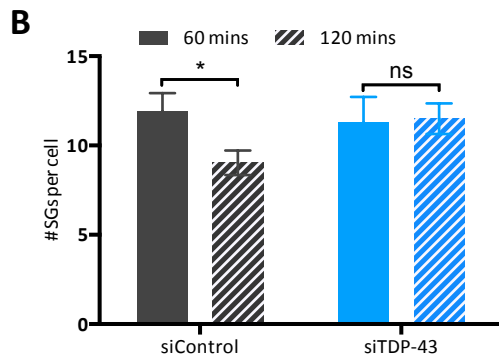
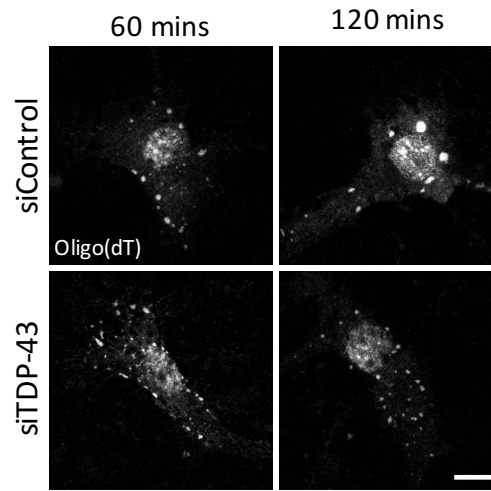


Khalfallah et al, Figure 3

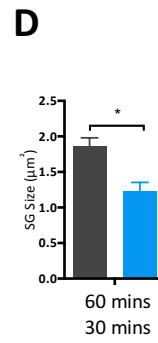
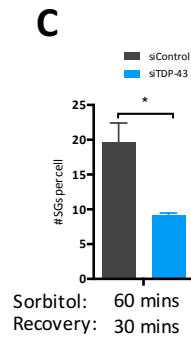
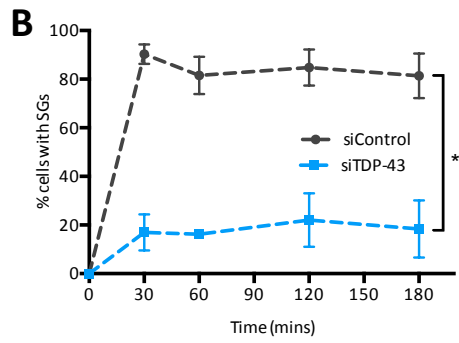
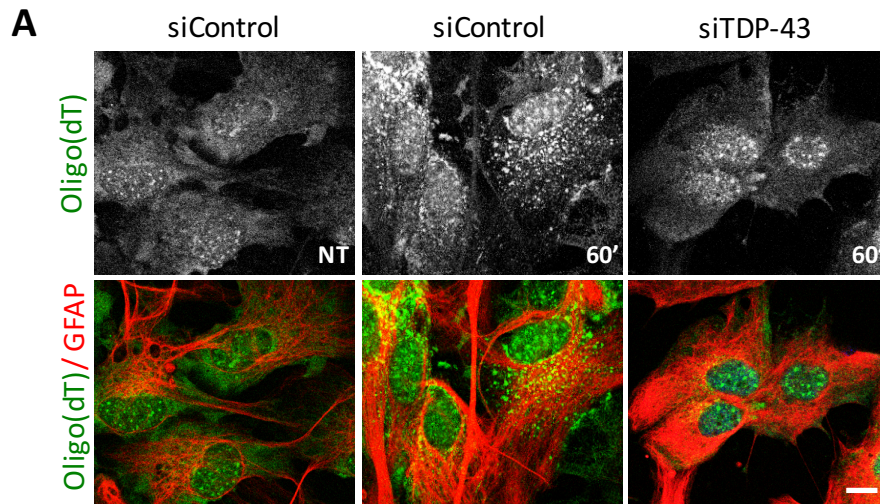
A Motor Neurons



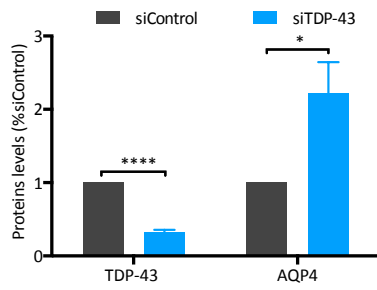
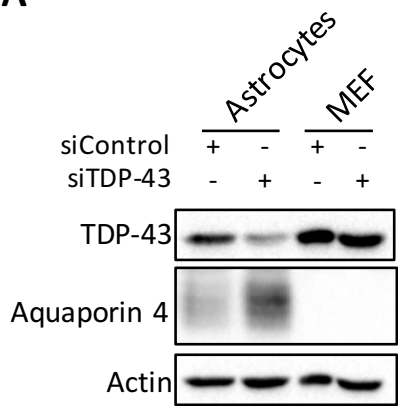
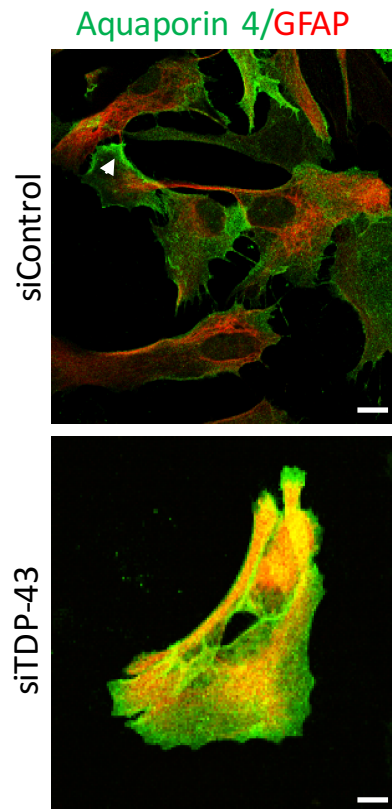
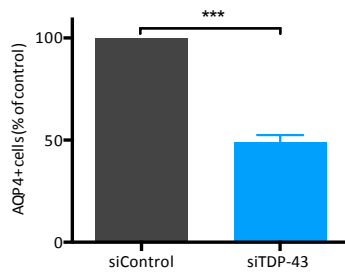
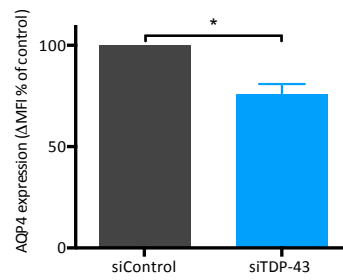
D Cortical Neurons



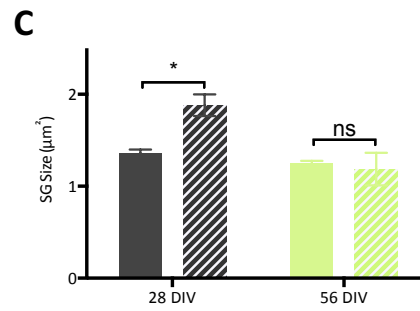
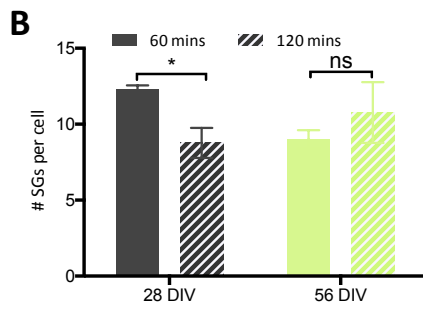
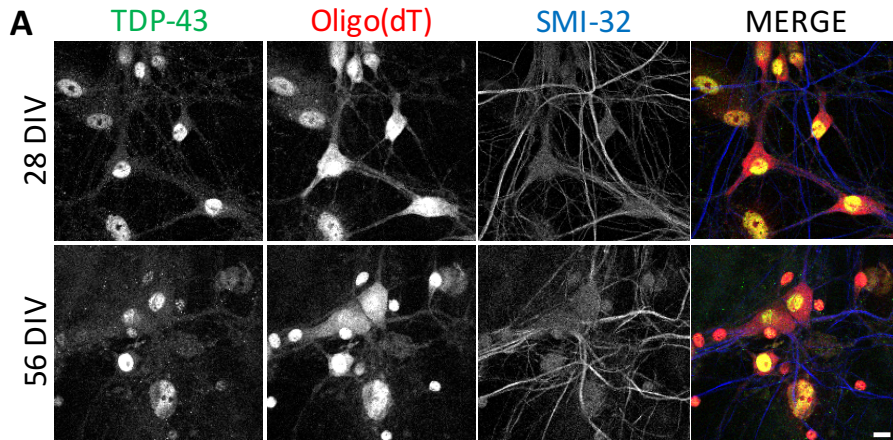
Khalfallah et al, Figure 4



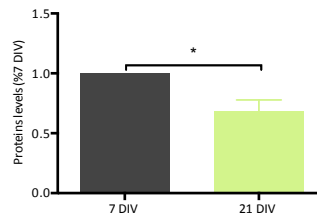
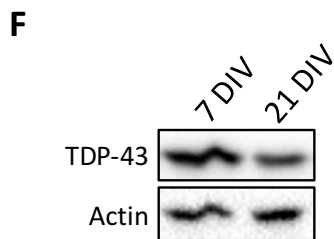
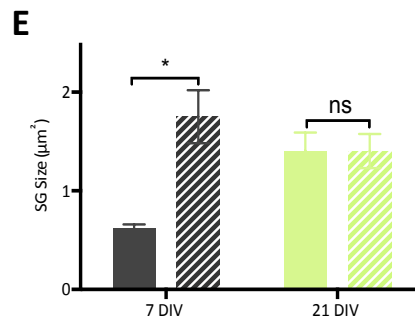
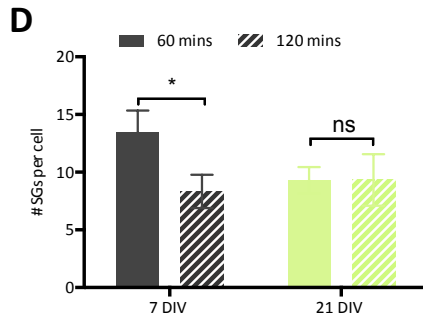
Khalfallah et al, Figure 5

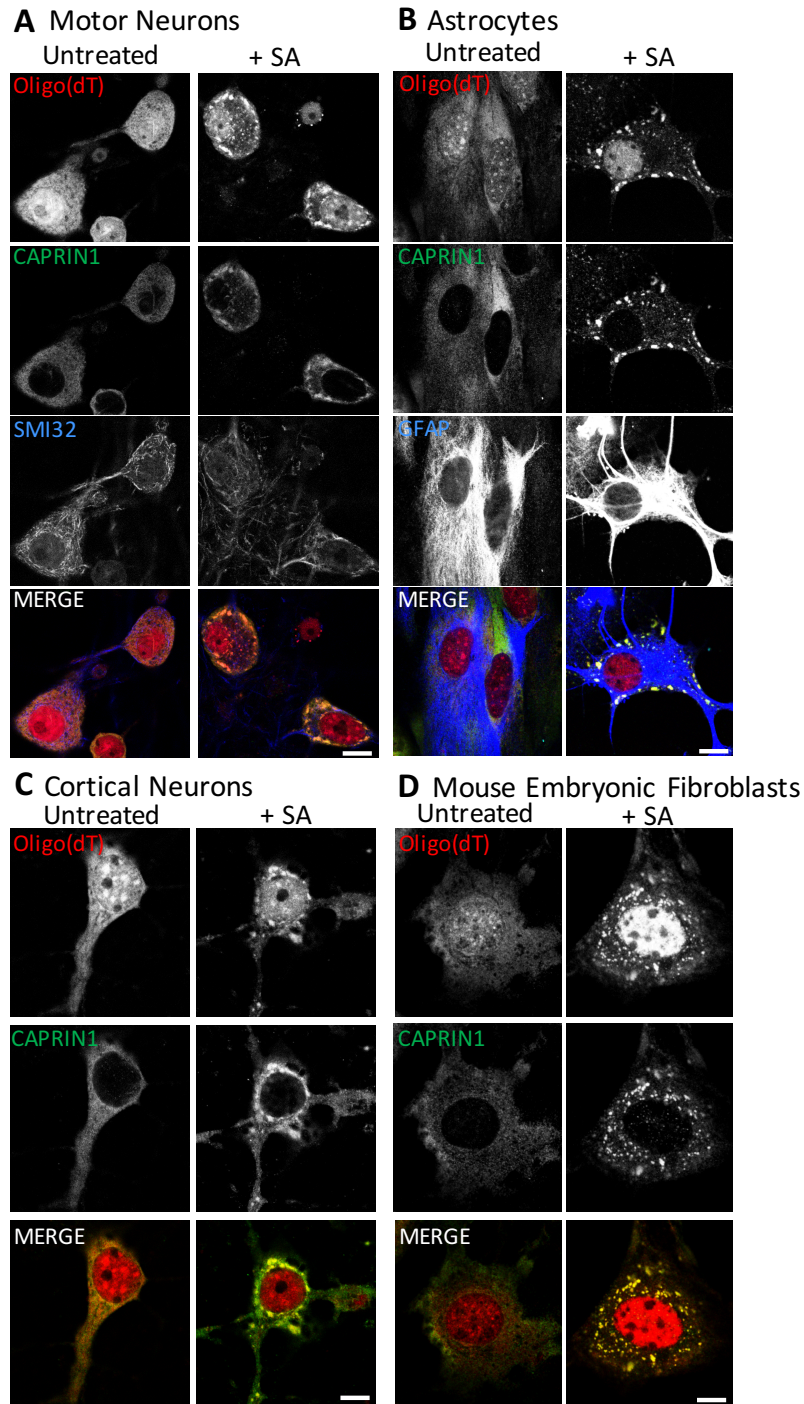
A**B****C****D**

Motor Neurons

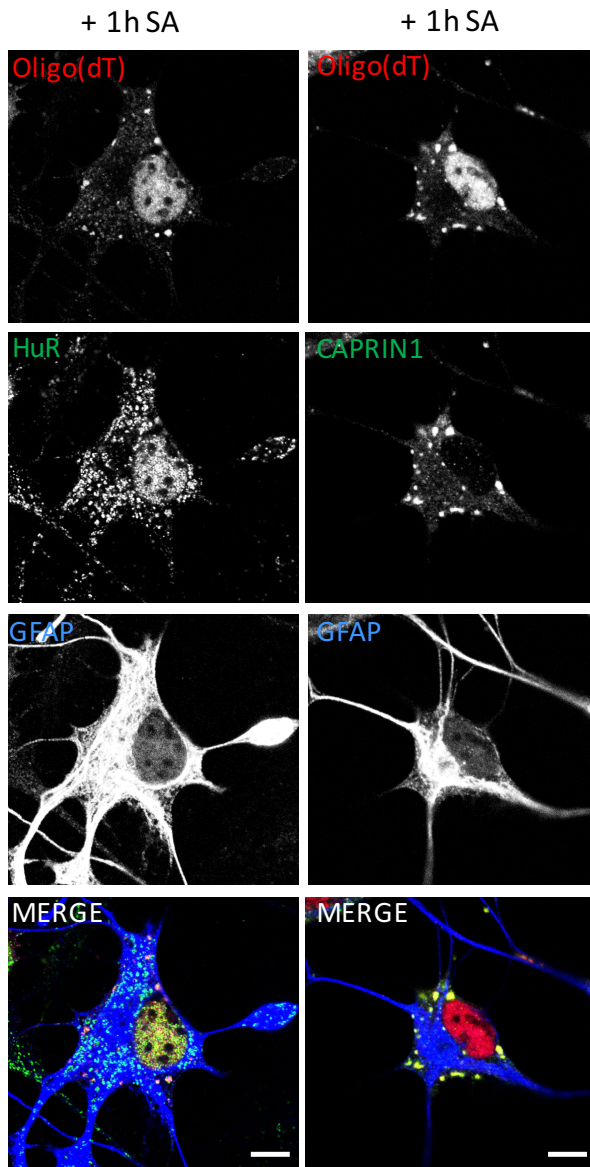
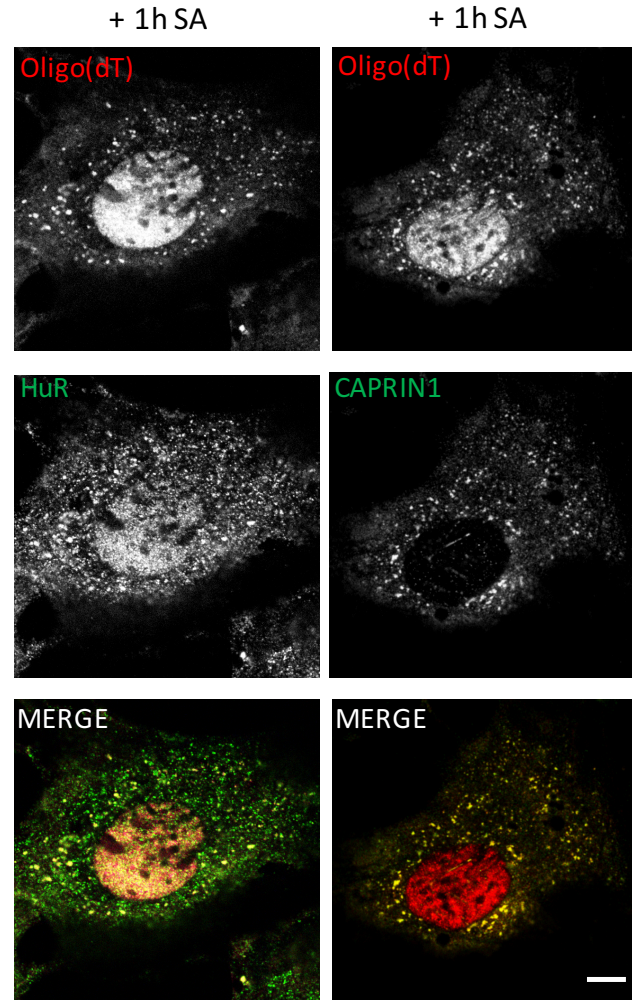


Cortical Neurons



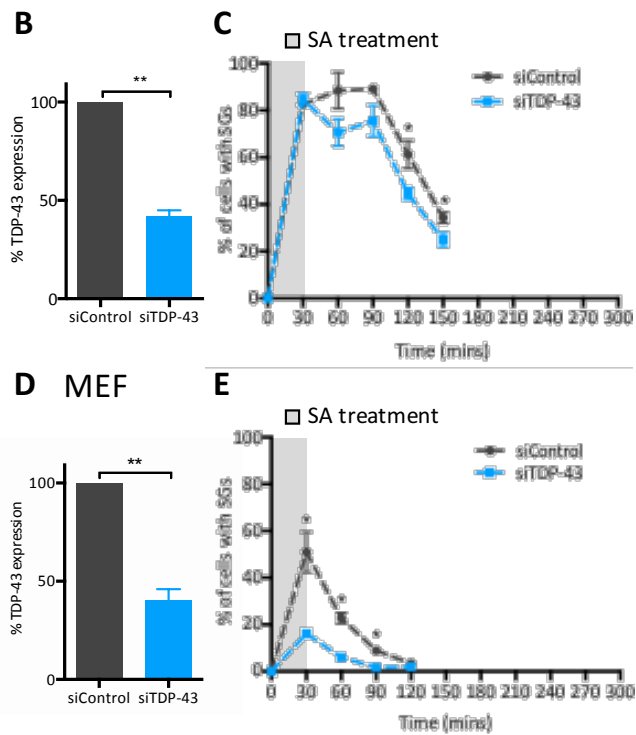
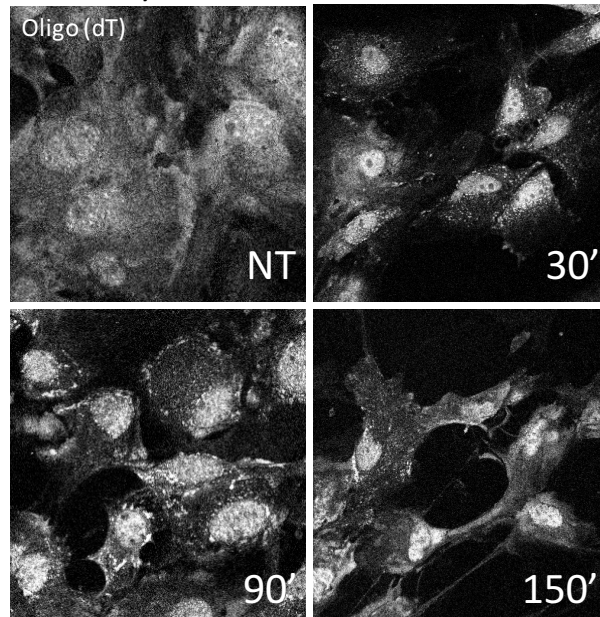


Supplementary figure 1. Differences in SG morphology amongst cell types. Primary cultures of (A) motor neurons, (B) astrocytes, (C) cortical neurons and (D) mouse embryonic fibroblasts treated (or not) with 0.5 mM of sodium arsenite (+SA). Cytoplasmic SGs were co-labelled with an oligo(dT) probe, to track polyadenylated mRNA, and an antibody against CAPRN1 (a known SG marker). Note, motor and cortical neurons were treated for 60 min while astrocytes and fibroblasts were treated with 30 min. Scale bar, 10 μ m.

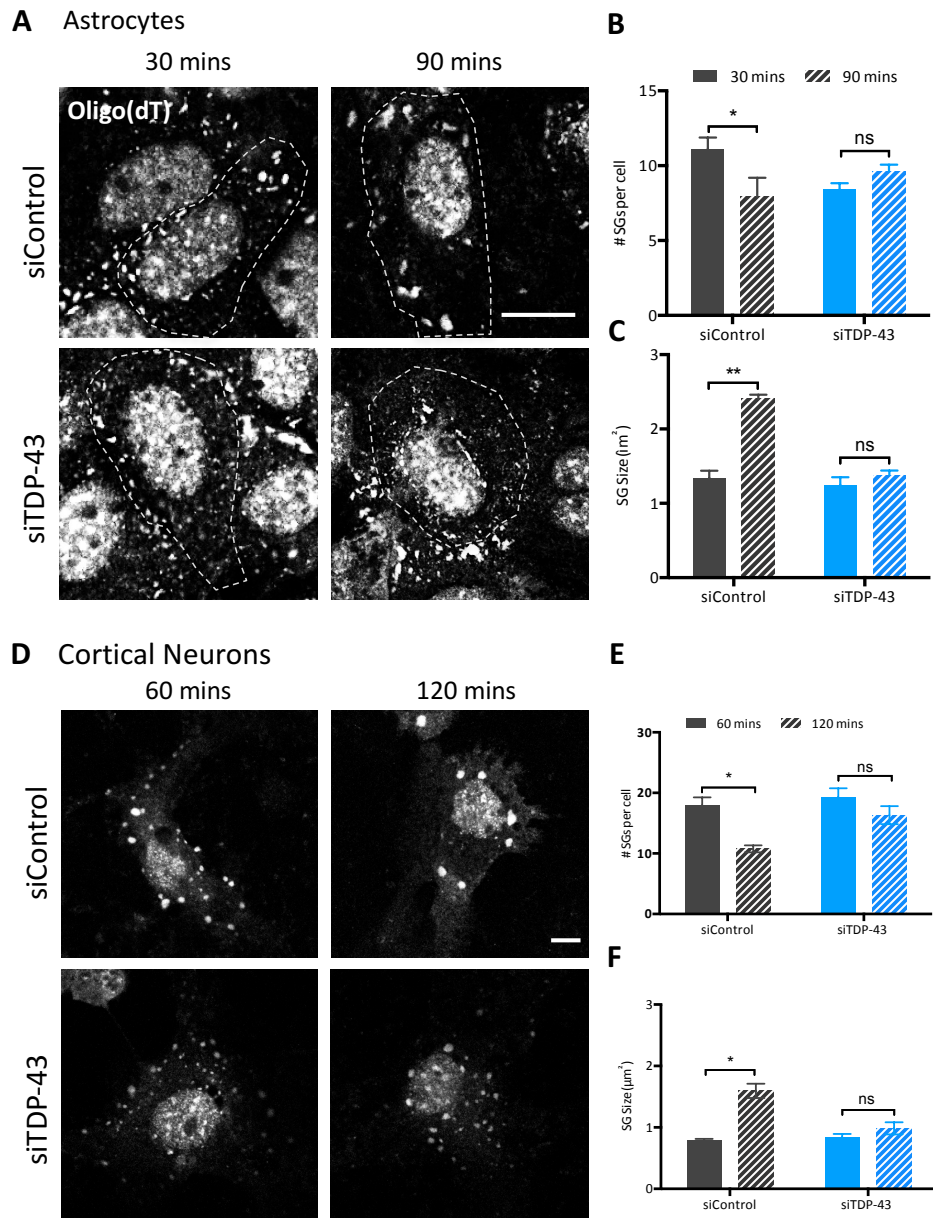
A Astrocytes**B Mouse Embryonic Fibroblasts**

Supplementary figure 2. SG morphology after 60 min SA treatment. Primary cultures of (A) astrocytes, (B) mouse embryonic fibroblasts treated (or not) for 60 min with 0.5 mM of sodium arsenite (+SA). Cytoplasmic SGs were co-labelled with an oligo(dT) probe, to track polyadenylated mRNA, and an antibody against HuR or CAPRIN1. Scale bar, 10 μ m.

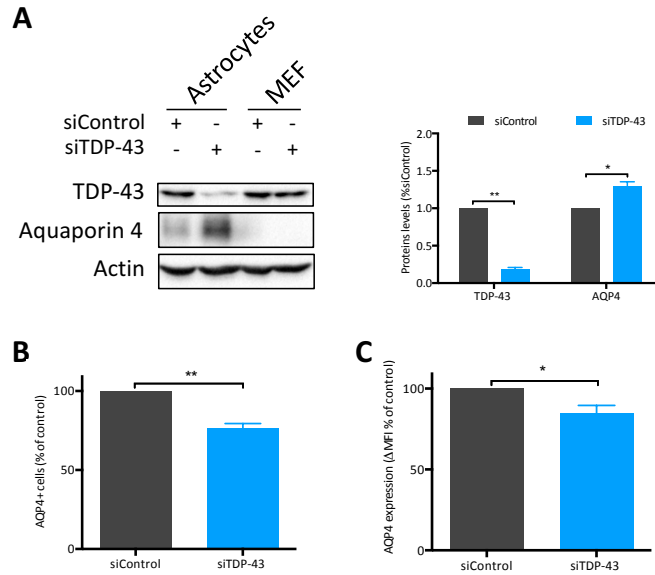
A Astrocytes



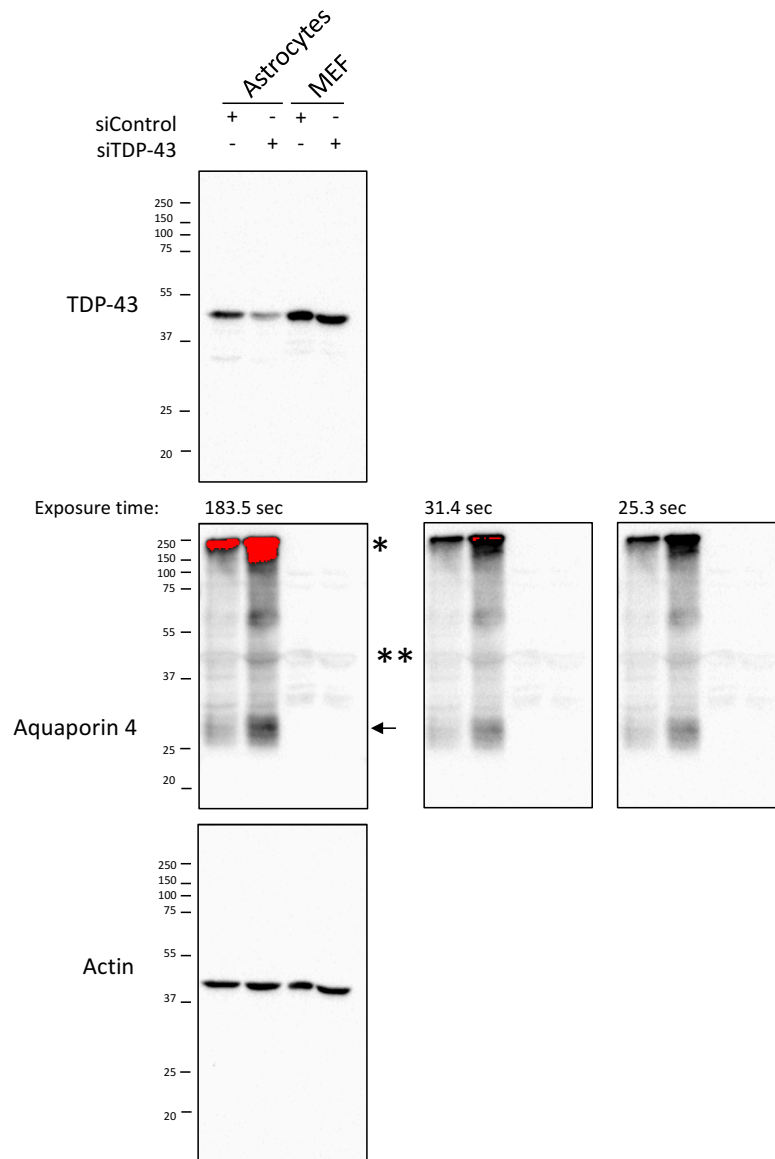
Supplementary figure 3. SG kinetics vary according to cell type and are modulated by TDP-43. (A) Representative images of primary astrocytes treated with SA with cytoplasmic SGs marked with an oligo(dT) probe. NT: non treated cells; 30': 30 mins of stress; 90': 90 mins time point; 150': 150 mins time point. Scale bar, 10 μ m. (B, C) Primary astrocytes (n=3, average N=100 per time point), (D, E) mouse embryonic fibroblasts (MEF) (n=3, average N=100 per time point), were transfected with siRNA (siTDP-43 #2) and subjected to 0.5 mM SA. (B, D) TDP-43 expression levels expressed relative to control cultures, as determined by measurement of TDP-43 signal intensity. (C, E) Percentage of cells displaying SGs at different time points following SA exposure. Data of 3 independent experiments are expressed as the mean \pm SEM; Student *t* test **p* < 0.05, ***p* < 0.01.



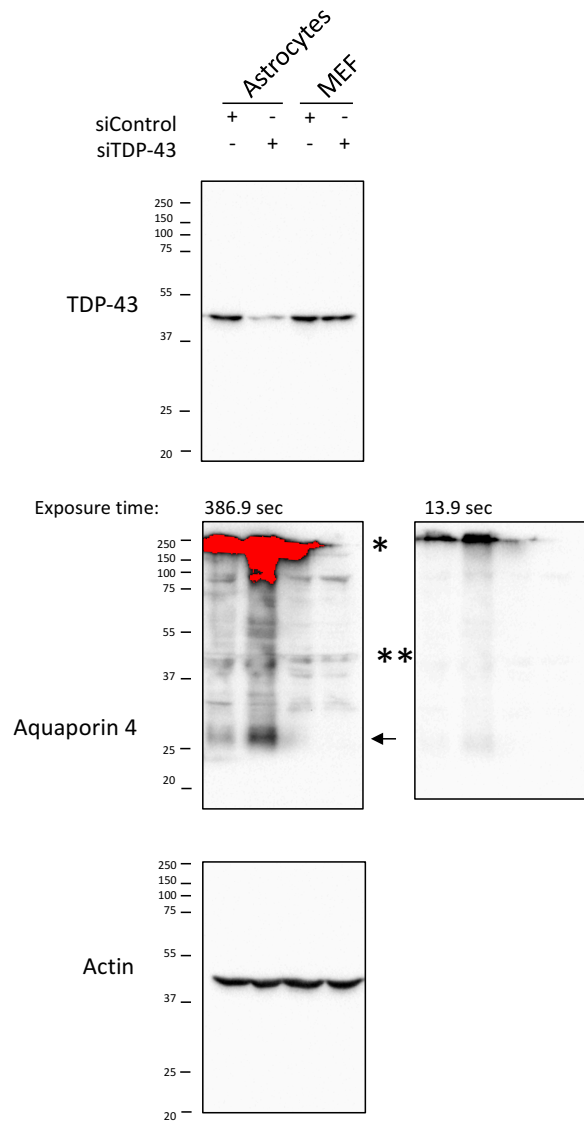
Supplementary figure 4. TDP-43 is required for SG assembly in astrocytes and cortical neurons. (A, D) Representative images of primary astrocytes transfected with TDP-43 siRNA (siTDP-43 #1) and primary cortical neurons transfected with TDP-43 siRNA (siTDP-43 #2), exposed to SA with cytoplasmic SGs marked with an oligo(dT) probe. Scale bar, 10 μm . (B, E) Number of SGs per cell and (C, F) size of individual SGs measured at the indicated time points post-SA exposure (n=3, N=10). Data is expressed as the mean \pm SEM; Student *t* test **p* < 0.05, ***p* < 0.005, ns: not significant.



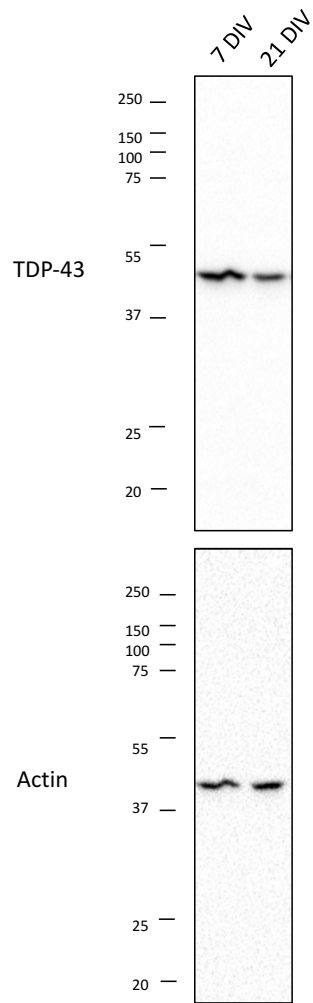
Supplementary figure 5. AQP4 is modulated by TDP-43. (A) Whole cell lysates of astrocytes and MEFs, treated with indicated siRNAs (siTDP-43 #2) were examined by immunoblotting for AQP4. Bands of interest were cropped from unmodified images, quantified via densitometry and normalized to Actin. (Uncropped blots are in Supplemental Material) A representative experiment and quantification of 3 independent experiments are shown. Student *t* test *** $p < 0.001$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$. (B) AQP4 surface labelling of siRNA-treated (siTDP-43 #2) astrocytes as assessed by flow cytometry ($n=3$). (C) AQP4 median fluorescence intensity (Δ MFI over control secondary only) in astrocytes treated by siControl or siTDP-43 (siTDP-43 #2). Cells were analysed by flow cytometry $n=3$. Student *t* test * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.



Supplementary material 1. TDP-43 siRNA increases AQP4. This figure contains uncropped western blots from which Figure 6 is derived. Whole cell lysates from astrocytes and MEFs treated with indicated siRNAs were probed for TDP-43, AQP4 and Actin on the same membrane. * indicates the tetramer of AQP4 which was insufficiently denatured to enter the gel. Images are shown with different exposure time for this overexposed band. ** indicates background band from TDP-43 antibody which was applied prior to AQP4. Arrow indicates AQP4 monomer at 32-34 kDa, as expected.



Supplementary material 2. TDP-43 siRNA 2 increases AQP4. This figure contains uncropped western blots from which supplementary Figure 5 is derived. Whole cell lysates from astrocytes and MEFs treated with indicated siRNAs (siTDP-43 #2) were probed for TDP-43, AQP4 and Actin on the same membrane. * indicates the tetramer of AQP4 which was insufficiently denatured to enter the gel. Images are shown with different exposure time for this overexposed band. ** indicates background band from TDP-43 antibody which was applied prior to AQP4. Arrow indicates AQP4 monomer at 32-34 kDa, as expected.



Supplementary material 3. TDP-43 levels are decreased in aged neurons *in vitro*. Uncropped films from which Figure 7F is derived. Whole cell lysates of 7DIV and 21DIV cortical neurons were immunoblotted for TDP-43 and Actin on the same membrane.

Chapitre 3

Publication

TDP-43 cytoplasmic mislocalisation and stress granules *in vivo*

Manuscript in preparation for submission

Préface

Ayant constaté l'importance de la bonne régulation de la réponse au stress *in vitro* Dre. Christine Vande Velde et moi voulions étudier ces mécanismes *in vivo* afin de mieux comprendre leur implication dans la pathologie de la SLA. La régulation de TDP-43 de la dynamique des GSs s'effectue au travers de G3BP1. Nous avons vérifié d'abord *in vitro*, dans des cultures primaires d'astrocytes murins, que la délocalisation de TDP-43 du noyau au cytoplasme (marque majeure de la SLA) entraînait bien la diminution d'expression de G3BP1. Ce qui démontre une perte de fonction nucléaire de TDP-43. Comme modèle *in vivo* pour cette étude nous avons choisi un modèle d'axotomie du nerf sciatique chez la souris. Il a été publié auparavant que ce modèle entraîne la déplétion nucléaire de TDP-43 dans les neurones moteurs suite à la blessure. J'ai effectué les chirurgies d'axotomie, préparé les tissus et mis au point un protocole de marquage nous permettant d'utiliser deux anticorps de la même espèce en co-marquage. Ce modèle nous a permis d'observer la déplétion de TDP-43 du noyau 7 jours après la chirurgie, et surtout elle était accompagnée de celle de G3BP1 prouvant *in vivo* la relation entre les deux protéines. Le deuxième modèle *in vivo* utilisé a été l'induction des GSs chez la souris par choc thermique (CT). Basée sur un protocole publié récemment une ancienne stagiaire post-doctorale Céline Deseille a entrepris de mettre au point le protocole dans le laboratoire. Nous avons pu valider la formation de granules d'ARNm suite au CT dans différentes régions du cerveau avec des morphologies de granules différentes. Nous avons observé leur formation dans les neurones moteurs de la moelle épinière. Notre intérêt s'est alors porté sur leur formation avec l'âge, j'ai alors effectué des CT chez des souris de 13 mois qui n'a pas induit de formation granules d'ARNm. Enfin, nous avons eu accès à du tissu de patient SLAs très précieux qui nous a permis de constater l'existence d'inclusions d'ARNm comparé aux contrôles. Dre. Christine Vande Velde et moi avons conçu l'étude, j'ai effectué les expériences (Fig. 1,3-6, Supp Fig 1-3), l'analyse des données et produit les figures et illustrations. Dre Céline Deseille a mis en place le protocole de CT et a effectué la première partie de l'expérience (Fig. 2). Sarah Peyrard s'est occupée de la commande des animaux, Laurie Destroimaisons et Sabrina Semmler ont aidé à la réalisation de certaines expériences (Fig. 3 et 4). Dr Alexandre Prat nous a fourni du tissu de patient contrôle qui a été préparé par Paula Lépine. J'ai écrit le manuscrit présenté dans cette thèse avec l'aide éditoriale de Dre. Christine Vande Velde.

TDP-43 cytoplasmic mislocalization and stress granules *in vivo*

Yousra Khalfallah^{1,3}, Céline Desseille³, Sabrina Semmler^{3,4}, Laurie Destroimaisons³, Sarah Peyrard³, Paula Lépine³, Alexandre Prat^{2,3} and Christine Vande Velde^{2,3*}

Departments of ¹Biochemistry and Molecular Medicine and ²Neurosciences, Université de Montréal, ³Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Centre and ⁴Montreal Neurological Institute and Department of Neurology/Neurosurgery, McGill University, ⁴Montreal Neurological Institute and Department of Neurology/Neurosurgery, McGill University, Montréal, QC, Canada.

***Corresponding author:**

Christine Vande Velde, Ph.D.
Department of Neurosciences, Université de Montréal
CRCHUM-Tour Viger
900, rue Saint-Denis, R09.442
Montréal, QC, CANADA H2X 0A9

Email: c.vande.velde@umontreal.ca
Phone: 514-890-8000 poste 28832

ABSTRACT

Cytoplasmic inclusions of TDP-43, an RNA-binding protein (RBP), and its depletion from the nucleus are a hallmark of the majority of amyotrophic lateral sclerosis cases and nearly half of all frontotemporal dementia cases. Collectively, these are referred to as TDP-43 proteinopathies. It has been long hypothesized that these TDP-43 inclusions emerge from dysregulated physiologic mRNA granules, specifically stress granules (SGs). SGs form in the cytoplasm of stressed cells to protect the mRNA that is released from the polysomes when translation is stalled. In most studies, SG dysregulation is mainly due to its resident RBP disrupted functions. We have previously demonstrated that TDP-43 depletion *in vitro* leads to a loss of G3BP1¹, an RBP which is considered to be a primary component of SG cores, which in turn leads to general dysregulation of SG dynamics. In this study we show *in vivo*, using a sciatic axotomy model, nuclear depletion of TDP-43 accompanied with total depletion of G3BP1 in adult mouse motor neurons. We have also used a recently described hyperthermia model² to induce SGs throughout the mouse central nervous system (CNS). We observed mRNA granule formation in the brain and spinal cord. Interestingly, these granules did not form in aged (13-months) mice exposed to thermal shock.

INTRODUCTION

TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43) is an RNA binding protein (RBP) with various pivotal cellular functions. It has a structural ability to bind UG-rich RNA through two RRM motifs. It also binds proteins via a C-terminal glycine-rich/intrinsically disordered domain. Finally, with a nuclear localisation signal (NLS) and a nuclear export signal (NES), TDP-43 is thought to actively shuttle between the nucleus and the cytoplasm. However, very recent studies have questioned the function of the predicted sequence of NES as mutations in this sequence did not abolish the export of TDP-43 to the cytoplasm, nor obviously, its return to the nucleus^{3,4}. TDP-43 has been proven to be exported passively⁴. This member of the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) plays a major role in transcription, splicing⁵⁻⁹ and RNA stability¹⁰ and transport^{11,12}. Interest in TDP-43 has grown exponentially since its discovery in 2006 as a principle component of the cytoplasmic ubiquitinated inclusions observed primarily in the neurons (and some glia) of ALS^{13,14} (amyotrophic lateral sclerosis) and FTD¹⁵ (frontotemporal dementia) patients. These inclusions are thought to derive from mRNA containing granules such as stress granules^{16,17}. While the presence of some stress granule associated RBPs has been demonstrated, it remains unestablished if mRNA is a component of said inclusions. The cause of neuronal death in these diseases, occurring with age, is still unknown despite the field's collective significant effort. TDP-43 mislocalization to the cytoplasm is the hallmark of ALS/FTD cases, but whether it results in a gain of cytoplasmic function or a loss of nuclear function remains unsolved¹⁸⁻²¹. Several *in vivo* models have been developed in an attempt to recapitulate TDP-43 pathology, such as the injury model where an axotomy in mice resulted in TDP-43 transient nuclear depletion and localisation to the cytoplasm as

a response to the injury²². In a physiological context, TDP-43 can rapidly redistribute from the nucleus to the cytoplasm, and is frequently observed as a component of RNA granules.

When a cell is exposed to external or internal stress, translation is stalled²³ and ribosomal subunits²⁴ as well as mRNA and RNA binding proteins²⁵ are stored in membrane-less cytoplasmic compartments known as stress granules (SGs)^{26,27}. SGs are very dynamic, they form promptly following a stress exposure and dissolve once the stress abates, the rate of which depends on the cell type²⁸. The exact mechanism(s) regulating SG kinetics remains unclear, but it has recently been established that their formation is facilitated by liquid-liquid phase separation (LLPS) of RBPs^{29,30}. Interestingly, multiple RBPs such as FUS and TDP-43, both known to be mutated in ALS and localized to SGs^{31,32}, have been reported to undergo LLPS^{33,34} and form cytoplasmic foci. The function of SGs is still a matter of debate, but their importance in cell survival following stress exposure is well established³⁵. We and others have demonstrated that TDP-43 is important to SG dynamics^{1,28,36,37}. Additionally, as ALS/FTD are aging-related neurodegenerative disease, we have also established that SG assembly is impaired in an *in vitro* paradigm of cultured neurons²⁸. A recent study has shown that pre-exposure to stress at a level that does not induce SG formation *in vitro* and in a mouse model, ultimately attenuates SGs formation³⁸.

Previous efforts to understand the relationship between TDP-43, SG formation and aging have all been executed *in vitro*. Here, using *in vivo* models, we investigate the effects of TDP-43 translocation out of the nucleus on G3BP1 levels, linking it to the loss of nuclear TDP-43 function. In addition, in mice in which SGs are induced in the brain and spinal cord via hyperthermic shock, we demonstrate that aging impairs SG formation *in vivo*.

Finally, in an attempt to advance the understanding of inclusions in ALS, we studied sporadic ALS patient tissue and show the presence of cytoplasmic mRNA foci.

RESULTS

Cytoplasmic TDP-43 expression is linked to a loss of G3BP1 expression

In transformed cells, TDP-43 regulates G3BP1. To determine if this is also true in a cell type of relevance to ALS/FTD, we established an *in vitro* model where endogenous TDP-43 is depleted and replaced by TDP-43 that is restricted to the cytoplasm due to a mutated NLS³⁹. Efforts to establish this system in primary neurons were not fruitful, thus we selected primary astrocytes. Indeed, siRNA-mediated depletion of TDP-43 results in decreased G3BP1 expression, which can be restored by TDP-43^{WT}, but not TDP-43^{ΔNLS}, expression (Supp. Fig. 1). Thus, in a cell type of relevance, these results confirm that cytoplasmic localization of TDP-43 leads to a loss of function, as evident by G3BP1 protein levels.

However, the cell type of primary importance in ALS is the motor neuron. Since our attempts to experimentally force cytoplasmic TDP-43 expression in primary motor neurons were not successful, we turned to an *in vivo* injury paradigm where a distinct pattern of cytosolic mislocalization of TDP-43 has been reported²².

Alterations in TDP-43 and G3BP1 expression in axotomized motor neurons *in vivo*

We performed sciatic nerve axotomy in C57Bl/6 mice. In order to obtain the maximum neurobehavioral deficits without doing spinal root avulsion (also referred to as

proximal axotomy), we chose to sever the nerve just past the sciatic notch, ie as it exits the pelvic bone (Fig. 1A). The behavioural evaluation of all injured mice was performed using the previously published NBA score^{22,40}. At day 1, axotomized mice exhibited notable paralysis of the right foot with dragging, knuckle walking and no toe extension, (Fig. 1B). This phenotype attenuated in the following days post-injury as shown by the significant decrease in the NBA score at day 7 post-injury (Fig. 1B). We confirmed the presence of axotomized motor neurons in the ipsilateral side of the ventral horn of the spinal cord using FluoroGold retrograde labelling. Injured motor neurons, as labelled with FluoroGold, were observed on the ipsilateral side but not on the contralateral side (Supp. Fig. 2).

Examination of TDP-43 expression/localization in injured neurons (ie. FluoroGold labelled) revealed a progressive pattern where TDP-43 was depleted from the nucleus compared to control animals (Fig. 1C). TDP-43 nuclear depletion was detectable at day 3 post-injury and was even more prominent at day 7. TDP-43 nuclear depletion was accompanied by a total loss of G3BP1 expression in these motor neurons, as shown by the representative images (Fig. 1C-E). To quantify this observation, we performed line scan analyses to quantify fluorescent signals of adjacent neurons where one was FluoroGold labelled and one was not (Fig. 1D). In the injured neuron, TDP-43 (red) is mostly present in the nucleus with some granules (presumably transport granules) in the cytoplasm. In contrast, in the neuron located at lower left, TDP-43 is not detectable in the nucleus and is mostly present in cytoplasmic granules. In this neuron, the total level of G3BP1 (green) is decreased. This result is confirmed by quantification of the fluorescence intensity (Fig. 1E). Nuclear TDP-43 expression is reduced by half at 7 days compared to controls while G3BP1 total expression is reduced to only ~25% of the controls ($p < 0.0001$), at 7 days in the injured neurons. We observed a progressive decrease in nuclear TDP-43 expression in motor

neurons throughout the days of injury. Finally, the percentage of neurons with depleted nuclear TDP-43 and total G3BP1, significantly increased from 3% to ~12% with time post-injury (Fig. 1F). To verify if nuclear TDP-43 depletion is specific to TDP-43 or also occurs for other RBPs as well, we also labelled for FUS (another ALS-linked RBP) (Supp. Fig. 3). FUS remains primarily localized to the nucleus even at day 7 in the injured neurons, although, similar to TDP-43, we also observe cytoplasmic FUS granules in both control and axotomized neurons. Taken together, these results demonstrate for the first time an *in vivo* relationship between nuclear TDP-43 depletion and G3BP1 levels in adult motor neurons.

Hyperthermic shock induces mRNA granules throughout the CNS

Despite our efforts, SGs were never observed in the sciatic axotomy model (data not shown). Indeed, while SGs have been demonstrated in organisms such as plants and worms, very few reports have been published to demonstrate SGs *in vivo* in mammalian organisms^{2,38,41,42}. Thus, to establish that SGs occur *in vivo*, and are not a purely cell culture phenomenon, we adopted a recently reported heat shock protocol to induce SG formation in mice. As detailed in the methods, 4-month-old C57Bl/6 mice were anesthetized and placed at 37°C to acclimate their body temperature, and then the incubator temperature was raised to 41-42 °C to induce hyperthermic shock. Pulsed oxygen saturation (SPO₂) was followed and as soon as it collapsed, which typically occurred 20 mins after the start of hyperthermia, the mouse was transcardially perfused with saline and fixative (Fig. 2A). To determine if this stress paradigm induced SG formation *in vivo* in the CNS, we performed FISH with an oligo(dT) probe to label polyadenylated mRNA, an obligate component of SGs²⁸. Impressively, mRNA granules were observed in several different brain regions

including the motor cortex (blue star), hypothalamus (brown star), piriform cortex (green star) and entorhinal cortex (yellow star) (Fig. 2B). In these sites, numerous distinct cytoplasmic foci containing polyadenylated mRNA were observed. In contrast, these foci were never observed in the brains of sham control animals where cytoplasmic oligo(dT) labelling was homogenous. Qualitatively, we observed in 5 different animals that the mRNA granules formed in the motor and entorhinal cortex neurons appeared larger than those formed in the piriform cortex or hypothalamus.

Thermal shock-induced mRNA granule formation is age-dependent in spinal motor neurons

To determine if hyperthermic shock also induced mRNA granules in the spinal cord, we examined the ventral horn of the spinal cord using mRNA-FISH with an oligo (dT) probe. Following hyperthermia, we observed the formation of very small cytoplasmic mRNA granules (Fig. 3A). In contrast, as demonstrated by the high magnification images, cytoplasmic mRNA labelling was homogenous and did not demonstrate any granules (Fig. 3A). Quantification of 5 mice exposed to hyperthermia revealed that this pattern of mRNA organization into fine cytoplasmic puncta was observed in all examined motor neurons of thermal shocked mice (more than a 100 per mouse), but was completely absent from sham control spinal cord motor neurons.

We have previously published that SG assembly, an important requirement for optimal mRNA protection during stress exposure⁴³, is impaired in an *in vitro* model of aged primary motor neurons²⁸. To determine if aging impacts SG dynamics *in vivo*, we performed hyperthermic shock in 13-month-old mice. In 13-month-old sham control animals, oligo (dT) labelling is evenly distributed in the cytoplasm of spinal motor neurons

(Fig. 3B), mimicking that observed in 4-month-old mice. However, in contrast to hyperthermic 4-month-old mice, the labelling remains non-granular in hyperthermic 13-month-old mice. Quantification confirms that there is no mRNA granule formation detected (3% of the hypothermic motor neurons compared to 1% in the controls of 13-month-old mice; Fig. 3B). Thus, we conclude that aging negatively influences the ability of motor neurons to launch a SG response *in vivo*.

Hyperthermia induced-mRNA granules in spinal motor neurons contain SG markers HuR and Caprin1

Whether SGs can form in mammals *in vivo* has not been robustly demonstrated. Thus, to further establish whether the granules containing polyadenylated mRNA that we observed in spinal motor neurons following thermic stress were indeed consistent with SGs, we labelled for RBPs recognized as typical SG markers. We have chosen HuR and Caprin1, two proteins that we and others have published to be localized to SGs in primary cultured motor neurons^{28,44,45}. Labelling with HuR in 4 and 13-month-old sham control animals shows a primarily nuclear localization, as expected, with a regular dispersed cytoplasmic immunoreactivity (Fig. 4A, B). Hyperthermic mice exhibited HuR nuclear labelling and an apparent concentration of the cytoplasmic pool into very distinct and small puncta, reminiscent of those detected with oligo(dT) (Fig. 3A). In contrast, cytoplasmic HuR labelling in the motor neurons of hyperthermic 13-month-old mice seemed to be increased but did not localise into granules (Fig. 4B), as observed in the motor neurons of 4-month-old animals.

As for Caprin1, a known cytoplasmic protein, its localisation is as expected in the sham control 4 month and 13-month-old animals (Fig. 4 C, D). Bright cytoplasmic puncta

were visible in the spinal motor neurons of 4 month, but not 13 month, old hyperthermic mice, similar to what we observed for HuR. These results, taken together with the formation of mRNA granules following hyperthermia, leads us to conclude that the cytoplasmic foci that we observed post thermal shock are indeed SGs.

Stress granule protein expression in thermal shocked mice

We first looked at TDP-43 expression or possible mislocalization. TDP-43 remained primarily nuclear between sham controls and hyperthermic animals (Fig. 5A, B). But as noted previously in the sciatic injury model, we observed TDP-43 cytoplasmic foci in controls and hyperthermic animals with no change in this pattern. The only difference we observed was that cytoplasmic TDP-43 appeared to be in a more filamentous state in aged mice compared to younger mice (Fig. 5B). Other SGs proteins like G3BP1, TIAR or HSP70 did not show any change of localisation or pattern between 4-month-old and 13-month-old mice, sham control or hyperthermia conditions (Fig5. C and D).

ALS patient motor neurons contain inclusions containing polyadenylated mRNA

While TDP-43 cytoplasmic inclusions are a primary pathological feature of post-mortem ALS motor neurons, it remains undetermined if these inclusions polyadenylated mRNA. Thus, we performed mRNA-FISH with an oligo (dT) probe on post mortem tissue. In 2 of 3 ALS patient spinal cords, cytoplasmic mRNA foci were visible (Fig. 6). For one patient, we also had access to the motor cortex; we did not observe polyadenylated cytoplasmic foci in this location (data not shown). Polyadenylated mRNA foci were not observed in the 4 age-matched non-ALS spinal cord control tissues. It is the first report of

cytoplasmic mRNA foci in ALS patient spinal motor neurons. Despite our efforts, co-labeling of TDP-43 and mRNA-FISH was technically unsuccessful.

DISCUSSION

In this report, we show *in vitro* that TDP-43 depletion is equivalent to cytoplasmic restricted TDP-43, made possible by point mutations in the NLS, with regards to reduced G3BP1 protein levels. In order to determine if this was also true in adult spinal motor neurons, we used a medial sciatic axotomy model where we determined that injured motor neurons demonstrated gradual nuclear depletion of TDP-43 starting day 3 post injury until day 7. This was accompanied by depletion of total G3BP1 levels in motor neurons. It is to be noted that G3BP1 levels decreased by 70% once nuclear TDP-43 fluorescence intensity reached 50% of the controls. This result shows a dosage-dependent effect, very interesting in the context of the pathology. Indeed, it means that it is possible to restore or stop the possible defects by maintaining TDP-43 levels at 50%. TDP-43 nuclear depletion appeared to be specific since the closely related and ALS-linked RBP FUS did not exhibit the same pattern in injured motor neurons. Together with our *in vitro* findings these *in vivo* results support the loss of function hypothesis for TDP-43 when it exits the nucleus. We also determined that hyperthermia does not appear to induce astrogliosis (Fig. 4 C and D) showing that HS does not seem to activate inflammation. However, there are differences between our study and a previous axotomy model²². Indeed, in our axotomy model, we observed a depletion in the nuclear pool of TDP-43 rather than its mislocalization to the cytoplasm *per se*. These differences could be explained by the fact that we conducted a medial axotomy of the sciatic nerve as it exited the sciatic notch, while the previous study they conducted both proximal, cut at the 3rd to 5th lumbar level, and distal axotomy, cut 1

cm distal from the exit point of spinal nerve roots²². Another report, where axonal ligation of the hypoglossal neurons was used to induce TDP-43 mislocalization, showed a similar pattern of nuclear exclusion of TDP-43⁴⁶. Further investigations are needed to uncover the molecular differences in TDP-43 redistribution following injury.

In our study, we were able to induce SGs *in vivo* in mouse brain and spinal cord using a recently published protocol of hyperthermic shock². Multiple parts of the brain showed formation of cytoplasmic mRNA granules following hyperthermic stress, with granule morphology seeming to vary according to CNS region. Another study using this protocol did not examine the morphology of this granules throughout the brain³⁸. By studying granule formation in the spinal cord, our study confirms that SGs are not an artefact of *in vitro* studies and bring us one step closer to understanding their basic mechanism *in vivo*. Hyperthermia did not induce mRNA granules in 13-month-old motor neurons. This result suggest that the mechanisms governing RNA granule dynamics are modified by age. Alternatively, it is possible that longer exposure to stress is required to form SGs in aged mice. Indeed it has been shown that preconditioning to stress reduces the ability of cells to form SGs *in vivo*³⁸. Thus, one could argue that multiple stress exposures, as might occur during natural aging, may equate to this preconditioned state. These results strongly support the hypothesis that SG formation is impaired with age *in vivo*, possibly resulting in the increased vulnerability of motor neurons that is at the centre of ALS pathogenesis.

By considering SGs proteins such as G3BP1 or TIAR we did not observe differences in their protein levels between 4-month and 13-month old mice. We did note that hyperthermic 4-month old mouse brain or the spinal cord did not exhibit TIAR in any cytoplasmic granules, contrary to previous report³⁸. However, we did observe HuR and

Caprin1 cytoplasmic foci resembling those labelled for polyadenylated mRNA. The underlying mechanisms of specific protein recruitment to SGs remain to be identified. However, we show here *in vivo* that mRNA is strongly recruited to these membrane-less entities, as shown previously *in vitro*⁴⁷.

Finally, it is thought that ALS and FTD are very likely to be pathologies linked to RNA dysregulation due to the multitude of RBPs mutated in these pathologies, and thus implicating cytoplasmic pools of RNA. We have been able to conduct an mRNA-FISH in a post mortem ALS patient and control spinal cords and we report here the presence of cytoplasmic mRNA foci in the motor neurons of ALS cases and none in controls. Our results further emphasize RNA dysregulation in the pathogenesis.

MATERIAL AND METHODS

Animals

The use of animals and all procedures were performed according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the CRCHUM Institutional Committee for the Protection of Animals. *Sciatic axotomy*: Female C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Kingston, NY, USA) were purchased. Studies were carried out on mice aged between 6-8 weeks, weighing ~20 g. After surgery, mice were kept in separate clean cages and allowed free access to food and water throughout the duration of the study. *Hyperthermia*: Male C57BL/6 mice aged 4-6 months or 13 months were subjected to momentary hyperthermia shock as previously described^{2,38}, and then immediately transcardially perfused. The use of different sexes for these experiment is based on what was published for both protocols.

Sciatic axotomy procedure

We conducted our protocol based on a previously published protocol for axotomy²². Mice were weighed and anesthetized by exposition to 1.5 l/min oxygen and 4% isoflurane. After loss of limb reflexes, animals were transferred to a mask system and maintained with 1 l/min oxygen and 2% isoflurane. For a medial axotomy, mice were shaved and the site of surgery sterilized. The right sciatic nerve was exposed with an incision 1 cm below the exit of the hip. The nerve was then cut 1 cm distal from the exit point of spinal nerve roots. A surgical sterile sponge soaked in 5% fluorogold (Fluorochrome, LLC) in sterile saline was deposited at the site of the nerve cut to enable visualization of injured motor neurons post-injury. Mice were allowed to recover in a clean heated cage. Pain was managed with buprenorphine injection just prior to surgery, followed by a slow release formulation injected 5h post-surgery. Neurobehavioral assessments based on a previously published

scale^{22,40} were conducted at days 1, 3, 5 and 7 post injury. It consist on rating motor functions based on the placement of the limb (dragging to normal flat under body) and walking ability (knuckle walking to normal).

Hyperthermia induction

As described^{2,38}, after anesthesia (1.0 mL Ketamine 100 mg/mL, 0.25 mL Xylazine 20 mg/mL, 0.1 mL Acepromazine 10 mg/mL, 8.65 mL saline. Dose: 0.1 mL/1 g of mice) the mice were placed in a 37°C incubator supplemented with oxygen for their comfort. Mice were monitored with mouseox (STARR Life Sciences Corp.). The right leg was shaved and a hydrogel solution was applied to allow the saphenous vein to be correctly measured. SPO₂, heart rate and respiratory rate were followed. When the SPO₂ was stable (~20 min), the incubator temperature was increased to 42°C (monitored by a thermometer inside the incubator) for 20 min of thermal shock. Transcardiac perfusion with 4% paraformaldehyde (FD NeuroTechnologies) diluted in 1X Sorenson's saline + 9g/L NaCl immediately followed.

Patient material

Tissue from ALS patients was received from the Douglas-Bell Canada Brain Bank. Controls non-ALS cases with matched gender and age were received from the CHUM MS biobank. Patients didn't present any known genetic background as shown in Supplementary Table 1. All donors provided informed consent in accordance with institutional guidelines (Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Ethic Committee, approval numbers BH07.001 and 2019-7932).

Fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunofluorescence in tissue

FISH on tissue was performed similarly as we previously published²⁸. After a wash

with 5X SSC tissue were subjected to an acetylation step (TEA 0.1M pH8 and add acetic anhydride 3ul/ 1ml under stirring for 10min). Then permeabilized with 0.5% Triton 100. The blocking is conducted with the hybridization buffer (0.005% BSA, 1 mg/ml yeast RNA, 10% dextran sulfate, and 25% formamide, diluted in 2X SSC) at room temperature for 2 h. Finally the tissue is incubated with the probe in the hybridization buffer (1.3 ng Cy3 labelled oligo(dT) probe, 0.005% BSA, 1 mg/ml yeast RNA, 10% dextran sulfate, and 25% formamide, diluted in 2X SSC) at 37°C overnight. Nuclei was visualised with TO-PRO®-3 (Invitrogen).

For immunofluorescence, tissues were permeabilized and blocked with 0.5% Tween-20 and 5% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch, 017-000-121) for 45 min at room temperature, primary antibody incubations were performed in 0.3% Tween-20 and 3% normal donkey serum in PBS overnight at 4°C, followed by an appropriate fluorescently conjugated secondary antibodies against the desired species (Jackson ImmunoResearch). When two primary antibodies used were from the same species we added a Fab fragment incubation on the first primary antibody overnight at 4°C, then after washing we incubated the second primary antibody followed with the secondary antibody as indicated above. Antibodies used in this study: rabbit TDP-43 (1:200, Proteintech, 10782-2-AP), rabbit G3BP1 (1:100, Millipore, 07-1801), guinea pig anti-FluoroGold (1:2000, NM-101 FluGgp, Protos Biotech Corp), goat ChAT (1:100, Millipore, AB144P), mouse HuR (1:300, Santa Cruz, SC-5261), mouse SMI32 (1:2000, Covance, SMI-32R), rabbit CAPRIN (1:1000, Proteintech Group, 15112-1-AP), chicken GFAP (1:2000, Abcam, ab4674), goat TIAR (1:100, Santa Cruz, sc-1749), rabbit HSP70 (1:100, Enzo Life Sciences, ADI-SPA-812). Images were collected using a confocal microscope (SP5; Leica) equipped with LAS AF software (Leica) for acquisition at 63x. Adobe Photoshop CC 2018

was used for quantification of fluorescence intensity. Importantly, all compared images were acquired with the same settings.

Constructs

As previously published^{39,48} pCS2-Flag-TDP-43^{WT} was modified, using the QuickChange[®] II Site-Directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) to generate a mutated nuclear localization signal (Δ NLS: K82A/R83A/K84A), Flag-TDP-43 ^{Δ NLS}-siRes, with the forward primer 5'-CAACTATCCAAAAGATAACGCAGCAGCAATGGATGAGACAGATGC-3' and its complementary reverse. Then modifications to confer the TDP-43 plasmids siRNA-resistant were done with the forward primer 5'-CTTCCTAATTCTAAGCAGAGGCAGGACGAGCCTTTGAGAAGC-3' and its complementary reverse⁴⁸.

Preparation and transfection of mouse astrocytes

Primary astrocytes were cultured as previously published²⁸ from C57BL/6 pups (P0-P3) bred in-house using stock obtained from Charles River Laboratories (Kingston, NY, USA). Cells from dissociated cortices were cultured in Dulbecco's modified Eagle media (DMEM, Invitrogen), supplemented with 10% FBS, 1% glutamine and 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma) on poly-L-ornithine (Sigma) coated plates and coverslips. Cells were used at confluence (~14 DIV).

Astrocytes were transfected at 60–70% confluence with 40 pmol of custom siRNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions and collected after 72 h. siRNA sequences used were: mouse TDP-43 #1, 5'-

AAGCAAAGCCCAGACGAGCCUUUGA-3’; mouse TDP-43 #2 (MSS214149, Thermo Fisher Scientific): 5'-GCAAUCUGGUAUAUGUUGUCAACUA-3’; and the negative control low GC siRNA (#12935-200; Invitrogen). cDNA transfection was made 48h after siRNA transfection.

Western Blot

As previously published³⁶, lysis was performed with a RIPA buffer (150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, and protease inhibitors). Proteins were then quantified with the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Proteins were loaded for standard SDS-PAGE. The antibodies used were: rabbit anti-TDP-43 (1:10 000; 10782-2-AP Proteintech, Chicago, IL, USA), rabbit G3BP1 (1:100, Millipore, 07-1801) and mouse anti-Actin (1:200 000; 69100 MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) as a loading control. Peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL Western Blotting Substrate (Pierce, Waltham, MA, USA) were used for visualisation. Images were acquired using the BIO-RAD ChemiDoc MP imaging system, and then exported as tifs via the Image Lab application without any manipulation. Densitometry was then performed with Adobe Photoshop CC 2018. No post-acquisition modifications were made.

Statistics

Data were compared via two-tailed unpaired *t* test, Mann-Whitney and two-way ANOVA as indicated in the figure legends, with statistical significance established at $p < 0.05$.

Acknowledgements

We thank the CRCHUM Cell Imaging platform (Aurélie Cleret-Buhot) for help with the confocal microscopy. We also thank Dr Stephanie Zandee for help setting up FISH on human tissue. This work was supported by the ALS Society of Canada, the ALS Canada/Brain Canada Hudson Translational Team Grant and a Rare Disease Foundation mini-grant. CVV is an FRQS Senior Research Scholar.

Author contributions

YK helped in the project design, analyzed and assembled the data, and wrote the manuscript with CVV. CD helped design and produce part of the data related to hyperthermic shock. SS, LD and SP helped with techniques. AP and PL provided and prepared control human tissue. CVV designed and directed the project. All authors reviewed and approved the manuscript prior to submission.

Conflict of interest: The authors have no conflict of interests to declare.

REFERENCES

1. McDonald, K. K. *et al.* TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1400–1410 (2011).
2. Chauderlier, A., Delattre, L., Buée, L. & Galas, M.-C. In Vivo Hyperthermic Stress Model: An Easy Tool to Study the Effects of Oxidative Stress on Neuronal Tau Functionality in Mouse Brain. *Methods Mol. Biol.* **1523**, 369–373 (2017).
3. Ederle, H. *et al.* Nuclear egress of TDP-43 and FUS occurs independently of Exportin-1/ CRM1. 1–18 (2018). doi:10.1038/s41598-018-25007-5
4. Pinarbasi, E. S. *et al.* Active nuclear import and passive nuclear export are the primary determinants of TDP-43 localization. *Sci. Rep.* 1–16 (2018). doi:10.1038/s41598-018-25008-4
5. Buratti, E. & Baralle, F. E. The multiple roles of TDP-43 in pre-mRNA processing and gene expression regulation. *RNA Biol.* **7**, 420–429 (2010).
6. Buratti, E. & Baralle, F. E. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front. Biosci.* **13**, 867–78 (2008).
7. Mercado, P. A., Ayala, Y. M., Romano, M., Buratti, E. & Baralle, F. E. Depletion of TDP 43 overrides the need for exonic and intronic splicing enhancers in the human apoA-II gene. doi:10.1093/nar/gki897
8. Bose, J. K., Wang, I.-F., Hung, L., Tarn, W.-Y. & Shen, C.-K. J. TDP-43 Overexpression Enhances Exon 7 Inclusion during the Survival of Motor Neuron Pre-mRNA Splicing. *J. Biol. Chem.* **283**, 28852–28859 (2008).
9. Ayala, Y. M. *et al.* Human, Drosophila, and C.elegans TDP43: nucleic acid binding properties and splicing regulatory function. *J. Mol. Biol.* **348**, 575–88 (2005).
10. Buratti, E. *et al.* TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J. Biol. Chem.* **280**, 37572–84 (2005).
11. Alami, N. H. *et al.* Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron* **81**, 536–43 (2014).
12. Wang, I.-F., Wu, L.-S. & Shen, C.-K. J. TDP-43: an emerging new player in neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* **14**, 479–85 (2008).
13. 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).
14. Neumann, M. *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (80-.)*. **314**, 130–133 (2006).
15. Wang, I.-F., Wu, L.-S., Chang, H.-Y. & Shen, C.-K. J. TDP-43, the signature protein of FTL-D-U, is a neuronal activity-responsive factor. *J. Neurochem.* **105**, 797–806 (2008).
16. Vanderweyde, T. *et al.* Contrasting pathology of the stress granule proteins TIA-1 and G3BP in tauopathies. *J. Neurosci.* **32**, 8270–83 (2012).
17. Ash, P. E. A., Vanderweyde, T. E., Youmans, K. L., Apicco, D. J. & Wolozin, B. Pathological Stress Granules in Alzheimer’s Disease. *Brain Res.* **1584**, 52–58 (2014).
18. 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 (2009).
19. 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**, 1 (2018).
 20. Schwenk, B. M. *et al.* TDP-43 loss of function inhibits endosomal trafficking and alters trophic signaling in neurons. *EMBO J.* **35**, e201694221 (2016).
 21. Cascella, R. *et al.* Quantification of the relative contributions of loss-of-function and gain-of-function mechanisms in TDP-43 proteinopathies. *J. Biol. Chem.* jbc.M116.737726 (2016). doi:10.1074/jbc.M116.737726
 22. Moisse, K. *et al.* Divergent patterns of cytosolic TDP-43 and neuronal progranulin expression following axotomy: Implications for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury. *Brain Res.* **1249**, 202–211 (2009).
 23. Anderson, P. & Kedersha, N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. (2009). doi:10.1038/nrm2694
 24. Ross Buchan, J., Nissan, T. & Parker, R. *Analyzing P-bodies and stress granules in saccharomyces cerevisiae. Methods in Enzymology* **470**, (Elsevier Inc, 2010).
 25. Jain, S. *et al.* ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell* **164**, 487–498 (2016).
 26. Anderson, P. & Kedersha, N. 壽Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* **7**, 213–221 (2002).
 27. Anderson, P. & Kedersha, N. Stress granules. *Curr. Biol.* **19**, 397–398 (2009).
 28. Khalfallah, Y. *et al.* TDP-43 regulation of stress granule dynamics in neurodegenerative disease-relevant cell types. *Sci. Rep.* 1–13 (2018). doi:10.1038/s41598-018-25767-0
 29. Molliex, A. *et al.* Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization. *Cell* **163**, 123–133 (2015).
 30. Protter, D. S. W. & Parker, R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol.* **26**, 668–679 (2016).
 31. Sama, R. R. K. *et al.* FUS/TLS assembles into stress granules and is a prosurvival factor during hyperosmolar stress. *J. Cell. Physiol.* **228**, 2222–2231 (2013).
 32. Colombrita, C. *et al.* TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J. Neurochem.* **111**, 1051–1061 (2009).
 33. Li, H. R., Chiang, W. C., Chou, P. C., Wang, W. J. & Huang, J. rong. 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).
 34. Lin, Y., Protter, D. S. W., Rosen, M. K. & Parker, R. Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins. *Mol. Cell* **60**, 208–219 (2015).
 35. Takahashi, M. *et al.* Stress Granules Inhibit Apoptosis by Reducing Reactive Oxygen Species Production. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 815–829 (2013).
 36. Aulas, A. s, Stabile, S. phanie & Velde, C. Vande. Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP. *Mol. Neurodegener.* **7**, 1 (2012).
 37. Orru. Reduced stress granule formation and cell death in fibroblasts with the A382T mutation of TARDBP gene: evidence for loss of TDP-43 nuclear function. SandroNo Title. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 1689–1699 (2016).
 38. Shelkovernikova, T. A. *et al.* Chronically stressed or stress-preconditioned neurons fail to maintain stress granule assembly. *Nat. Publ. Gr.* **8**, (2017).

39. 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**, 13302–9 (2008).
40. Swarup, V., Audet, J.-N., Phaneuf, D., Kriz, J. & Julien, J.-P. Abnormal Regenerative Responses and Impaired Axonal Outgrowth after Nerve Crush in TDP-43 Transgenic Mouse Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurosci.* **32**, 18186–18195 (2012).
41. Nover, L., Scharf, K. D. & Neumann, D. Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 1648–55 (1983).
42. Sun, Y. *et al.* A genome-wide RNAi screen identifies genes regulating the formation of P bodies in *C. elegans* and their functions in NMD and RNAi. *Protein Cell* **2**, 918–939 (2011).
43. Aulas, A. *et al.* G3BP1 promotes stress-induced RNA granule interactions to preserve polyadenylated mRNA. *J. Cell Biol.* **209**, 73–84 (2015).
44. Gallouzi, I. E. *et al.* HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3073–8 (2000).
45. Solomon, S. *et al.* Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α , entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 2324–42 (2007).
46. Sato, T. *et al.* Axonal ligation induces transient redistribution of TDP-43 in brainstem motor neurons. *Neuroscience* **164**, 1565–1578 (2009).
47. Boundedjah, O. *et al.* Free mRNA in excess upon polysome dissociation is a scaffold for protein multimerization to form stress granules. *Nucleic Acids Res.* **42**, 8678–91 (2014).
48. Deshaies, J.-E. *et al.* TDP-43 regulates the alternative splicing of hnRNP A1 to yield an aggregation-prone variant in amyotrophic lateral sclerosis. (2018). doi:10.1093/brain/awy062

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Changes in TDP-43 and G3BP1 expression in injured motor neurons following medial axotomy. A) Schematic of the medial site of axotomy. B) NBA score of the axotomized mice at days 1, 3, 5 and 7. Data is expressed as the mean \pm SEM; Unpaired t test ****p < 0.0001. C) Representative images of immunohistochemistry on control non-axotomized and axotomized mice (days 3 and 7) spinal cord tissues, showing injured motor neurons of the ventral horn using rabbit TDP-43, rabbit G3BP1 and guinea pig Fluorogold antibody. n=5 mice for each time point. The grey line show limits of the cell and dotted grey line show the limits of the nucleus. D) Representative image (left) of a control and an injured motor neuron with the intracellular distribution (nucleus and cytoplasm, right) of TDP-43 in red and G3BP1 in green. The grey line show limits of the cell and dotted grey line show the limits of the nucleus. The straight grey line show the location of the distribution displayed on the left. E) Fluorescence intensity of nuclear TDP-43 and total G3BP1 for the control non-injured and injured motor neurons (days 3, 5 and 7), n=3 mice and N=10 cells for each time point. Data is expressed as the mean \pm SEM; Two-way ANOVA ***p = 0.0003, ****p < 0.0001. F) Percentage of motor neurons depleted of nuclear TDP-43 and total G3BP1 in the injured neurons (days 3, 5 and 7), n=5 mice. Data is expressed as the mean \pm SEM; Mann-Whitney test **p=0.0079. Scale bar, 10 μ m.

Figure 2. Hyperthermic mice exhibit mRNA granules in different regions of the brain.

A) Schematic of the hyperthermia treatment, the mouse SPO₂ (red line) was followed the entire time of the heat shock (HS). B) Representative images of mRNA-FISH with red oligo (dT) probe in control (sham) neuron and neurons from motor cortex (blue star), hypothalamus (brown star), piriform cortex (green star) and entorhinal cortex (yellow star). The mRNA granules are shown at higher magnification. TO-PRO-3 is showed in blue. Scale bar, 10 μ m.

Figure 3. Heat shocked adult mice display mRNA granules in spinal motor neurons of young, but not aged, mice.

A and B) Representative images of mRNA-FISH with red oligo (dT) probe in control (sham) motor neurons and HS motor neurons from ventral horn spinal cord of A) 4 months old mice and B) 13 months old mice. The mRNA granules and their absence are shown at higher magnification. Motor neurons are labelled with goat ChAT (green). The percentage of cells with mRNA granules is indicated on the right. A) n= 5 for each condition and B) n= 4 for sham control and n=5 for HS. Data is expressed as the mean \pm SEM; Unpaired t test ****p < 0.0001 and ns: non-significant. Scale bar, 10 μ m.

Figure 4. Hyperthermic mice display HuR and Caprin1 granules in the spinal cords of young, but not aged, mice.

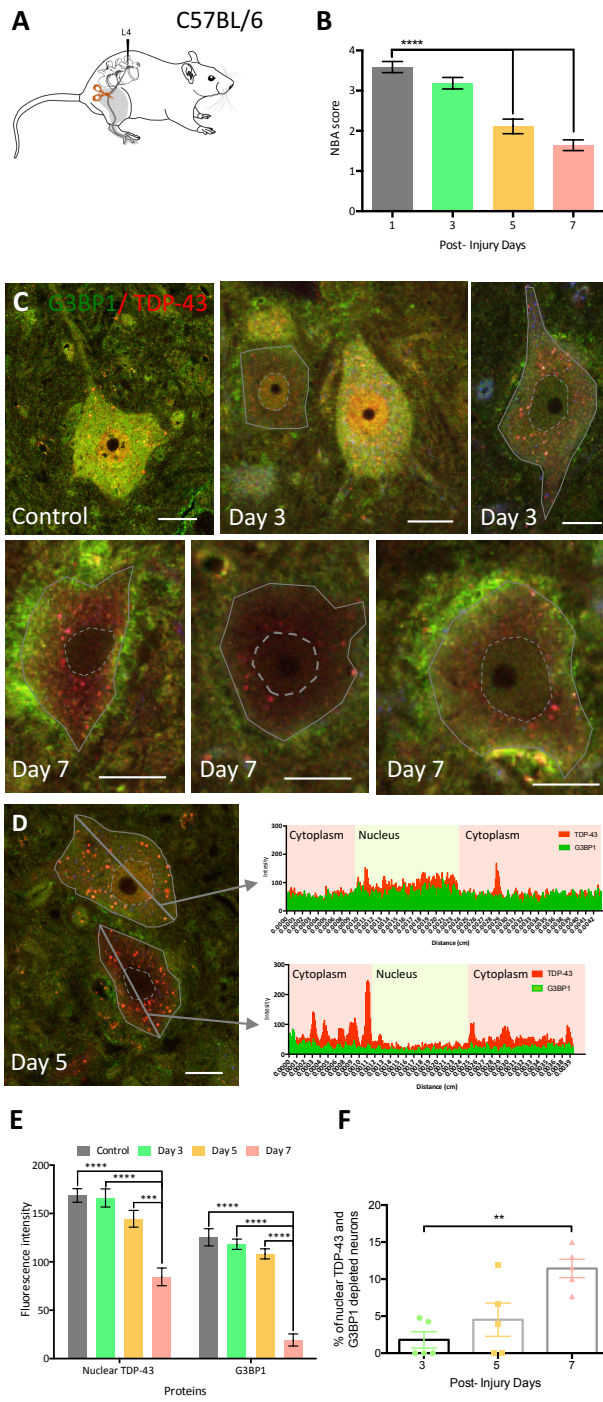
A-D) Representative images of A, B) HuR (in red), ChAT (motor neuron marker, blue) and C, D) Caprin1 (green), SMI32 (motor neuron marker, red), GFAP (astrocytic marker, in blue), in control (sham) motor neurons and HS motor neurons from ventral horn spinal cord of A, C) 4-month old mice and B, D) 13-month old mice. A, C) n= 5 for each condition and B, D) n= 4 for control and n=5 for HS. Yellow arrowhead indicates the small granules reactive for HuR and Caprin1. Scale bar, 10 μ m.

Figure 5. Expression of stress granule proteins in thermal shocked mice.

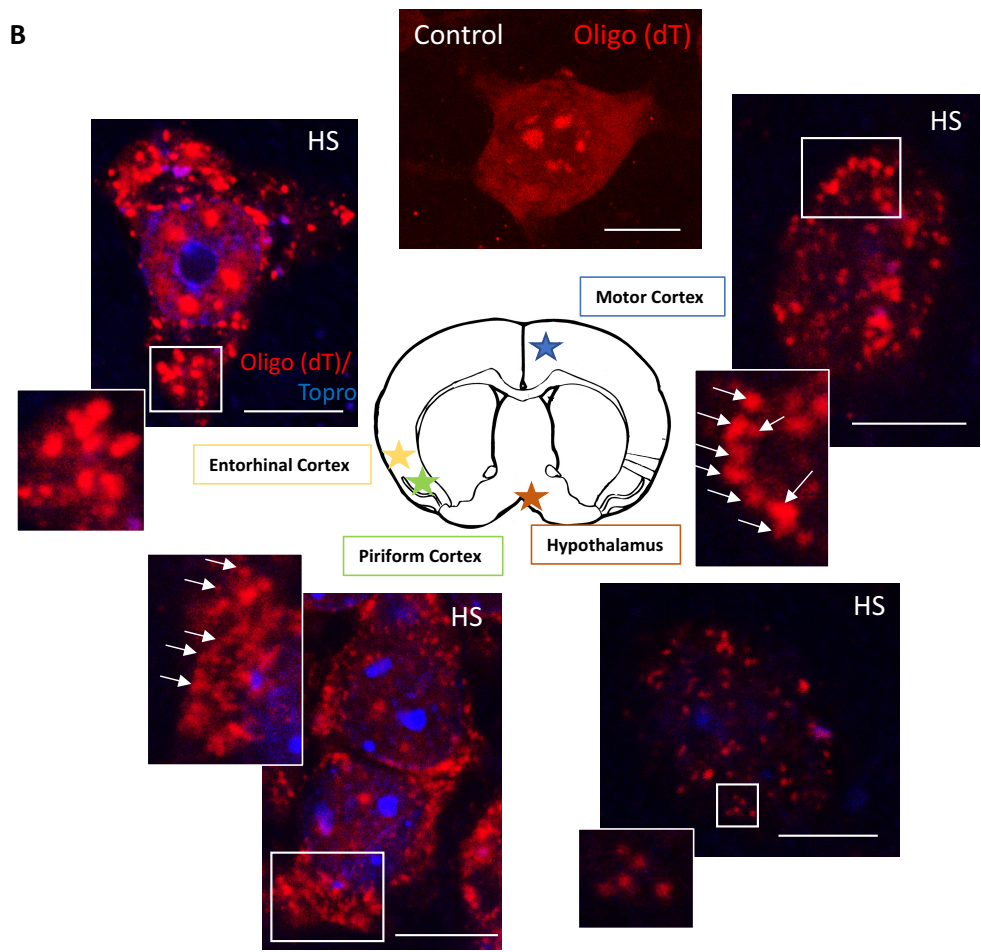
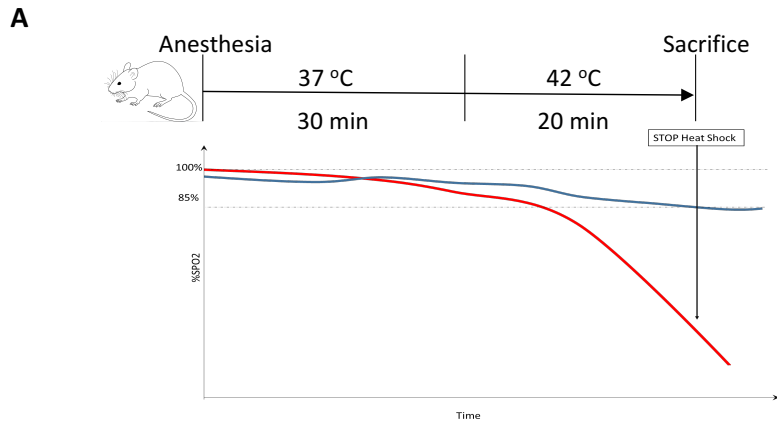
A-D) Representative images of A, B) TDP-43 (green), ChAT (motor neuron marker, blue) and C, D) G3BP1 (green), TIAR (red) and HSP70 (green), in control (sham) motor neurons and HS motor neurons from ventral horn spinal cord of A, C) 4-month old mice, n= 5 for

each condition and B, D) 13-month old mice, n= 4 for sham control and n=5 for HS. Scale bar, 10 μ m.

Figure 6. ALS patient motor neurons present mRNA inclusions. Representative images of mRNA-FISH with red oligo(dT) probe in two control cases (1 and 2) and two ALS cases (1 and 2) motor neurons. Yellow arrowhead indicates mRNA inclusion reactive for oligo(dT). Scale bar, 10 μ m.

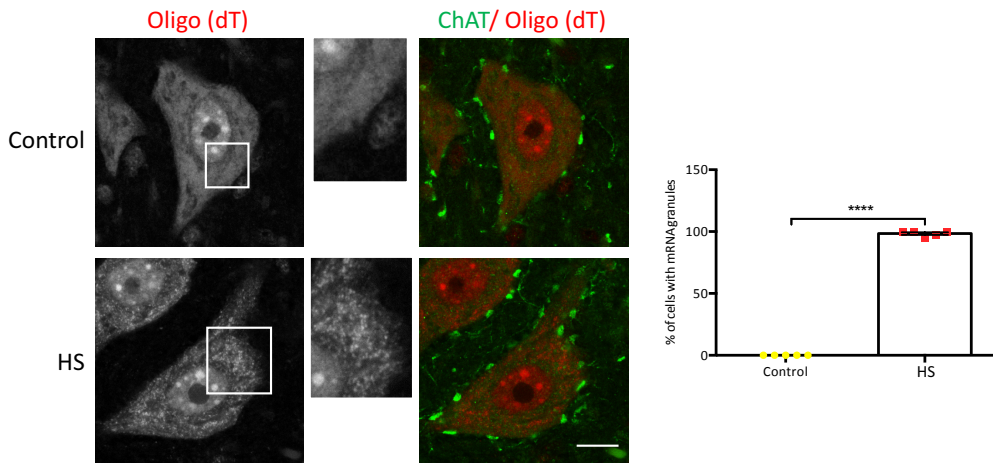


Khalfallah et al, Figure 1

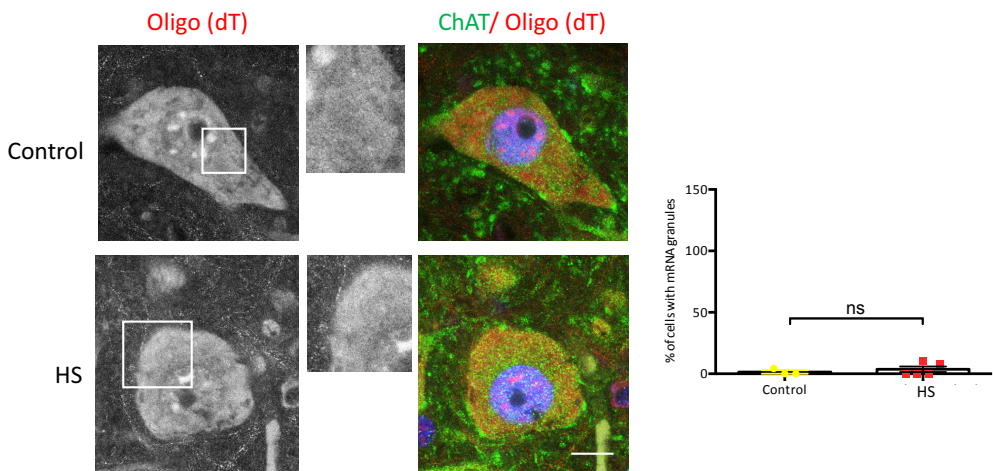


Khalfallah et al, Figure 2

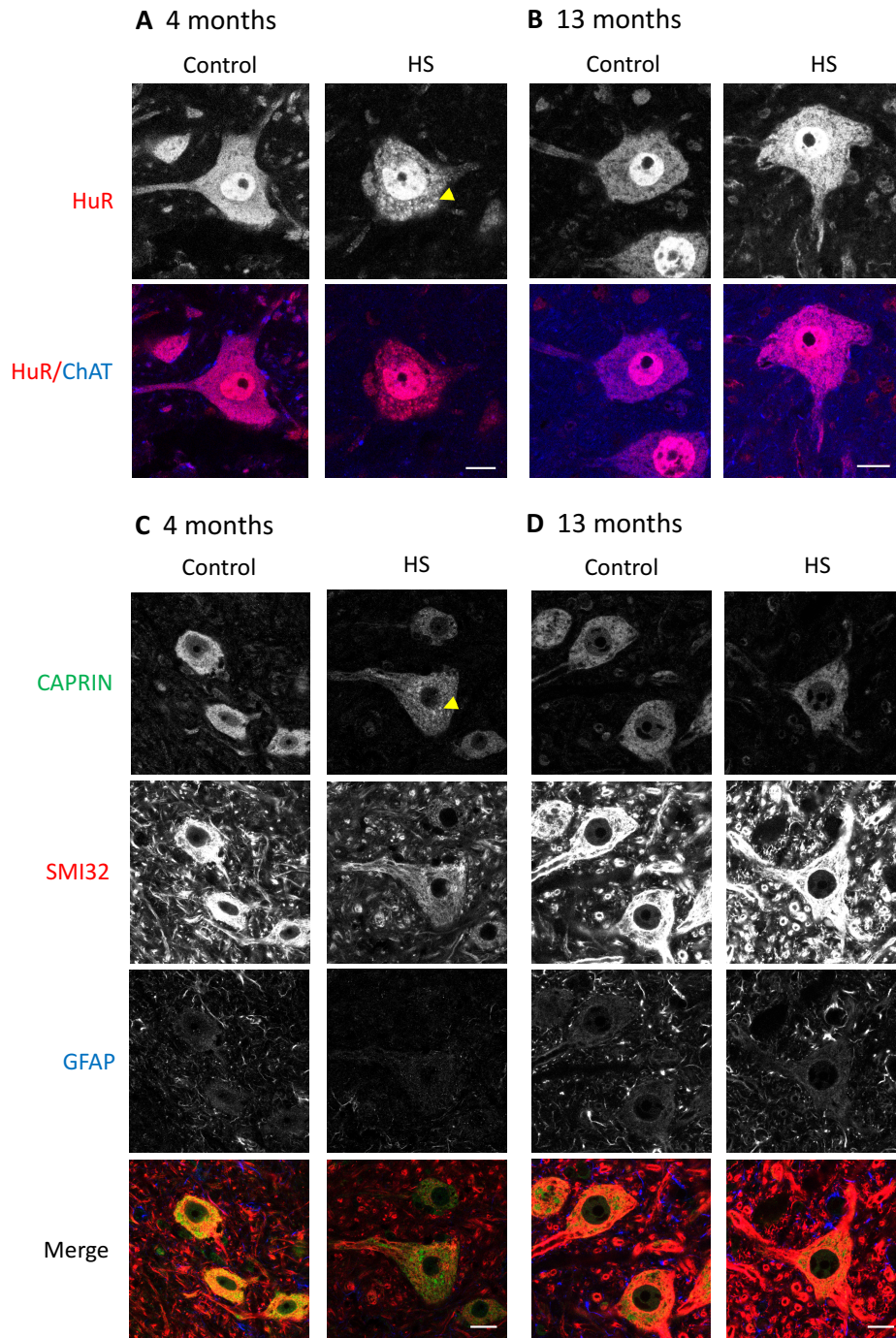
A 4 months



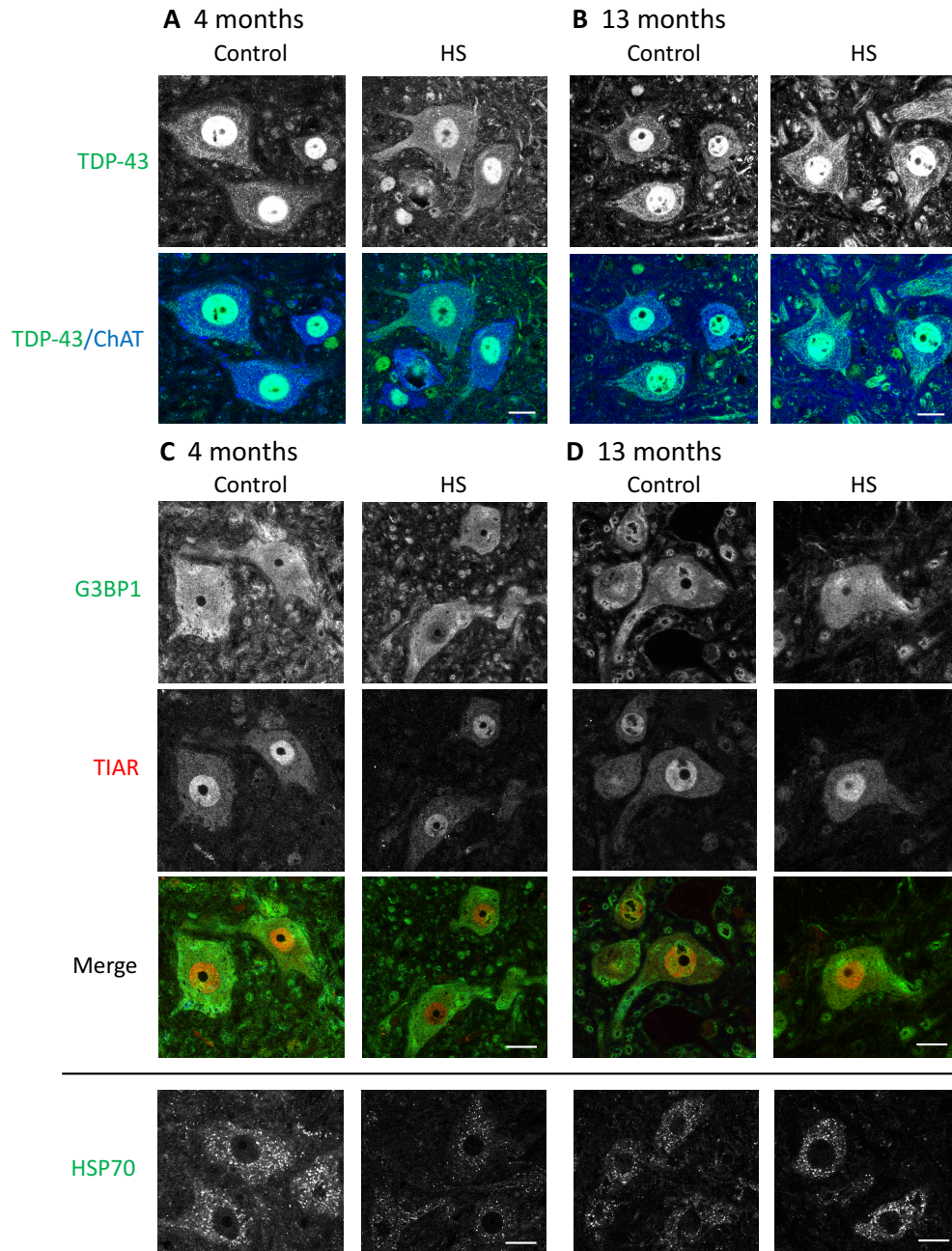
B 13 months



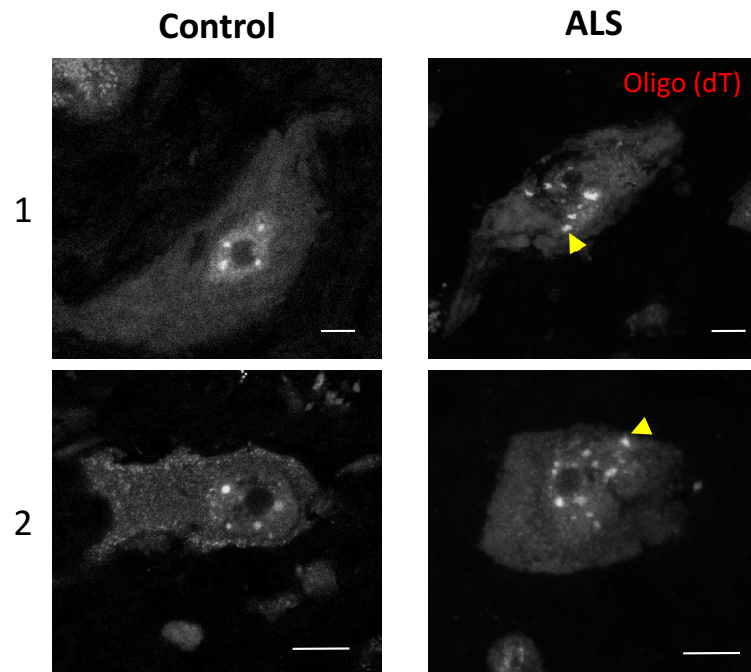
Khalfallah et al, Figure 3



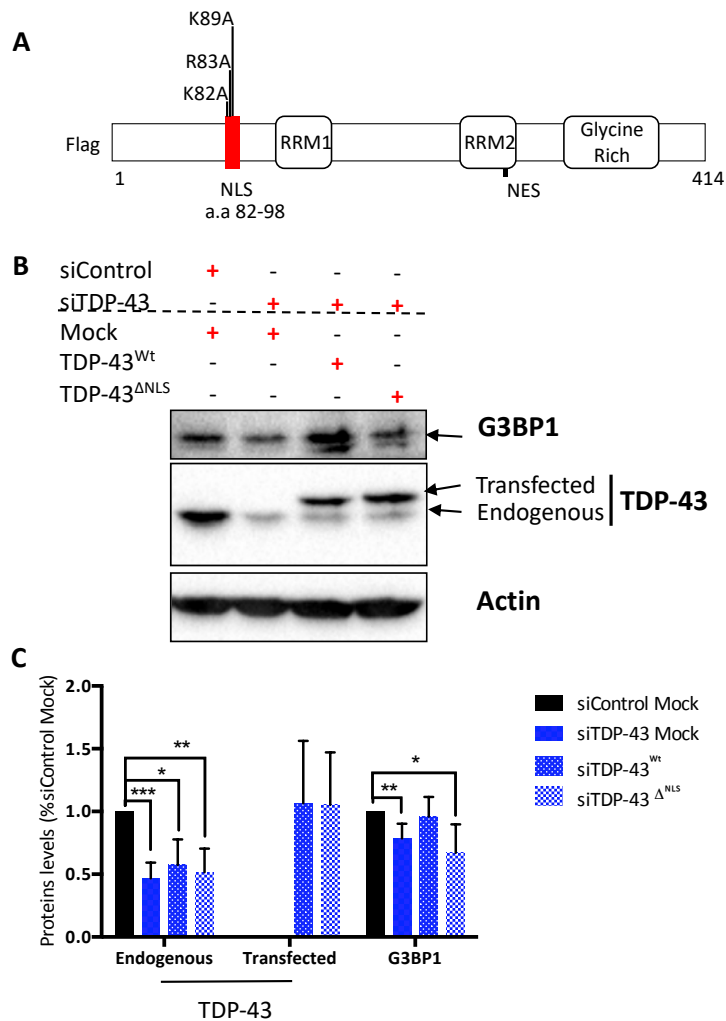
Khalfallah et al, Figure 4



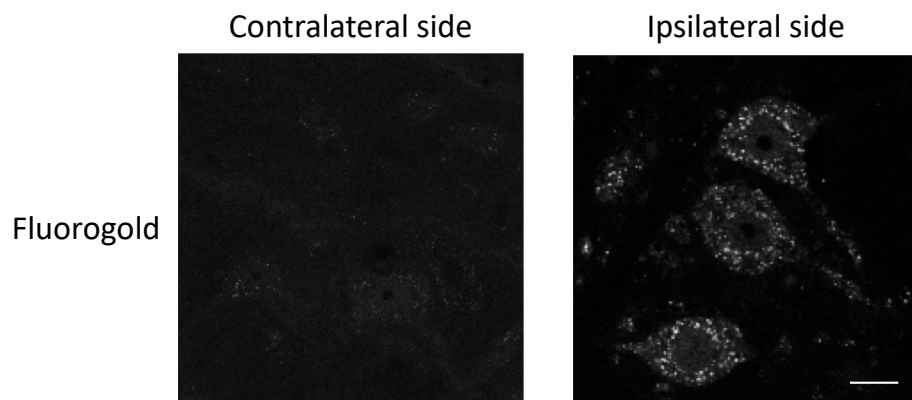
Khalfallah et al, Figure 5



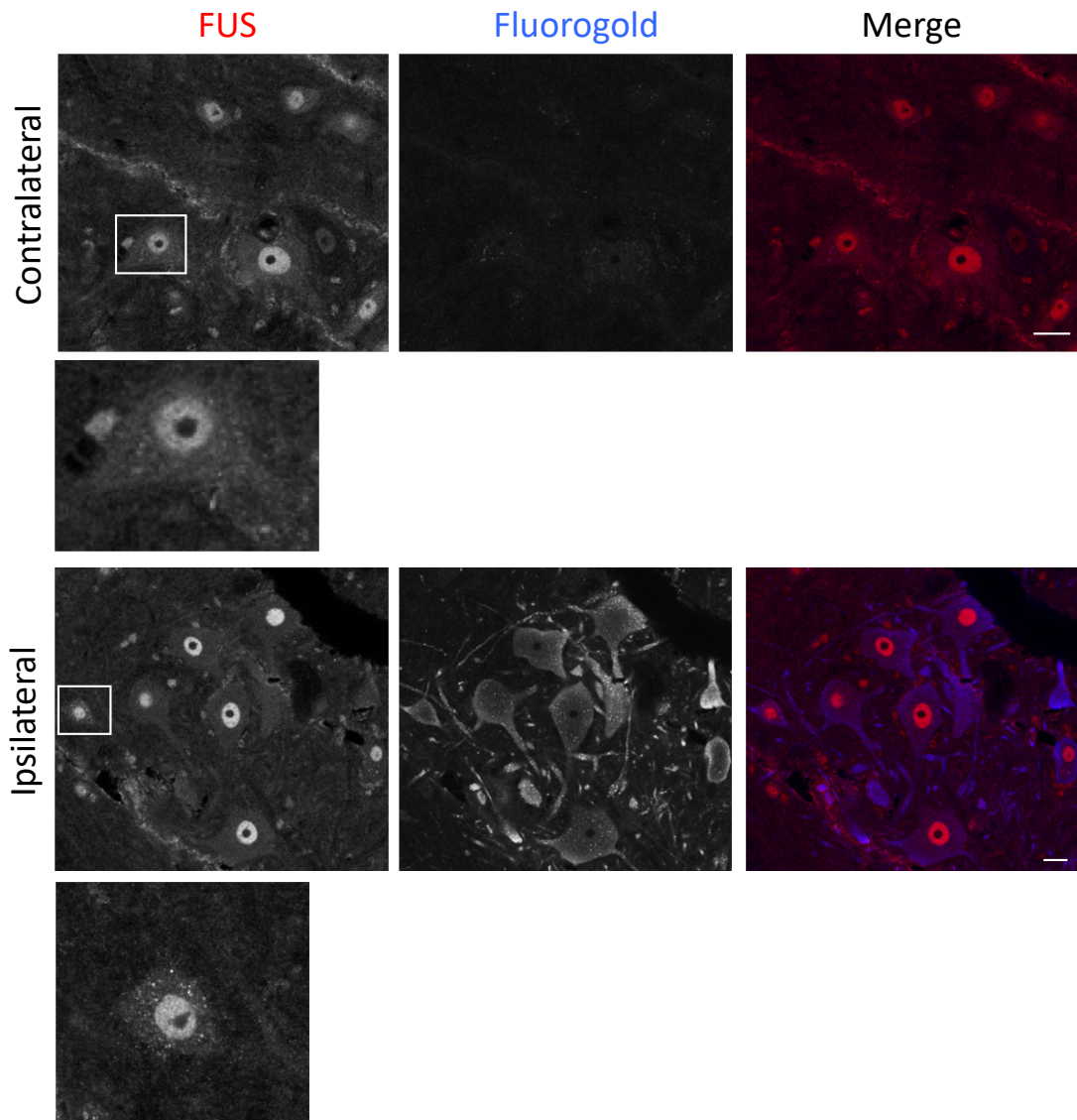
Khalfallah et al, Figure 6



Suppl. figure 1. Loss of nuclear TDP-43 induce depletion of G3BP1. A) Constructs with the localisation of the mutated NLS. B) Western blot of astrocytes depleted of endogenous TDP-43 and transfected with mock or Flag-TDP-43^{Wt}siRES or Flag-TDP-43^{ΔNLS}siRES cDNA. C) Quantification of protein levels of endogenous and transfected TDP-43, and G3BP1. n=5. Data is expressed compared to siControl Mock and as the mean± SEM; Unpaired t test *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005.



Suppl. figure 2. Fluorogold positifs injured motor neurons. Representative images of fluorogold positifs neurons in the ipsilateral side (right) and negatifs in the contralateral (left) from ventral horn spinal cord of axotomised mice. Scale bar, 10 μm .



Suppl. figure 3. FUS expression in fluorogold positifs injured motor neurons. Representative images of FUS expression (in red) in fluorogold (in blue) positifs neurons in the ipsilateral side and negatifs in the contralateral from ventral horn spinal cord of axotomized mice day 7. Scale bar, 10 μ m.

Case number	Sex	Age	Known mutation	Important characteristics
ALS 1	F	53	No	ALS with severe bulbar palsy.
ALS 2	M	80	No	ALS with upper limb muscle loss. Some episodes of hallucinations
ALS 3	M	60	No, but sister died of similar disease at age 58.	Multisystem degeneration. Atypical ALS with Parkinson disease, Cervical myelopathy with progressive symptoms
Ctrl 1: AB135	F	51		
Ctrl 2: AB169	M	55		
Ctrl 3: AB172	F	60		
Ctrl 4: AB200	M	61		

Khalfallah et al, Supplementary table 1

Chapitre 4: discussion générale

Le mécanisme par lequel une cellule meurt (c'est-à-dire l'apoptose, la nécrose ou la mort cellulaire autophagique) dépend de divers facteurs exogènes et endogènes, notamment, la capacité de la cellule à gérer le stress auquel elle est exposée. Les réponses au stress cellulaire font partie intégrante de la physiologie normale, soit pour assurer la survie de la cellule, soit pour éliminer les cellules endommagées ou indésirables. Plusieurs réactions de stress peuvent être distinguées, parmi lesquelles le choc thermique, les protéines mal repliées, des variations osmotiques, des infections virales et les réactions au stress oxydatif. En dépit des composantes de signalisation individuelles, ces différentes réponses au stress peuvent éventuellement alimenter des mécanismes effecteurs de mort cellulaire courants, si la cellule est incapable de faire face au stress. Le fait que le stress cellulaire déclenche ou non des programmes de mort cellulaire ou de survie cellulaire est déterminé par un ensemble de facteurs différents, parmi lesquels le stimulus de stress initial, le type de cellule et les facteurs environnementaux.

L'évolution des maladies neurodégénératives, telles que la SLA ou DFT, peut durer des décennies, avec l'accumulation de la perte neuronale entraînant une aggravation progressive des symptômes. Il existe des preuves substantielles et croissantes de l'activation des réponses au stress dans les neurones. Cela suggère que lorsque les neurones sont exposés au stress, ils se protègent en activant une réponse au stress ; telle que la formation de GSs. Cependant, dans un contexte pathologique, du au dérèglement de ces mécanismes protecteurs, les neurones incapables de faire face aux multiples stress dégénèrent tandis que la maladie progresse. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents est encore nécessaire afin de mettre au point des traitements dont la maladie est totalement dépourvue.

Dans cette thèse, j'ai examiné la réponse au stress au moyen de formation de GSs, d'une manière spécifique au type cellulaire ainsi qu'au type de stress. Je me suis attelé dans le cadre des protéinopathies de TDP-43, à dévoiler l'impact de la suppression de son expression ou sa délocalisation du noyau, sur la dynamique des GSs ainsi que l'expression de ses protéines résidentes *in vitro* et *in vivo*. Enfin la SLA et la DFT étant deux maladies neurodégénératives reliées à l'âge nous sommes intéressés à l'apport de ce facteur *in vitro* et *in vivo* dans le mécanisme de réponse au stress par la formation de GSs.

1. Les GSs présentent différentes caractéristiques suivant le type cellulaire

1.a. Différences morphologiques

Historiquement, de nombreuses études de GSs ont été réalisées sur différentes lignées cellulaires. Or très rapidement, il a été assumé que les caractéristiques des GSs peuvent différer suivant le type cellulaire^{178,196}. Bien que ces études soient informatives, les lignées de cellules immortalisées ne nous permettent pas de conclure quant aux mécanismes spécifiquement impliqués dans la mort ou la pathogénicité des cellules pertinentes à la SLA ou DFT. Dans le chapitre 2, nous avons utilisé comme modèles *in vitro* des cultures primaires murines de neurones moteurs et corticaux, principaux types cellulaires dégénérescents dans la SLA et DFT. Nous avons également utilisé des cultures primaires murines d'astrocytes, choisis pour leur implication dans les mécanismes pathologiques de « non-cell autonomous »³⁰, et possédant des inclusions de TDP-43 dans le tissu de patients^{36,37}, et enfin des MEFs comme cellules primaires de contrôle. L'induction de formation de GSs au moyen d'un stress oxydatif standard (0.5 mM SA, utilisé dans plus de 80% des études de GSs) dans ces cultures primaires nous ont montré des différences morphologiques. Les GSs formés dans les neurones sont arrondis autour du noyau tandis que les GSs sont plus nombreux et dispersés dans le cytoplasme des astrocytes

(chapitre 2, figure 1). Les GSs dans les MEFs sont drastiquement plus petits marquant ainsi une grande différence avec les cellules du SNC (chapitre 2, figure 1).

In vivo, un modèle d'induction de GSs chez les souris au moyen de choc thermique nous a permis, dans le chapitre 3, de valider la formation de GSs dans le cerveau et ME (chapitre 2, figure 2-4). Nous avons ainsi montré que les GSs avaient des morphologies différentes dans le cerveau et une taille réduite dans les neurones moteurs de la ME.

Nous suspectons que ces différences de tailles et morphologies traduisent un recrutement de différents composants aux GSs. Ces derniers étant à l'origine de signalisation particulière¹⁸¹, la réponse au stress peut être ainsi différente en aval.

1.b. Cinétiques différentes

La cinétique, suite au stress oxydatif, nous a montré un retard de formation des GSs dans les neurones. En effet, ce n'est qu'après 60 min de stress qu'on observe plus de 80% des cellules avec des granules cytoplasmiques (caractéristique de réponse au stress effective) comparés à seulement 30 min de stress nécessaires pour les astrocytes et les MEFs (chapitre 2, figure 2). Ces derniers manifestent un désassemblage très rapide des GSs après leur formation indiquant une réponse au stress très rapide de ces cellules souvent confrontées aux stimuli externes. Le retard à la formation des GSs dans les neurones est suivi par un désassemblage bien plus long en comparaison aux astrocytes ou même à ce qui a été observé précédemment dans la lignée de cellules humaines transformées HeLa¹⁴⁷. Ce retard n'étant pas dû à un stress prolongé (Annexe 1, figure 8) nous nous sommes intéressés aux hypothèses concernant les mécanismes de désassemblages des GSs. Des études appuyant une thèse de désassemblage par autophagie mettant en scène VCP, tout particulièrement, nous ont alertés^{213,217,266}. Nous avons étudié l'expression de VCP dans les différentes cultures (Annexe 2, figure 9), les neurones corticaux

l'expriment 50% moins que les astrocytes ou même les HeLa. La première étude a démontré que la déplétion de VCP entraîne une altération de formation des GSs²¹⁷, le même retard qu'on observe dans les neurones corticaux après 30 min de stress. La deuxième équipe observe suite à la suppression d'expression de VCP, des GSs persistants 2h après le désassemblage de ceux dans les cellules contrôles²¹³, semblable au résultat qu'on obtient avec les neurones corticaux. Il s'agit là d'un résultat très probant démontrant qu'une spécificité cellulaire serait à la base d'un mécanisme différent des GSs dans les neurones et conduirait en cas de dérégulation à un effet plus drastique chez les neurones que dans un autre type cellulaire. Curieusement, il y a un chevauchement significatif des maladies neurodégénératives causées par des mutations pathogènes dans VCP et de plusieurs gènes codant des composants des GSs, indiquant une forte interdépendance du contrôle de qualité protéique, l'homéostasie des GSs et l'avènement de la maladie^{10,243}.

1.c. Assemblage différé

Par la suite, les GSs ont été étudiées de plus près à différents points de la cinétique. En effet, après l'étape de nucléation, les nombreux petits GSs vont fusionner pour donner des GSs plus gros et moins nombreux¹⁸¹. Il s'agit de l'étape de l'agrégation secondaire ou de l'assemblage des GSs^{182,196,204-206}. Ce phénotype est observé dans le cadre des cellules HeLa entre 60 et 90 min¹⁴⁸. Dans les neurones moteurs et corticaux il faut 1h entre 60 et 120 min pour observer un changement significatif dans le nombre et la taille des GSs (Chapitre 2, figure 4). Les astrocytes aussi nécessitent 1h pour un assemblage effectif des GSs mais cet assemblage a lieu entre 30 et 90 min (Chapitre 2, figure 3). Ces différences prouvent encore une fois qu'on ne peut extrapoler totalement les résultats observés dans les lignées cellulaires aux risques de créer des artefacts dans les études.

2. Les GSs se forment différemment suivant le type de stress

On sait depuis longtemps que le stress oxydatif peut jouer un rôle important dans l'étiologie de diverses maladies neurodégénératives d'apparition tardive¹³. Cependant, le traitement mimant le stress oxydatif (SA) qui nous permet d'étudier efficacement les mécanismes des GSs peut sembler drastique et peu relié à la pathologie. Nous avons considéré dans notre étude d'autres stress plus pertinents pour la pathologie.

Des études épidémiologiques ont observé une incidence de la SLA anormalement élevée chez certains paysans²⁶⁷. Celle-ci serait due à la toxicité de certains pesticides à base d'organophosphates tels que le parathion²⁶⁸. J'ai ainsi testé son principe actif le paraoxon comme stress, et observé une possible induction de formation de GSs. Après une première expérience où j'ai pu observer des GSs dans le cytoplasme de neurones moteurs traités au paraoxon (données non montrées), le changement de lot du composé suivi par une discontinuité de ce dernier ne nous a pas permis de renouveler l'expérience et de conclure quant aux effets du paraoxon sur les neurones moteurs.

L'inflammation étant une composante importante dans les maladies neurodégénératives, nous nous sommes demandé si son activation pouvait induire une réponse au travers des GSs. De façon intéressante un traitement aux lipopolysaccharides (couramment utilisés pour induire des cascades de réponses inflammatoires) a induit la formation de GSs dans des cultures primaires de cellules microgliales (Annexe 5, figure 12) et non dans les cultures primaires d'astrocytes (Annexe 6, figure 13) malgré l'activation de la voie de signalisation de NF- κ B avec la translocation de p65 dans le noyau. Cette différence de réponse au stress entre les cellules microgliales et astrocytes est certainement due à l'activation de différentes cascades de

signalisation dans les deux types cellulaires, une étude a démontré l'existence de deux phenotypes de réponses face au traitement au LPS des cellules microgliales et astrocytes²⁶⁹.

Enfin, l'étude des GSs formés à la suite d'un stress hyperosmotique nous a paru justifiée dans le cas de la SLA. En effet, un possible déséquilibre de l'osmolarité de l'environnement peut être très déficient pour les neurones. Dans la SLA, les neurones moteurs de la ME et du tronc cérébral rétrécissent avant de mourir, une observation souvent effectuée dans le tissu *post mortem* de patients comparé aux contrôles^{270,271}. Les cellules du SNC responsables de l'osmorégulation sont les astrocytes. Dans une précédente étude la formation de GSs a été induite au moyen d'un traitement au sorbitol (0.4 M, pendant 1h) dans une culture mixte de cellules gliales¹⁸⁴. Or d'après la morphologie des cellules imagées, il s'agirait plus de cellules microgliales que d'astrocytes. Dans nos cultures d'astrocytes (pures à 80%), il nous a fallu 0.8 M de sorbitol afin d'activer la formation de GSs après 1h de traitement (Chapitre 2, figure 5). Ces granules formés sont très petits et nombreux dans le cytoplasme comparé à ceux formés par traitement au SA des astrocytes. Il est à noter que nos tentatives de traitements au sorbitol des neurones corticaux sont restés sans succès quant à la formation de GSs (Annexe 7, figure 14), nous démontrant encore une fois que la réponse au stress est spécifique au type cellulaire, chaque stress faisant appel à une machinerie différente.

Des études suggèrent que la composition des GSs varie selon différentes conditions de stress²⁷². Si on assume que la morphologie et taille des GSs est directement liée à leur composition, on peut dire que nos résultats valident les suggestions avancées dans le domaine.

3. TDP-43 régule les mécanismes des GSs

La PLA TDP-43 est la composante majeure des agrégats cytoplasmiques observés dans les neurones moteurs et cellules gliales de patients SLA et DFT^{35,36}. Comme évoqué dans le premier chapitre, le domaine est partagé quant aux conséquences des altérations d'expression

de TDP-43 s'il s'agit d'une perte ou gain de fonction de la protéine. Dans notre étude, nous avons choisi d'étudier la perte de fonction de TDP-43. En effet, sa disparition du noyau est un événement majeur quant à toutes ses fonctions nucléaires, de transport nucleocytoplasmique et de stabilité de l'ARNm.

3.a. TDP-43 régule la cinétique des GSs issus d'un stress oxydatif

Une première publication de notre laboratoire a démontré que la déplétion de TDP-43 altère la formation et le désassemblage des GSs dans les cellules HeLa¹⁴⁷. Dans notre modèle d'étude, la déplétion de TDP-43 ne semble pas induire d'altération de formation de GSs dans les neurones corticaux ou les astrocytes. Le désassemblage semble être accéléré dans les astrocytes, mais d'une manière plus modeste dans les neurones corticaux dépourvus de TDP-43. Les MEFs démontrent une dépendance en TDP-43 majeure dans leur cinétique de GSs (Chapitre 2, figure 2).

3.b. TDP-43 régule l'assemblage des GSs issus d'un stress oxydatif

L'agrégation secondaire à la formation des GSs, aussi appelée assemblage des GSs dans notre étude, permettrait de protéger les ARNm qui y sont stockés²⁰⁷. La déplétion de TDP-43 altère l'étape d'assemblage dans des lignées transformées¹⁴⁸. Nous avons pu confirmer que TDP-43 abolit l'assemblage des GSs dans des cultures primaires de neurones moteurs et corticaux ainsi que dans les astrocytes (Chapitre 2, figure 3 et 4). Cette étape semble donc jouer un rôle tout aussi important dans les neurones que dans les cellules gliales.

3.c. TDP-43 indispensable pour la formation des GSs aux suites d'un stress osmotique

Dans un premier temps, nous avons fait une cinétique du nombre d'astrocytes formant des GSs suite à une heure d'exposition au sorbitol 0.8 M. De manière imprévue, la capacité à

former des GSs dans les astrocytes dépourvus de TDP-43 a été inhibée (Chapitre 2, figure 5). En effet, seulement 20% des cellules traitées à l'ARNi contre TDP-43 présentent des GSs comparés à plus de 80% dans les cellules contrôles. Les GSs formés quand TDP-43 est déplété dans les astrocytes sont aussi significativement plus petits. Nos résultats sont en contradiction avec ce qui a été décrit dans une autre étude, où les investigateurs ont surexprimé TDP-43 mutant dans une lignée transformée (cellules Hek293T) et ont démontré une formation accrue de GSs, plus gros que dans les cellules où TDP-43 sauvage a été surexprimé¹⁸⁴. Cette différence peut s'expliquer certainement par la différence du type cellulaire, mais surtout par un possible artefact créé par la surexpression de TDP-43.

Ainsi au début de notre étude, nous avons entrepris de récapituler l'effet observé des différents mutants sur les composants de granules de stress. Une étude ayant démontré que des fibroblastes de patients ayant la mutation A315T présentaient une expression diminuée de G3BP1 24h après le stress. Nos tentatives pour récapituler ce résultat ont été vaines principalement dû à notre modèle de surexpression protéique avec la présence de l'endogène non muté de TDP-43 (Annexe 3, figure 10). En effet, l'autorégulation de TDP-43 entre endogène et exogène contribue certainement à l'hétérogénéité observée dans les résultats.

3.d. La déplétion de TDP-43 induit l'augmentation d'expression d'aquaporine 4

Compte tenu de l'impact dramatique que le manque de TDP-43 a sur la formation des GSs suite au déséquilibre osmotique, nous nous sommes penchés plus précisément sur les mécanismes permettant cette régulation. Les astrocytes peuvent être largement définis comme les cellules principalement responsables de l'homéostasie du SNC. Elles sont les seules cellules du SNC capables de subir des changements rapides de volume²⁷³⁻²⁷⁵. Cette

caractéristique couplée au fait qu'ils possèdent des canaux aquaporines leur permet de répondre passivement au stress osmotique. Une équipe a publié qu'à la différence des neurones, les astrocytes récupèrent mieux d'une brève agression ischémique dans les tranches corticales *in vivo*, probablement parce que leurs aquaporines facilitent l'efflux de l'eau²⁷⁴. Comme leur nom l'indique, les aquaporines (AQPs) sont des protéines qui s'assemblent sous forme de tétramères, ou plus grosses structures, dont la fonction est entre autre le transport de l'eau à travers la membrane plasmique des cellules^{276,277}. À ce jour, 13 types d'AQPs ont été caractérisés dans des cellules de mammifères; trois types, AQP1, AQP4 et AQP9, ont été confirmés dans le SNC²⁷⁸. L'AQP la plus abondante dans le SNC des mammifères est l'AQP4, principalement localisé aux extrémités des pieds astrocytaires^{279,280}. Son abondance dans la membrane plasmique des astrocytes semble être dynamique, affectée par l'osmolarité du milieu extracellulaire²⁸¹. Dans plusieurs conditions pathologiques, comme la maladie à prions Creutzfeldt-Jakob²⁸² ou maladies inflammatoires tels que la sclérose en plaques^{283,284}, des altérations de la distribution subcellulaire de l'AQP4 et de ses niveaux d'expression ont été rapportés dans les astrocytes. Des modèles animaux (rat et souris) de SLA exprimant des mutations de SOD1 (G93A) ont démontré l'augmentation d'expression d'AQP4^{285,286}. Cependant, jusqu'à présent aucune étude n'a relié l'expression d'AQP4 aux protéinopathies de TDP-43. Par western blot l'analyse de l'expression d'AQP4 dans les astrocytes déplétés de TDP-43 a démontrée une augmentation de son expression en moyenne de presque 2 fois celle des contrôles (Chapitre 2, figure 6). Sa localisation est elle aussi altérée puisque, par immunofluorescence, on observe une distribution d'AQP4 homogène dans le cytoplasme des cellules sans TDP-43 comparée à une localisation aux extrémités des pieds astrocytaires chez les contrôles. On s'est alors demandé si cette augmentation d'expression se traduisait par une augmentation des canaux membranaires. À notre grande surprise, quand l'expression de TDP-

43 est inhibée 50% des cellules ne présentent pas AQP4 à leur surface comparée aux contrôles. Ces résultats sont obtenus par cytométrie en flux. Ne comprenant pas comment l'augmentation d'expression d'AQP4 peut se traduire à une moindre présentation du canal en surface, nous avons envisagé la possibilité de l'augmentation d'agrégation de la protéine. En effet, dans certaines des immunofluorescences j'ai pu observer des agrégats cytoplasmiques d'AQP4 dans les astrocytes déplétés en TDP-43 (Annexe 8, figure 15). Au moyen de la technique de piège à filtre qui retient des particules de 200nm et plus, il n'a pas été possible d'observer de différence probante quant à une possible augmentation d'agrégation entre siTDP-43 et siControl. Ce résultat négatif ne nous permet cependant pas de conclure quant à la cause de l'absence d'AQP4 à la membrane. Ce défaut serait certainement dû à un dysfonctionnement des mécanismes d'ancrage du canal à la membrane, ou même l'inhibition de son transport dans des vésicules²⁸¹.

L'absence d'AQP4 en surface des cellules dépourvues de TDP-43, malgré l'augmentation de son expression, nous fournit cependant un élément de réponse concernant l'absence de formation des GSs. En effet, il est possible que les astrocytes soient peu ou pas sensibles au stress imposé par l'augmentation de l'osmolarité dans leur milieu. Ceci peut potentiellement avoir un effet néfaste sur les neurones à long terme étant donné que les osmorégulateurs n'effectuent pas leur rôle.

3.e. La déplétion nucléaire de TDP-43 affecte l'expression de G3BP1

TDP-43 régule plusieurs gènes. Elle a une action sur l'expression de G3BP1 *in vitro*. Des données préliminaires (le manuscrit sera prochainement soumis) dans notre laboratoire démontrent que TDP-43 se lie à l'ARNm de G3BP1 en 3'UTR et le stabilise. Sachant que G3BP1 est à l'origine de la dérégulation des mécanismes de GSs quand TDP-43 est déplété, nous avons tout d'abord voulu vérifier que la délocalisation de TDP-43 au cytoplasme avait le

même effet sur G3BP1 que lorsque TDP-43 est déplété par ARNi. Nous avons mis en place un modèle où TDP-43 endogène est déplété des cellules et remplacé par une expression semblable du sauvage TDP-43^{WT} ou mutant TDP-43^{ANLS} (précédemment caractérisé^{40,97}). Étant donné l'aspect possiblement toxique d'une double transfection pour les neurones nous avons choisi d'effectuer cette expérience dans une culture primaire d'astrocytes, cellules qui s'en approchent le plus en termes de dynamique des GSs. Le résultat a été positif, l'expression de G3BP1 a été diminuée de la même façon entre les astrocytes siTDP-43/Mock (vecteur vide) et ceux siTDP43/TDP-43^{ANLS} (Chapitre 3, Supp figure 3). Ceci prouve que TDP-43 perd sa fonction stabilisatrice de l'ARNm de G3BP1 quand elle se retrouve délocalisée au cytoplasme. Mais qu'en est-il de cette régulation *in vivo* ?

Nous avons utilisé un modèle d'axotomie du nerf sciatique chez la souris décrite auparavant par Moisse *et al*¹⁷⁷. Dans ce modèle, TDP-43 se retrouve délocalisé du noyau vers le cytoplasme suivant la blessure. Notre modèle a pu être validé par immunofluorescence (Chapitre 3, Supp figure 1), les neurones positivement sectionnés sont marqués positivement grâce au traceur retrograde FluoroGold. De plus, le score du comportement neurologique des souris (Chapitre 3, figure 1) démontre un score élevé au premier jour signe de paralysie du côté de la blessure. L'étude de l'expression de TDP-43 dans les neurones positifs au FluoroGold a démontré une baisse progressive du pool nucléaire de la protéine au cours des jours après blessure jusqu'au jour 7. Cette diminution de TDP-43 est accompagnée de la perte corrélée de G3BP1 (Chapitre 3, figure 1). Nous avons remarqué que le niveau d'expression de G3BP1 baisse de 70% lorsque le niveau de TDP-43 atteint 50% celui du contrôle (Chapitre 3, figure 1E). Ce résultat très intéressant démontre un effet de dose dépendant à TDP-43 nucléaire. Il est à noter, que ce phénomène semble être spécifique à TDP-43 puisque FUS, une autre PLA, ne montre pas le même pattern dans les neurones sectionnés (Chapitre 3, Supp figure 2). Il s'agit

de la première démonstration *in vivo* de la perte de cette fonction régulatrice de TDP-43. Notre modèle a cependant différé de celui publié par l'équipe de Moisse *et al*¹⁷⁷. En effet, au lieu d'être délocalisé au cytoplasme TDP-43 a été déplété du noyau sans augmenter le pool cytoplasmique de la protéine. Cette différence est très certainement due à l'endroit où a été effectuée la section des nerfs. En effet, techniquement nous avons été dans l'incapacité d'effectuer une section proximale, comme celle de l'étude. Elle consiste en la section des nerfs aussi proche de la ME que possible, au niveau des lombaires (L3-5). Nous avons donc choisi d'effectuer une section médiale qui consiste en la section du nerf sciatique juste à la sortie de la hanche. Ce résultat soulève possiblement une différence de réponse suivant l'endroit de la blessure. Une autre étude où les investigateurs ont effectué une ligation du nerf hypoglossal au niveau de la joue de la souris montre des résultats plus proche concernant la déplétion nucléaire de TDP-43 que ceux que nous avons observés dans notre étude²⁸⁷.

4. L'âge, facteur important dans la dérégulation des mécanismes de GSs

4.a. Le vieillissement *in vitro* altère l'assemblage des GSs

L'hypothèse que les réponses cellulaires au stress aberrantes sont étroitement liées à de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la SLA ou DFT implique que la dérégulation de la réponse au stress soit liée à l'âge étant donné son aspect très prééminent dans ces maladies. Dans notre étude nous nous sommes tout particulièrement intéressés à comment l'âge peut altérer la dynamique des GSs tout d'abord *in vitro*. Nous avons utilisé le modèle de vieillissement neuronal *in vitro* qui a été décrit par Lesuisse *et al*²⁸⁸ et qui nous permet de conserver nos cultures de neurones moteurs et corticaux sans toxicité visible pendant plusieurs semaines. Le mécanisme de formation des GSs n'a pas semblé être altéré dans les neurones « vieillis » comparés aux neurones « jeunes ». Cependant, l'assemblage des GSs a été inhibé

dans les neurones « vieilliss » (Chapitre 2, figure 7). Cette altération a été accompagnée par une baisse d'expression de près de 30% de TDP-43 dans les neurones corticaux « vieilliss ». L'âge a un impact négatif sur la dynamique des GSs ce qui supporte davantage notre hypothèse de lien entre la réponse au stress aberrante et l'avènement de la SLA.

4.b. Le vieillissement *in vivo* altère la formation des GSs

Il n'existe pas beaucoup de modèles d'étude de GSs *in vivo*. Dû à leur aspect dynamique les GSs ont longtemps été crues des artéfacts d'étude *in vitro*. Basés sur un modèle publié récemment²³⁰ nous avons réussi à induire des granules d'ARNm suite à un choc thermique (CT) dans les neurones de différentes régions du cerveau (Chapitre 3, figure 2) et les neurones moteurs de la ME. Près de 100% des neurones moteurs observés (Chapitre 3, figure 3) présentent ces granules contenant de l'ARNm. L'étude par immunofluorescence de protéines résidentes des GSs comme HuR et Caprin1 a démontré leur présence dans des granules cytoplasmiques, semblables aux granules à ARNm, (Chapitre 3, figure 4) contrairement aux contrôles sans CT. Ceci nous conforte, dans la pensée qu'il s'agit bel et bien de formation de GSs suite au CT. D'autres composantes des GSs comme G3BP1 et TIAR n'ont pas été observés dans des granules cytoplasmiques suite au CT (Chapitre 3, figure 5) contrairement ce que montre une précédente publication²³¹. Le mécanisme de recrutement spécifique des protéines aux GSs est encore mal connu. Nos résultats *in vivo* supportent celles d'une précédente étude, qui a démontré *in vitro* que l'excès d'ARNm cytoplasmique énuclée les GSs en forçant le recrutement des PLA nucléaires au cytoplasme pour stabiliser ces ARNm¹⁹⁹. Ces derniers seraient les premières recrutées pour la formation des GSs.

Après validation de notre modèle, nous avons voulu observer cette induction dans les souris âgées (13 mois). À notre surprise, les souris âgées ne semblent former aucun granule

cytoplasmique suite au stress comparativement aux contrôles (Chapitre 3, figure 3). L'étude du niveau protéique de TDP-43 ne nous révèle pas de différence, mis à part un aspect filamentueux pour le pool cytoplasmique de la protéine (Chapitre 3, figure 5). Ce résultat n'était pas celui attendu par rapport aux résultats *in vitro* dans les neurones. Il peut toutefois, s'expliquer par le fait qu'il ne s'agit pas du même stress. En effet, il existe des différences avérées entre un stress oxydatif et un stress de CT. De plus, l'extrapolation entre un vieillissement *in vitro* et *in vivo* est difficile à réaliser dû au fait que les neurones *in vivo* possèdent des systèmes de support grâce aux cellules gliales et autres voisins qu'on ne peut remplacer *in vitro* avec les meilleurs suppléments. Le défaut de formation *in vivo* dans les vieilles souris est tout de même très intéressant considérant qu'il a été précédemment publié qu'un pré conditionnement au stress induit un défaut de formation des GSs²³¹. Ce modèle nous a permis une première étude des GSs *in vivo*. Le CT ne semble pas être le stress le plus pertinent dans le cadre de la SLA, sachant que d'après notre deuxième chapitre, que le mécanisme des GSs diffère suivant le type de stress il sera important de mettre au point d'autres stress pour les futures études.

5. Granules d'ARNm ou inclusions pathologiques ?

Comme indiqué à plusieurs reprises, le marqueur commun entre la SLA et DFT est la formation d'inclusions cytoplasmiques dans les neurones et cellules gliales des patients^{35,36}. Ces inclusions ont pendant longtemps été liées aux GSs. Des études ont révélé une colocalisation de protéines des GSs dans ces inclusions. Or il existe plusieurs caractéristiques afin de déterminer qu'une inclusion cytoplasmique est un GSs tels que défini par Kedersha *et al*¹⁸¹. L'une d'entre elles est la présence d'ARNm. Par technique d'hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde oligo(dT), qui reconnaît la queue polyadénylée des ARNm, nous avons marqué le tissu de ME de patients SLA ainsi que des contrôles. Ces marquages nous ont révélé la présence de granules d'ARNm cytoplasmiques, semblant absents des contrôles (Chapitre 3, figure 6). Des limitations

techniques, notamment la combinaison d'un protocole de FISH et d'immunofluorescence sur tissu, nous ont cependant empêchés de valider une possible colocalisation entre ces granules et TDP-43 ou d'autres protéines des GSs. Aucun historique génétique n'est connu pour les patients étudiés (Chapitre 3, Supp table 1). Ce résultat est à prendre avec précaution car des études supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre la présence de ces granules à ARNm et leur relation possible avec la pathologie de TDP-43. En effet, nous avons seulement pu étudier le tissu de trois patients différents, il s'agirait donc d'augmenter la taille de la cohorte de notre étude.

6. Conclusion et perspectives

Les résultats de cette étude approfondissent notre compréhension de la connexion entre la voie de stress clé avec la formation et l'assemblage des GSs, à l'intersection entre les protéines et les altérations du métabolisme de l'ARNm, avec l'âge dans la SLA. Les dysfonctionnements des GSs sont critiques, car ils pourront compromettre à terme la stabilité de l'ARNm lors du stress ce qui contribuerait à la mort cellulaire. La SLA et la DFT sont un spectre pathologique lourdement associé avec le métabolisme d'ARN.

Dans la majorité des cas, le dysfonctionnement des GSs est le résultat de fonctions de PLA perturbées, comme présenté dans notre publication. Nous avons pu démontrer un effet dose dépendant des niveaux de TDP-43 nucléaire sur la régulation de G3BP1 possiblement de grande importance dans le contexte de la pathologie.

Il est à noter que notre étude s'est principalement focalisée sur la perte de fonctions nucléaire de TDP-43 causée par sa délocalisation au cytoplasme dans le cas des inclusions pathologiques présentes dans 97% des cas de SLA. L'effet des mutations sur le gène de TDP-

43 ou même son gain de fonction cytoplasmique sur le mécanisme des GSs nécessitent eux aussi un intérêt, ils seront au centre d'une autre étude dans le laboratoire.

Concernant des perspectives immédiates, plusieurs expérimentations sont souhaitables. Premièrement, il faudrait vérifier l'impact de la délocalisation de TDP-43 au cytoplasme sur la formation de GSs *in vivo*. Hypothétiquement, comme la perte de TDP-43 nucléaire suite à l'axotomie entraîne une perte de G3BP1, et vraisemblablement, la dynamique des GSs serait altérée, sachant que les GSs sont importants pour la survie des cellules, il serait intéressant d'étudier les effets sur la viabilité des neurones moteurs suite au stress dans ce modèle. Un autre modèle de délocalisation de TDP-43 au cytoplasme existe, il s'agit des souris transgéniques à induction restreinte au cerveau, ayant une mutation au sein du domaine SNL de TDP-43²⁸⁹. Il serait intéressant de pouvoir induire un stress dans ces souris, et ce, avant et après induction de TDP-43 cytoplasmique et étudier la dynamique des GSs. Deuxièmement, nous avons évoqués à plusieurs reprises l'hypothèse de multiples facteurs et multiples stress contribuant à la maladie, la possibilité d'effectuer plusieurs expositions au même, ou à différents, stress *in vivo* nous permettrait de trouver des éléments de réponses. Il serait impératif de mettre au point un stress plus pertinent à la SLA, comme des traumatismes crâniens, pour l'étude de formation de GSs *in vivo*. Enfin, nous devons améliorer nos techniques afin de pouvoir mieux étudier les agrégats observés dans les tissus de patients.

Cette étude ouvre une nouvelle perspective dans le domaine, offrant une vue intégrative du réseau homéostatique des ARNm et des protéines qui converge vers la génération et régulation des GSs. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents devrait nous permettre d'interférer avec ces processus, par exemple pour faire passer une réponse aberrante de la mort cellulaire à des programmes de survie. L'aspect protecteur des GSs appelle à la recherche de cibles et développement de thérapies indépendantes de l'inhibition de

leur formation, ce qui est développé présentement dans le domaine. De nouvelles informations sur la base mécanique des réponses au stress sont nécessaires et présenteront donc un grand potentiel de découverte de biomarqueurs d'altérations de ces mécanismes dans la SLA.

En outre, des études supplémentaires augmenteraient notre savoir sur l'avènement des agrégats liés à la maladie, et permettraient de déterminer leur rôle, possible pathogéniques ou protecteurs.

Une étude rapporte un effet thérapeutique possiblement bénéfique de l'inhibition de formation des GSs, sur la suppression des agrégats pathologiques ²⁵¹. Cette étude utilise un modèle de sur expression de mutants de TDP-43 dans des lignées cellulaires transformés et démontre que la protéine est présente aux GSs suite au stress, or comme présenté précédemment TDP-43 peut être recrutée aux GSs de manière physiologique. Aussi il n'existe à ce jour aucune preuve que les agrégats observés de TDP-43 chez les patients sont soit toxiques soit dérivant des GSs.

En conclusion, nous prévoyons que les stratégies proposées pour identifier les différences spécifiques aux types de cellules peuvent aider à prédire des cibles de médicaments plus pertinents que l'inhibition totale d'un mécanisme de réponse au stress prouvé bénéfique à la cellule. Nos résultats pourront ainsi bénéficier à la fois à la recherche fondamentale et la recherche translationnelle.

Bibliographic

1. Pandey, S., Singh, B., Yadav, S. K. & Mahdi, A. A. Novel biomarker for neurodegenerative diseases- motor neuron disease (MND), cerebellar ataxia (CA) and Parkinson's disease (PD). *Clin. Chim. Acta* **485**, 258–261 (2018).
2. Kontis, V. *et al.* Future life expectancy in 35 industrialised countries: projections with a Bayesian model ensemble. *Lancet* **389**, 1323–1335 (2017).
3. Xie, S. X. *et al.* Building an integrated neurodegenerative disease database at an academic health center. *Alzheimers. Dement.* **7**, e84-93 (2011).
4. Logroscino, G. *et al.* Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. doi:10.1136/jnnp.2006.104828
5. Chancellor, A. M. & Warlow, C. P. Adult onset motor neuron disease: worldwide mortality, incidence and distribution since 1950. *Neurosurgery, and Psychiatry* **55**, 1106–1115 (1992).
6. Logroscino, G. *et al.* Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. doi:10.1136/jnnp.2009.183525
7. Mitchell, J. & Borasio, G. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* **369**, 2031–2041 (2007).
8. Govoni, V. *et al.* Temporal trend of amyotrophic lateral sclerosis incidence in southern Europe: a population study in the health district of Ferrara, Italy. *J. Neurol.* **259**, 1623–1631 (2012).
9. Doi, Y., Atsuta, N., Sobue, G., Morita, M. & Nakano, I. Prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *J. Epidemiol.* **24**, 494–9 (2014).
10. Taylor, J. P., Brown, R. H. & Cleveland, D. W. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* **539**, 197–206 (2016).
11. Swinnen, B. & Robberecht, W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. | Neurol.* **10**, 661–670 (2014).
12. Turner, M. R. *et al.* Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet. Neurol.* **12**, 310–22 (2013).
13. Flynn, J. M. & Melov, S. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.* **62**, 4–12 (2013).
14. Al-Chalabi, A. & Hardiman, O. NATURE REVIEWS | NEUROLOGY The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat. Rev. Neurol* **9**, 617–628 (2013).
15. Renton, A. E., Chiò, A. & Traynor, B. J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* **17**, 17–23 (2014).
16. Rosen, D. R. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59–62 (1993).
17. Kwiatkowski, T. J. *et al.* Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **323**, 1205–8 (2009).
18. Vance, C. *et al.* Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* **323**, 1208–1211 (2009).
19. Jemeen Sreedharan, Ian P. Blair, Vineeta B. Tripathi, Xun Hu, Caroline Vance, Boris Rogelj, Steven Ackerley, Jennifer C. Durnall, Kelly L. Williams, Emanuele Buratti, Francisco Baralle, Jacqueline de Bellerocche, J. Douglas, C. E. S. TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Jemeen. *Science (80-.)*. **314**, 130–133 (2006).
20. Hosler, B. A. *et al.* Linkage of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis With Frontotemporal Dementia to Chromosome 9q21-q22. *JAMA* **284**, 1664 (2000).

21. Renton, A. E. *et al.* A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* **72**, 257–68 (2011).
22. DeJesus-Hernandez, M. *et al.* Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in non-coding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* **72**, 245–256 (2011).
23. Johnson, J. O. *et al.* Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* **68**, 857–64 (2010).
24. Maruyama, H. *et al.* Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **465**, 223–226 (2010).
25. Deng, H.-X. *et al.* Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult onset ALS and ALS/dementia. *Nature* **477**, 211–215
26. Kim, H. J. *et al.* Prion-like domain mutations in hnRNPs cause multisystem proteinopathy and ALS. *NIH public access* **495**, 467–473 (2013).
27. Johnson, J. O. *et al.* Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* **17**, 664–666 (2014).
28. Leigh, P. N. *et al.* Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease. *Neurosci. Lett.* **93**, 197–203 (1988).
29. Gurney, M. E. *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772–5 (1994).
30. Boillée, S., Vande Velde, C. & Cleveland, D. W. ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron* **52**, 39–59 (2006).
31. Hetz, C. *et al.* XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev.* **23**, 2294–306 (2009).
32. Ilieva, E. V. *et al.* Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **130**, 3111–3123 (2007).
33. Atkin, J. D. *et al.* Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **30**, 400–407 (2008).
34. Kikuchi, H. *et al.* Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 6025–30 (2006).
35. Neumann, M. *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (80-.)*. **314**, 130–133 (2006).
36. 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).
37. Zhang, H. *et al.* TDP-43-immunoreactive neuronal and glial inclusions in the neostriatum in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. *Acta Neuropathol.* **115**, 115–122 (2007).
38. Wakabayashi, K. *et al.* Ubiquitinated neuronal inclusions in the neostriatum in patients with amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia--a study of 60 patients 31 to 87 years of age. *Clin. Neuropathol.* **20**, 47–52 (2001).
39. Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. TDP-43 and FUS/TLS: Emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 46–64 (2010).
40. Deshaies, J.-E. *et al.* TDP-43 regulates the alternative splicing of hnRNP A1 to yield an aggregation-prone variant in amyotrophic lateral sclerosis. (2018).

doi:10.1093/brain/awy062

41. Chabot, B. & Shkreta, L. Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *J. Cell Biol.* **212**, 13–27 (2016).
42. Zhou, Y., Liu, S., Liu, G., Öztürk, A. & Hicks, G. G. ALS-Associated FUS Mutations Result in Compromised FUS Alternative Splicing and Autoregulation. *PLoS Genet.* **9**, (2013).
43. Buratti, E. *et al.* TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J. Biol. Chem.* **280**, 37572–84 (2005).
44. Arnold, E. S. *et al.* ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E736–45 (2013).
45. Hirokawa, N. mRNA Transport in Dendrites: RNA Granules, Motors, and Tracks. *J. Neurosci.* **26**, 7139–7142 (2006).
46. Al-Chalabi, A. *et al.* Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 157–64 (1999).
47. Figlewicz, D. A. *et al.* Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 1757–61 (1994).
48. Wu, C.-H. *et al.* Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **488**, 499–503 (2012).
49. Fratta, P. *et al.* Profilin1 E117G is a moderate risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **85**, 506–8 (2014).
50. Ingre, C. *et al.* A novel phosphorylation site mutation in profilin 1 revealed in a large screen of US, Nordic, and German amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia cohorts. *Neurobiol. Aging* **34**, 1708.e1–6 (2013).
51. Tiloca, C. *et al.* Screening of the PFN1 gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in frontotemporal dementia. *Neurobiol. Aging* **34**, 1517.e9–1517.e10 (2013).
52. Daoud, H. *et al.* Mutation analysis of PFN1 in familial amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol. Aging* **34**, 1311.e1–2 (2013).
53. Laird, F. M. *et al.* Motor neuron disease occurring in a mutant dynactin mouse model is characterized by defects in vesicular trafficking. *J. Neurosci.* **28**, 1997–2005 (2008).
54. Freibaum, B. D. *et al.* GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature* **525**, 129–133 (2015).
55. Jovičić, A. *et al.* Modifiers of C9orf72 dipeptide repeat toxicity connect nucleocytoplasmic transport defects to FTD/ALS. *Nat. Neurosci.* **18**, 1226–9 (2015).
56. Zhang, K. *et al.* The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature* **525**, 56–61 (2015).
57. Chou, C. C. *et al.* TDP-43 pathology disrupts nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic transport in ALS/FTD. *Nat. Neurosci.* **21**, 228–239 (2018).
58. Woerner, A. C. *et al.* Cytoplasmic protein aggregates interfere with nucleocytoplasmic transport of protein and RNA. *Science (80-.)*. **351**, 173–176 (2016).
59. Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A. I., Martin, L. J. & Kuncl, R. W. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **38**, 73–84 (1995).
60. Fray, A. E. *et al.* The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 2481–2489 (1998).

61. Pramatarova, A., Laganière, J., Roussel, J., Brisebois, K. & Rouleau, G. A. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J. Neurosci.* **21**, 3369–74 (2001).
62. Jaarsma, D., Teuling, E., Haasdijk, E. D., De Zeeuw, C. I. & Hoogenraad, C. C. Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase Is Sufficient to Induce Amyotrophic Lateral Sclerosis in Transgenic Mice. *J. Neurosci.* **28**, 2075–2088 (2008).
63. Yamanaka, K. *et al.* Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* **11**, 251–3 (2008).
64. Yamanaka, K. *et al.* Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7594–9 (2008).
65. Boillée, S. *et al.* Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* **312**, 1389–92 (2006).
66. Meyer, K. *et al.* Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 829–32 (2014).
67. Rojas, F., Cortes, N., Abarzua, S., Dyrda, A. & van Zundert, B. Astrocytes expressing mutant SOD1 and TDP43 trigger motoneuron death that is mediated via sodium channels and nitroxidative stress. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 24 (2014).
68. Tong, J. *et al.* Expression of ALS-linked TDP-43 mutant in astrocytes causes non-cell-autonomous motor neuron death in rats. *EMBO J.* **32**, 1–10 (2013).
69. 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. U. S. A.* **110**, 4697–702 (2013).
70. Ditsworth, D. *et al.* Mutant TDP-43 within motor neurons drives disease onset but not progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **133**, 907–922 (2017).
71. Yang, C. *et al.* Partial loss of TDP-43 function causes phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E1121–E1129 (2014).
72. Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. The seeds of neurodegeneration: Prion-like spreading in ALS. *Cell* **147**, 498–508 (2011).
73. Johnson, J. K. *et al.* Frontotemporal Lobar Degeneration. *Arch. Neurol.* **62**, 925–930 (2005).
74. Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K., Hodges, J. R. & Rocca, W. A. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* **58**, 1615–21 (2002).
75. Harvey, R. J., Skelton-Robinson, M. & Rossor, M. N. The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **74**, 1206–9 (2003).
76. Mercy, L., Hodges, J. R., Dawson, K., Barker, R. A. & Brayne, C. Incidence of early-onset dementias in Cambridgeshire, United Kingdom. *Neurology* **71**, 1496–9 (2008).
77. Knopman, D. S., Petersen, R. C., Edland, S. D., Cha, R. H. & Rocca, W. A. The incidence of frontotemporal lobar degeneration in Rochester, Minnesota, 1990 through 1994. *Neurology* **62**, 506–8 (2004).
78. McKhann, G. M. *et al.* Clinical and Pathological Diagnosis of Frontotemporal Dementia. *Arch. Neurol.* **58**, 1803 (2001).
79. Urwin, H. *et al.* FUS pathology defines the majority of tau- and TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol.* **120**, 33–41 (2010).
80. Mackenzie, I. R. A. *et al.* Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of

- frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol.* **119**, 1–4 (2010).
81. Neumann, M. *et al.* A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* **132**, 2922–2931 (2009).
 82. Rohrer, J. D. *et al.* The heritability and genetics of frontotemporal lobar degeneration. (2009).
 83. Hutton, M. *et al.* Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* **393**, 702–5 (1998).
 84. Baker, M. *et al.* Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* **442**, 916–919 (2006).
 85. Skibinski, G. *et al.* Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat. Genet.* **2005** 378 **37**, 806 (2005).
 86. Schröder, R. *et al.* Mutant valosin-containing protein causes a novel type of frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* **57**, 457–461 (2005).
 87. Lomen-Hoerth, C. *et al.* Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal? *Neurology* **60**, 1094–7 (2003).
 88. Ringholz, G. M. *et al.* Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* **65**, 586–90 (2005).
 89. Burrell, J. R., Kiernan, M. C., Vucic, S. & Hodges, J. R. Motor Neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain* **134**, 2582–2594 (2011).
 90. Lomen-Hoerth, C., Anderson, T. & Miller, B. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* **59**, 1077–9 (2002).
 91. Gijssels, I. *et al.* A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *Lancet. Neurol.* **11**, 54–65 (2012).
 92. Ou, S.-H. I. *et al.* Cloning and Characterization of a Novel Cellular Protein, TDP-43, That Binds to Human Immunodeficiency Virus Type 1 TAR DNA Sequence Motifs. *JOURNAL OF VIROLOGY* **69**, (1995).
 93. Buratti, E. & Baralle, F. E. Characterization and Functional Implications of the RNA Binding Properties of Nuclear Factor TDP-43, a Novel Splicing Regulator of CFTR Exon 9. *J. Biol. Chem.* **276**, 36337–36343 (2001).
 94. Buratti, E. *et al.* Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping.
 95. 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).
 96. Kabashi, E. *et al.* TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* **40**, 572–574 (2008).
 97. 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**, 13302–9 (2008).
 98. Sreedharan, J. *et al.* TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science (80-.)*. **319**, 1668–1672 (2008).
 99. Gitcho, M. A. *et al.* TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann. Neurol.* **63**, 535–538 (2008).
 100. Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Piiol-Roma, S. & Burd, C. G. *hnRNP PROTEINS AND THE BIOGENESIS OF mRNA*. (1993).
 101. 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).

102. Gitler, A. D. & Shorter, J. RNA-binding proteins with prion-like domains in ALS and FTLD-U. *Prion* **5**, 179–87 (2011).
103. Kato, M. *et al.* Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. *Cell* **149**, 753–767 (2012).
104. King, O. D., Gitler, A. D. & Shorter, J. The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. *Brain Res.* **1462**, 61–80 (2012).
105. D’Ambrogio, A. *et al.* Functional mapping of the interaction between TDP-43 and hnRNP A2 in vivo. *Nucleic Acids Res.* **37**, 4116–4126 (2009).
106. Wegorzewska, I., Bell, S., Cairns, N. J., Miller, T. M. & Baloh, R. H. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18809–14 (2009).
107. Budini, M., Romano, V., Quadri, Z., Buratti, E. & Baralle, F. E. TDP-43 loss of cellular function through aggregation requires additional structural determinants beyond its C-terminal Q/N prion-like domain. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 9–20 (2015).
108. Johnson, B. S. *et al.* TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity. *J. Biol. Chem.* **284**, 20329–39 (2009).
109. Ayala, Y. M. *et al.* Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J. Cell Sci.* **121**, 3778–85 (2008).
110. Ederle, H. *et al.* Nuclear egress of TDP-43 and FUS occurs independently of Exportin-1/CRM1. 1–18 (2018). doi:10.1038/s41598-018-25007-5
111. Pinarbasi, E. S. *et al.* Active nuclear import and passive nuclear export are the primary determinants of TDP-43 localization. *Sci. Rep.* 1–16 (2018). doi:10.1038/s41598-018-25008-4
112. Busch, A. & Hertel, K. J. Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **3**, 1–12 (2012).
113. Ling, S. C., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Converging mechanisms in als and FTD: Disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* **79**, 416–438 (2013).
114. Sephton, C. F. *et al.* Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes. *J. Biol. Chem.* **286**, 1204–15 (2011).
115. 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**, 15635–47 (2012).
116. Tollervey, J. R. *et al.* Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat. Neurosci.* **14**, 452–8 (2011).
117. 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).
118. Ling, S.-C. *et al.* ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 13318–23 (2010).
119. Black, D. L. Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 291–336 (2003).
120. Ayala, Y. M. *et al.* TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J.* **30**, 277–288 (2010).
121. Chekulaeva, M. & Filipowicz, W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 452–460 (2009).
122. Kawahara, Y. & Mieda-Sato, A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component

- of the Drosha and Dicer complexes. doi:10.1073/pnas.1112427109
123. Buratti, E. & Baralle, F. E. The multiple roles of TDP-43 in pre-mRNA processing and gene expression regulation. *RNA Biol.* **7**, 420–429 (2010).
 124. Buratti, E. *et al.* Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *FEBS J.* **277**, 2268–81 (2010).
 125. Volkening, K., Leystra-Lantz, C., Yang, W., Jaffee, H. & Strong, M. J. Tar DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43), 14-3-3 proteins and copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) interact to modulate NFL mRNA stability. Implications for altered RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Brain Res.* **1305**, 168–182 (2009).
 126. Strong, M. J. *et al.* TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Mol. Cell. Neurosci.* **35**, 320–7 (2007).
 127. Fiesel, F. C., Schurr, C., Weber, S. S. & Kahle, P. J. *TDP-43 knockdown impairs neurite outgrowth dependent on its target histone deacetylase 6.* (2011). doi:10.1186/1750-1326-6-64
 128. Fiesel, F. C. *et al.* Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6. *EMBO J.* **29**, 209–221 (2010).
 129. 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).
 130. Singh, N., Blobel, G. & Shi, H. Hooking She3p onto She2p for myosin-mediated cytoplasmic mRNA transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 142–7 (2015).
 131. Doyle, M. & Kiebler, M. A. Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *EMBO J.* **30**, 3540–3552 (2011).
 132. Fallini, C., Bassell, G. J. & Rossoll, W. The ALS disease protein TDP-43 is actively transported in motor neuron axons and regulates axon outgrowth. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 3703–18 (2012).
 133. 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).
 134. Coyne, A. N. *et al.* Neurobiology of Disease Futsch/MAP1B mRNA Is a Translational Target of TDP-43 and Is Neuroprotective in a Drosophila Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurosci.* **34**, 15962–74 (2014).
 135. Majumder, P., Chu, J.-F., Chatterjee, B., Swamy, K. B. S. & Shen, C.-K. J. Co-regulation of mRNA translation by TDP-43 and Fragile X Syndrome protein FMRP. *Acta Neuropathol.* **132**, 721–738 (2016).
 136. Buchan, J. R. mRNP granules. Assembly, function, and connections with disease. *RNA Biol.* **11**, 1019–30 (2014).
 137. Mitrea, D. M. & Kriwacki, R. W. Phase separation in biology; functional organization of a higher order. *Cell Commun. Signal.* **14**, 1 (2016).
 138. Brangwynne, C. P. *et al.* Germline P Granules Are Liquid Droplets That Localize by Controlled Dissolution/Condensation. *Science (80-.).* **324**, 1729–1732 (2009).
 139. Lin, Y., Protter, D. S. W., Rosen, M. K. & Parker, R. Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins. *Mol. Cell* **60**, 208–219 (2015).
 140. Nott, T. J. *et al.* Phase Transition of a Disordered Nuage Protein Generates Environmentally Responsive Membraneless Organelles. *Mol. Cell* **57**, 936–947 (2015).
 141. Molliex, A. *et al.* Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization. *Cell* **163**, 123–133 (2015).

142. Colombrita, C. *et al.* TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J. Neurochem.* **111**, 1051–1061 (2009).
143. Chong, P. A. & Forman-Kay, J. D. A New Phase in ALS Research. *Structure* **24**, 1435–1436 (2016).
144. Elbaum-Garfinkle, S. & Brangwynne, C. P. Liquids, Fibers, and Gels: The Many Phases of Neurodegeneration. *Dev. Cell* **35**, 531–532 (2015).
145. Patel, A. *et al.* A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell* **162**, 1066–1077 (2015).
146. 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).
147. McDonald, K. K. *et al.* TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1400–1410 (2011).
148. Aulas, A. s, Stabile, S. phanie & Velde, C. Vande. Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP. *Mol. Neurodegener.* **7**, 1 (2012).
149. Khalfallah, Y. *et al.* TDP-43 regulation of stress granule dynamics in neurodegenerative disease-relevant cell types. *Sci. Rep.* 1–13 (2018). doi:10.1038/s41598-018-25767-0
150. Seyfried, N. T. *et al.* Multiplex SILAC Analysis of a Cellular TDP-43 Proteinopathy Model Reveals Protein Inclusions Associated with SUMOylation and Diverse Polyubiquitin Chains. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 705–718 (2010).
151. Cohen, T. J. *et al.* An acetylation switch controls TDP-43 function and aggregation propensity. *Nat. Commun.* **6**, 5845 (2015).
152. Xiao, S. *et al.* Low molecular weight species of TDP-43 generated by abnormal splicing form inclusions in amyotrophic lateral sclerosis and result in motor neuron death. *Acta Neuropathol.* **130**, 49–61 (2015).
153. Dormann, D. *et al.* Proteolytic processing of TAR DNA binding protein-43 by caspases produces C-terminal fragments with disease defining properties independent of progranulin. *J. Neurochem.* **110**, 1082–94 (2009).
154. Bodansky, A. *et al.* TDP-43 and ubiquitinated cytoplasmic aggregates in sporadic ALS are low frequency and widely distributed in the lower motor neuron columns independent of disease spread. *Amyotroph. Lateral Scler.* **11**, 321–7 (2010).
155. Aulas, A. & Vande Velde, C. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 423 (2015).
156. Bentmann, E., Haass, C. & Dormann, D. Stress granules in neurodegeneration - lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. *FEBS J.* **280**, 4348–4370 (2013).
157. Xiao, S. *et al.* RNA targets of TDP-43 identified by UV-CLIP are deregulated in ALS. *Mol. Cell. Neurosci.* **47**, 167–180 (2011).
158. Alami, N. H. *et al.* Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron* **81**, 536–43 (2014).
159. Coyne, A. N., Zaepfel, B. L. & Zarnescu, D. C. Failure to Deliver and Translate—New Insights into RNA Dysregulation in ALS. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 1–13 (2017).
160. Cascella, R. *et al.* Quantification of the relative contributions of loss-of-function and gain-of-function mechanisms in TDP-43 proteinopathies. *J. Biol. Chem.* jbc.M116.737726 (2016). doi:10.1074/jbc.M116.737726
161. Igaz, L. M. *et al.* Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal

- death and degeneration in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 726–738 (2011).
162. Langelotti, S. *et al.* A novel *Drosophila* model of TDP-43 proteinopathies: N-terminal sequences combined with the Q/N domain induce protein functional loss and locomotion defects. *Dis. Model. Mech.* **9**, 659–669 (2016).
 163. Capitini, C. *et al.* TDP-43 Inclusion Bodies Formed in Bacteria Are Structurally Amorphous, Non-Amyloid and Inherently Toxic to Neuroblastoma Cells. *PLoS One* **9**, e86720 (2014).
 164. Igaz, L. M. *et al.* Expression of TDP-43 C-terminal Fragments *in Vitro* Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies. *J. Biol. Chem.* **284**, 8516–8524 (2009).
 165. Egawa, N. *et al.* Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci. Transl. Med.* **4**, 145ra104-145ra104 (2012).
 166. Richard, J.-P. & Maragakis, N. J. Induced pluripotent stem cells from ALS patients for disease modeling. *Brain Res.* **1607**, 15–25 (2015).
 167. Swarup, V. *et al.* Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain* **134**, 2610–2626 (2011).
 168. Tsai, K.-J. *et al.* Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTL-D-U. *J. Exp. Med.* **207**, 1661–73 (2010).
 169. Sephton, C. F. *et al.* TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. *J. Biol. Chem.* **285**, 6826–6834 (2010).
 170. Wu, L.-S. *et al.* TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *Genesis* **48**, 56–62 (2010).
 171. Iguchi, Y. *et al.* Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain* **136**, 1371–1382 (2013).
 172. 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 * □ S. (2012). doi:10.1074/jbc.M112.359000
 173. Vaccaro, A. *et al.* TDP-1/TDP-43 regulates stress signaling and age-dependent proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* **8**, (2012).
 174. Estes, P. S. *et al.* Wild-type and A315T mutant TDP-43 exert differential neurotoxicity in a *Drosophila* model of ALS. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2308–21 (2011).
 175. Feiguin, F. *et al.* Depletion of TDP-43 affects *Drosophila* motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior. *FEBS Lett.* **583**, 1586–1592 (2009).
 176. 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.* **2018** **21**, 1 (2018).
 177. Moisse, K. *et al.* Divergent patterns of cytosolic TDP-43 and neuronal progranulin expression following axotomy: Implications for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury. *Brain Res.* **1249**, 202–211 (2009).
 178. Anderson, P. & Kedersha, N. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 141–150 (2008).
 179. Anderson, P. & Kedersha, N. Stressful initiations. *J. Cell Sci.* **115**, 3227–34 (2002).
 180. Tissières, A., Mitchell, H. K. & Tracy, U. M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* **84**, 389–98 (1974).
 181. Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. & Anderson, P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* **147**, 1431–42 (1999).

182. Anderson, P. & Kedersha, N. Stress granules. *Curr. Biol.* **19**, 397–398 (2009).
183. Stöhr, N. *et al.* ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J. Cell Biol.* **175**, 527–534 (2006).
184. Dewey, C. M. *et al.* TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor. *Mol. Cell Biol.* **31**, 1098–108 (2011).
185. Stoecklin, G. *et al.* MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J.* **23**, 1313–1324 (2004).
186. Chalupníková, K. *et al.* Recruitment of the RNA Helicase RHAU to Stress Granules via a Unique RNA-binding Domain. *J. Biol. Chem.* **283**, 35186–35198 (2008).
187. Pothof, J., Verkaik, N. S., Hoeijmakers, J. H. J. & van Gent, D. C. MicroRNA responses and stress granule formation modulate the DNA damage response. *Cell Cycle* **8**, 3462–3468 (2009).
188. Kwon, S. H., Zhang, Y. & Matthias, P. The deacetylase HDAC6 is an essential component of stress granules and plays a critical role in the cellular response to stress. *Genes Dev.* **21**, 3381–3394 (2007).
189. Goodier, J. L., Zhang, L., Vetter, M. R. & Kazazian, H. H. LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Mol. Cell Biol.* **27**, 6469–83 (2007).
190. Kimball, S. R., Horetsky, R. L., Ron, D., Jefferson, L. S. & Harding, H. P. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am. J. Physiol. Physiol.* **284**, C273–C284 (2003).
191. Mazroui, R., Di Marco, S., Kaufman, R. J. & Gallouzi, I.-E. Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System Induces Stress Granule Formation. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2603–2618 (2007).
192. Emará, M. M. & Brinton, M. A. Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 9041–9046 (2007).
193. Raaben, M., Groot Koerkamp, M. J. A., Rottier, P. J. M. & de Haan, C. A. M. Mouse hepatitis coronavirus replication induces host translational shutoff and mRNA decay, with concomitant formation of stress granules and processing bodies. *Cell. Microbiol.* **9**, 2218–2229 (2007).
194. Fitzgerald, K. D. & Semler, B. L. Poliovirus infection induces the co-localization of cellular protein SRp20 with TIA-1, a cytoplasmic stress granule protein. *Virus Res.* **176**, 223–231 (2013).
195. Fournier, M.-J., Gareau, C. & Mazroui, R. The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules. *Cancer Cell Int.* **10**, 12 (2010).
196. Kedersha, N. & Anderson, P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 963–969 (2002).
197. Aulas, A., Fay, M. M., Lyons, S. M., Achorn, C. A. & Kedersha, N. Stress-specific differences in assembly and composition of stress granules and related foci. 927–937 (2017). doi:10.1242/jcs.199240
198. Kedersha, N. *et al.* Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* **169**, 871–884 (2005).
199. Bounedjah, O. *et al.* Free mRNA in excess upon polysome dissociation is a scaffold for protein multimerization to form stress granules. *Nucleic Acids Res.* **42**, 8678–91 (2014).
200. Dang, Y. *et al.* Eukaryotic initiation factor 2 α -independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J. Biol. Chem.* **281**, 32870–32878 (2006).

201. Moujaber, O. *et al.* Biochimica et Biophysica Acta Dissecting the molecular mechanisms that impair stress granule formation in aging cells. *BBA - Mol. Cell Res.* **1864**, 475–486 (2017).
202. Bounedjah, O. *et al.* Macromolecular crowding regulates assembly of mRNA stress granules after osmotic stress: New role for compatible osmolytes. *J. Biol. Chem.* **287**, 2446–2458 (2012).
203. Kroschwald, S. *et al.* Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules. *Elife* **4**, 3–5 (2015).
204. Kedersha, N. *et al.* Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* **151**, 1257–1268 (2000).
205. Wolozin, B. Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* **7**, 56 (2012).
206. Bartoli, K. M., Bishop, D. L. & Saunders, W. S. The role of molecular microtubule motors and the microtubule cytoskeleton in stress granule dynamics. *Int. J. Cell Biol.* **2011**, 1–9 (2011).
207. Aulas, A. *et al.* G3BP1 promotes stress-induced RNA granule interactions to preserve polyadenylated mRNA. *J. Cell Biol.* **209**, 73–84 (2015).
208. Jain, S. *et al.* ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell* **164**, 487–498 (2016).
209. Wheeler, J. R., Matheny, T., Jain, S., Abrisch, R. & Parker, R. Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. *Elife* **5**, (2016).
210. Nadezhdina, E. S., Lomakin, A. J., Shpilman, A. A., Chudinova, E. M. & Ivanov, P. A. Microtubules govern stress granule mobility and dynamics. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1803**, 361–371 (2010).
211. Ivanov, P. A., Chudinova, E. M. & Nadezhdina, E. S. Disruption of microtubules inhibits cytoplasmic ribonucleoprotein stress granule formation. *Exp. Cell Res.* **290**, 227–33 (2003).
212. Mazroui, R. *et al.* Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4212–9 (2006).
213. Buchan, J. R., Kolaitis, R. M., Taylor, J. P. & Parker, R. XEukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function. *Cell* **153**, 1461–1474 (2013).
214. Meyer, H. & Wehl, C. C. The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. *J. Cell Sci.* **127**, 3877–3883 (2014).
215. Ganassi, M. *et al.* A Surveillance Function of the HSPB8-BAG3-HSP70 Chaperone Complex Ensures Stress Granule Integrity and Dynamism. *Mol. Cell* **63**, 796–810 (2016).
216. Mateju, D. *et al.* An aberrant phase transition of stress granules triggered by misfolded protein and prevented by chaperone function. *EMBO J.* **36**, 1669–1687 (2017).
217. Seguin, S. J. *et al.* Inhibition of autophagy, lysosome and VCP function impairs stress granule assembly. *Cell Death Differ.* **21**, 1838–51 (2014).
218. Monahan, Z., Shewmaker, F. & Pandey, U. B. Stress granules at the intersection of autophagy and ALS. *Brain Res.* **1649**, 189–200 (2016).
219. Nover, L., Scharf, K. D. & Neumann, D. Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 1648–55 (1983).
220. Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. & Anderson, P. eIF-2 α to the Assembly of Mammalian Stress Granules. *J. Cell Biol.* **147**, 1431–1441 (1999).
221. Walters, R. W., Muhlrad, D., Garcia, J. & Parker, R. Differential effects of Ydj1 and Sis1

- on Hsp70-mediated clearance of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **21**, 1660–1671 (2015).
222. Anderson, P. & Kedersha, N. 壽Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* **7**, 213–221 (2002).
 223. Tourrière, H. *et al.* The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J. Cell Biol.* **160**, 823–831 (2003).
 224. Sama, R. R. K. *et al.* FUS/TLS assembles into stress granules and is a prosurvival factor during hyperosmolar stress. *J. Cell. Physiol.* **228**, 2222–2231 (2013).
 225. Khong, A., Jain, S., Matheny, T., Wheeler, J. R. & Parker, R. Isolation of mammalian stress granule cores for RNA-Seq analysis. *Methods* 1–6 (2017). doi:10.1016/j.ymeth.2017.11.012
 226. Khong, A. *et al.* The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules. *Mol. Cell* **68**, 808–820.e5 (2017).
 227. Thomas, M. G., Loschi, M., Desbats, M. A. & Boccaccio, G. L. RNA granules: The good, the bad and the ugly. *Cell. Signal.* **23**, 324–334 (2011).
 228. Marcuccilli, C. J., Mathur, S. K., Morimoto, R. I. & Miller, R. J. *Regulatory Differences in the Stress Response of Hippocampal Neurons and Glial Cells after Heat Shock.* *The Journal of Neuroscience* **76**, (1996).
 229. Sun, Y. *et al.* A genome-wide RNAi screen identifies genes regulating the formation of P bodies in *C. elegans* and their functions in NMD and RNAi. *Protein Cell* **2**, 918–939 (2011).
 230. Chauderlier, A., Delattre, L., Buée, L. & Galas, M.-C. In Vivo Hyperthermic Stress Model: An Easy Tool to Study the Effects of Oxidative Stress on Neuronal Tau Functionality in Mouse Brain. *Methods Mol. Biol.* **1523**, 369–373 (2017).
 231. Shelkovernikova, T. A. *et al.* Chronically stressed or stress-preconditioned neurons fail to maintain stress granule assembly. *Nat. Publ. Gr.* **8**, (2017).
 232. Ackerman, D. & Simon, M. C. Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment. *Trends Cell Biol.* **24**, 472–478 (2014).
 233. Clarke, H. J., Chambers, J. E., Liniker, E. & Marciniak, S. J. Endoplasmic Reticulum Stress in Malignancy. *Cancer Cell* **25**, 563–573 (2014).
 234. Wendel, H.-G. *et al.* Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev.* **21**, 3232–3237 (2007).
 235. Wendel, H.-G. *et al.* Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* **428**, 332–337 (2004).
 236. Mazan-Mamczarz, K. *et al.* RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 8354–8359 (2003).
 237. de Silanes, I. L. *et al.* Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene* **22**, 7146–7154 (2003).
 238. Shukla, S. & Parker, R. Hypo- and Hyper-Assembly Diseases of RNA-Protein Complexes. *Trends Mol. Med.* **22**, 615–628 (2016).
 239. Lechler, M. C. & David, D. C. More stressed out with age? Check your RNA granule aggregation. (2017). doi:10.1080/19336896.2017.1356559org/10.1080/19336896.2017.1356559
 240. Frankel, L. B., Lubas, M. & Lund, A. H. Emerging connections between RNA and autophagy. *Autophagy* **13**, 3–23 (2017).
 241. Harrison, A. F. & Shorter, J. RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease. *Biochem. J.* **474**, 1417–1438 (2017).

242. Cestra, G., Rossi, S., Di Salvio, M. & Cozzolino, M. Control of mRNA Translation in ALS Proteinopathy. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 85 (2017).
243. Alberti, S., Mateju, D., Mediani, L. & Carra, S. Granulostasis: Protein Quality Control of RNP Granules. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 84 (2017).
244. Tiraboschi, P., Hansen, L. A., Thal, L. J. & Corey-Bloom, J. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology* **62**, 1984–1989 (2004).
245. Wenk, G. L. Neuropathologic changes in Alzheimer’s disease. *J. Clin. Psychiatry* **64 Suppl 9**, 7–10 (2003).
246. Vanderweyde, T. *et al.* Interaction of tau with the RNA-Binding Protein TIA1 Regulates tau Pathophysiology and Toxicity. *Cell Rep.* **15**, 1455–1466 (2016).
247. Zhang, X. *et al.* RNA stores tau reversibly in complex coacervates. *PLoS Biol.* **15**, e2002183 (2017).
248. Atlas, R., Behar, L., Sapoznik, S. & Ginzburg, I. Dynamic association with polysomes during P19 neuronal differentiation and an untranslated-region-dependent translation regulation of the tau mRNA by the tau mRNA-associated proteins IMP1, HuD, and G3BP1. *J. Neurosci. Res.* **85**, 173–183 (2007).
249. Moschner, K. *et al.* RNA protein granules modulate tau isoform expression and induce neuronal sprouting. *J. Biol. Chem.* **289**, 16814–16825 (2014).
250. Vanderweyde, T. *et al.* Contrasting pathology of the stress granule proteins TIA-1 and G3BP in tauopathies. *J. Neurosci.* **32**, 8270–83 (2012).
251. Liu-Yesucevitz, L. *et al.* Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: Analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS One* **5**, (2010).
252. Bosco, D. A. *et al.* Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4160–75 (2010).
253. Dewey, C. M. *et al.* TDP-43 aggregation in neurodegeneration: Are stress granules the key? *Brain Res.* **1462**, 16–25 (2012).
254. Sun, Z. *et al.* Molecular Determinants and Genetic Modifiers of Aggregation and Toxicity for the ALS Disease Protein FUS/TLS. *PLoS Biol.* **9**, e1000614 (2011).
255. Gal, J. *et al.* Nuclear localization sequence of FUS and induction of stress granules by ALS mutants. *Neurobiol. Aging* **32**, 2323.e27–2323.e40 (2011).
256. Liu-Yesucevitz, L. *et al.* ALS-Linked Mutations Enlarge TDP-43-Enriched Neuronal RNA Granules in the Dendritic Arbor. *J. Neurosci.* **34**, 4167–4174 (2014).
257. Mackenzie, I. R. *et al.* TIA1 Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Promote Phase Separation and Alter Stress Granule Dynamics. *Neuron* **95**, 808–816.e9 (2017).
258. Lee, Y.-B. *et al.* Hexanucleotide repeats in ALS/FTD form length-dependent RNA foci, sequester RNA binding proteins, and are neurotoxic. *Cell Rep.* **5**, 1178–1186 (2013).
259. Lee, K.-H. *et al.* C9orf72 Dipeptide Repeats Impair the Assembly, Dynamics, and Function of Membrane-Less Organelles. *Cell* **167**, 774–788.e17 (2016).
260. Lin, Y. *et al.* Toxic PR Poly-Dipeptides Encoded by the C9orf72 Repeat Expansion Target LC Domain Polymers. *Cell* **167**, 789–802.e12 (2016).
261. Lopez-Gonzalez, R. *et al.* Poly(GR) in C9ORF72-Related ALS/FTD Compromises Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress and DNA Damage in iPSC-Derived Motor Neurons. *Neuron* **92**, 383–391 (2016).
262. Parker, R. RNA Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**, 671–702 (2012).

263. Dormann, D. *et al.* ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J.* **29**, 2841–2857 (2010).
264. Gitcho, M. A. *et al.* VCP mutations causing frontotemporal lobar degeneration disrupt localization of TDP-43 and induce cell death. *J. Biol. Chem.* **284**, 12384–12398 (2009).
265. Ritson, G. P. *et al.* TDP-43 mediates degeneration in a novel *Drosophila* model of disease caused by mutations in VCP/p97. *J. Neurosci.* **30**, 7729–7739 (2010).
266. Turakhiya, A. *et al.* ZFAND1 Recruits p97 and the 26S Proteasome to Promote the Clearance of Arsenite-Induced Stress Granules. *Mol. Cell* 906–919 (2018). doi:10.1016/j.molcel.2018.04.021
267. Capozzella, A. *et al.* Work related etiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a meta-analysis. *Ann. Ig.* **26**, 456–72
268. Berríos, V. O. *et al.* Paraoxon and Pyridostigmine Interfere with Neural Stem Cell Differentiation. *Neurochem. Res.* **40**, 2091–2101 (2015).
269. Liddelow, S. A. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **541**, 481–487 (2017).
270. Kiernan, J. A. & Hudson, A. J. Changes in sizes of cortical and lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **114 (Pt 2)**, 843–53 (1991).
271. Kiernan, J. A. & Hudson, A. J. Changes in shapes of surviving motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **116 (Pt 1)**, 203–15 (1993).
272. Protter, D. S. W. & Parker, R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol.* **26**, 668–679 (2016).
273. Pangršič, T., Potokar, M., Haydon, P. G., Zorec, R. & Kreft, M. Astrocyte swelling leads to membrane unfolding, not membrane insertion. *J. Neurochem.* **99**, 514–523 (2006).
274. Risher, W. C., Andrew, R. D. & Kirov, S. A. Real-time passive volume responses of astrocytes to acute osmotic and ischemic stress in cortical slices and *in vivo* revealed by two-photon microscopy. *Glia* **57**, 207–221 (2009).
275. Cotrina, M. L. *et al.* Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15735–40 (1998).
276. Hubbard, J. A., Szu, J. I. & Binder, D. K. The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. *Brain Res. Bull.* (2017). doi:10.1016/j.brainresbull.2017.02.011
277. Yang, B. *Aquaporins.*
278. Badaut, J., Fukuda, A. M., Jullienne, A. & Petry, K. G. Aquaporin and brain diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 1554–65 (2014).
279. Nielsen, S. *et al.* Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J. Neurosci.* **17**, 171–80 (1997).
280. Satoh, J. I., Tabunoki, H., Yamamura, T., Arima, K. & Konno, H. Human astrocytes express aquaporin-1 and aquaporin-4 in vitro and in vivo. *Neuropathology* **27**, 245–256 (2007).
281. Potokar, M. *et al.* Regulation of AQP4 surface expression via vesicle mobility in astrocytes. *Glia* **61**, 917–928 (2013).
282. Rodríguez, A. *et al.* Increased expression of water channel aquaporin 1 and aquaporin 4 in Creutzfeldt-Jakob disease and in bovine spongiform encephalopathy-infected bovine-PrP transgenic mice. *Acta Neuropathol.* **112**, 573–585 (2006).
283. Aoki-Yoshino, K. *et al.* Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with inflammatory diseases. *Acta Neuropathol.* **110**, 281–288 (2005).
284. Fournier, A. P. *et al.* Reduced spinal cord parenchymal cerebrospinal fluid circulation in

- experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 0271678X1875473 (2018). doi:10.1177/0271678X18754732
285. Nicaise, C. *et al.* Aquaporin-4 Overexpression in Rat ALS Model. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* **292**, 207–213 (2009).
 286. Nicaise, C., Soyfoo, M. S., Delporte, C. & Pochet, R. Aquaporin-4 as a potential marker of BBB disruption in ALS models. *Amyotroph. Lateral Scler.* **11**, 253–4 (2010).
 287. Sato, T. *et al.* Axonal ligation induces transient redistribution of TDP-43 in brainstem motor neurons. *Neuroscience* **164**, 1565–1578 (2009).
 288. Lesuisse, C. & Martin, L. J. Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *J. Neurobiol.* **51**, 9–23 (2002).
 289. Alfieri, J. A., Pino, N. S. & Igaz, L. M. Reversible behavioral phenotypes in a conditional mouse model of TDP-43 proteinopathies. *J. Neurosci.* **34**, 15244–59 (2014).
 290. Kobayashi, T., Winslow, S., Sunesson, L., Hellman, U. & Larsson, C. PKC?? binds G3BP2 and regulates stress granule formation following cellular stress. *PLoS One* **7**, 1–11 (2012).
 291. Matsuki, H. *et al.* Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes to Cells* **18**, 135–146 (2013).
 292. Kennedy, D. *et al.* Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP(120) binding studies. *J. Cell. Biochem.* **84**, 173–87 (2001).
 293. Bryantsev, A. L. *et al.* Regulation of stress-induced intracellular sorting and chaperone function of Hsp27 (HspB1) in mammalian cells. *Biochem. J.* **407**, 407–17 (2007).
 294. Calderwood, S. K., Murshid, A. & Prince, T. The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology* **55**, 550–8 (2009).

Annexes

Annexe 1 : La durée du stress ne détermine pas la longueur de la cinétique des GSs

Nous avons montré dans le deuxième chapitre que les neurones corticaux possédaient une cinétique de stress plus longue que les astrocytes ou même les lignées HeLa¹⁴⁹. Or, les neurones corticaux nécessitent 60 min de stress au 0.5 mM de SA afin d'atteindre aux alentours de 80-90% des cellules possédant des GSs contrairement aux astrocytes et HeLa qui nécessitent seulement 30 min. La question est donc : est-ce que le désassemblage prolongé dans les neurones corticaux est dû à un stress prolongé ? Pour répondre à cette question, j'ai effectué un stress de 60 min sur les lignées de cellules HeLa transfectées, de la même façon que les neurones corticaux, et j'ai regardé la longueur de désassemblage des GSs.

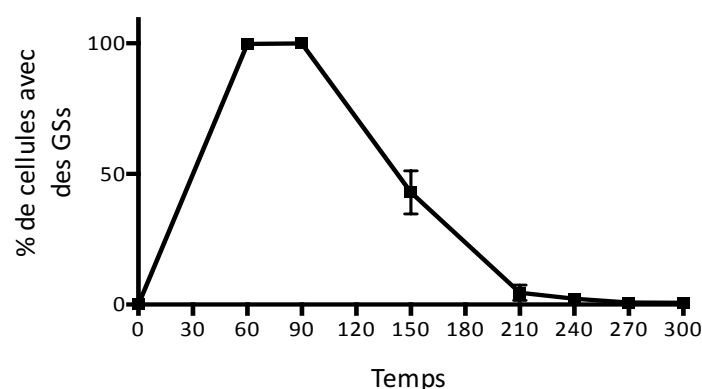


Figure 8: Temps de stress prolongé ne résulte pas en un désassemblage retardé dans les cellules HeLa. Les cellules HeLa ont été transfectées avec un siRNA contrôle et traitées 72h après avec 0.5mM de sodium arsénite pendant 60min. Le graphique représente le pourcentage de cellules avec deux granules ou plus, et ce au cours de temps. n=3.

On observe ainsi que les granules de stress se désassemblent aux alentours de 150-180 min (Fig. 8), en ligne avec ce que notre laboratoire a publié¹⁴⁷ après 30 min de stress, contrairement aux neurones corticaux où plus de 30% des cellules possèdent encore des GSs à 240 min. On en conclut donc que le retard de désassemblage n'est pas dû à un stress prolongé, mais possiblement à des mécanismes de désassemblages différents chez les neurones corticaux.

Annexe 2 : L' expression de VCP est diminuée dans les neurones corticaux comparé à d'autres types cellulaires

D'après l'annexe 1 la longueur de désassemblage des GSs dans les neurones corticaux n'est pas due à la longueur du stress. Nous nous sommes alors demandé si cette différence de réponse pouvait être attribuée au niveau d'expression de certaines protéines responsables du désassemblage des GSs. Le mécanisme de désassemblage des GSs étant encore mal connu une des propositions, évoquées dans l'introduction, est un désassemblage des GSs par autophagie avec l'implication de VCP/p97²¹³. Nous avons ainsi étudié l'expression de VCP/p97 et, comme contrôle, celle de TDP-43, dans différents types cellulaires : la lignée humaine HeLa, cultures primaires de souris astrocytes, MEFs et neurones corticaux.

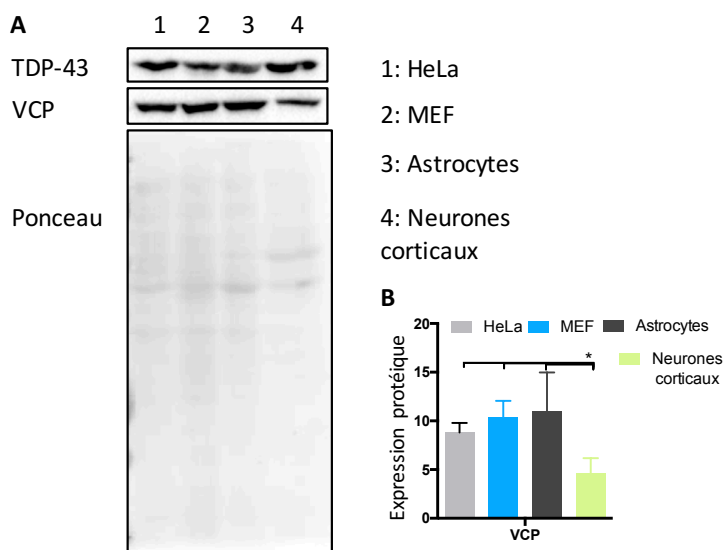


Figure 9: Comparaison de l'expression de TDP-43 et VCP dans différents types cellulaires.

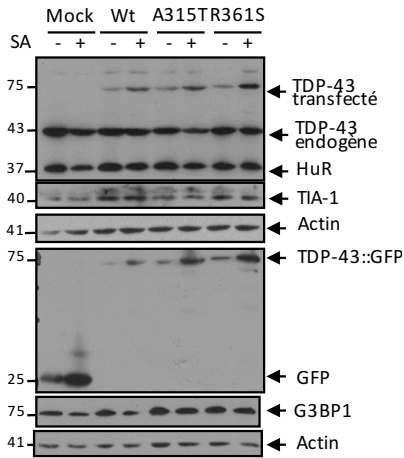
Des cultures de cellules lignée HeLa et primaires MEF (mouse embryonic fibroblasts), astrocytes et neurones corticaux ont été collecté dans le tampon de lyse RIPA. A) Western blot avec les différents types cellulaires, les anticorps utilisés sont lapin TDP-43 et souris VCP. Le ponceau sert comme contrôle de migration et transfert. B) Quantification de l'intensité des bandes de VCP issus du A) n=3. *p<0.05 one-way anova.

On peut ainsi observer que l'expression de VCP est significativement diminuée (Fig. 9 A, B) dans les neurones corticaux comparés aux astrocytes, MEFs ou HeLa. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si cette différence d'expression est à l'origine des mécanismes de désassemblages différents dans les neurones corticaux.

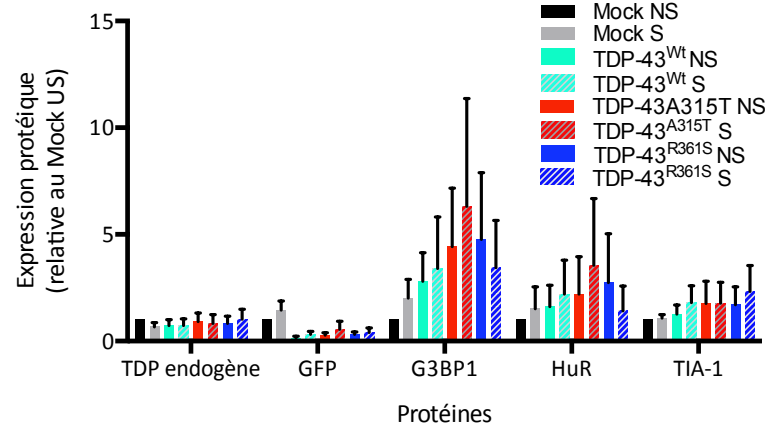
Annexe 3: La surexpression des mutants TDP-43 ne semble pas d'avoir d'effet sur les composants des granules de stress

L'effet des mutations du gène de TDP-43 sur les composants des GSs est une question subsidiaire dans notre étude. En effet, de multiples études rapportent des effets contradictoires des mutants sur les mécanismes de GSs. On exprimé TDP-43 sauvage et mutants (TDP-43^{A315T} et TDP-43^{R361S}) dans les cellules HeLa puis on les a traités avec 0.5mM de SA pendant 30 min afin d'observer l'effet des mutations sur différents composants des GSs après le stress. 24h après le stress aucune différence n'est observée sur l'expression de G3BP1, TIA-1 ou HuR (Fig. 10 A, B). On peut noter une diminution de G3BP1 48h après le stress (Fig. 10 C, D), quand les mutants TDP-43^{A315T} et TDP-43^{R361S} sont exprimés, mais elle n'est pas significative. Globalement, on n'observe pas d'effet de l'expression de ces mutants de TDP-43 malgré nos efforts pour éviter une surexpression et donc un artéfact possible. La présence de TDP-43 endogène altère probablement l'effet de l'expression des mutants. Car, comme il a été publié auparavant^{120,176}, on observe une autorégulation de TDP-43, et ce entre TDP-43 transfecté et TDP-43 endogène. Dans notre deuxième chapitre j'ai pu déplété l'expression de TDP-43 endogène avant d'exprimer le TDP-43 désiré.

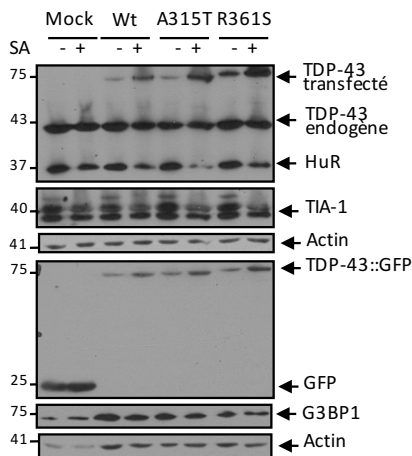
A 24h après le stress



B



C 48h après le stress



D

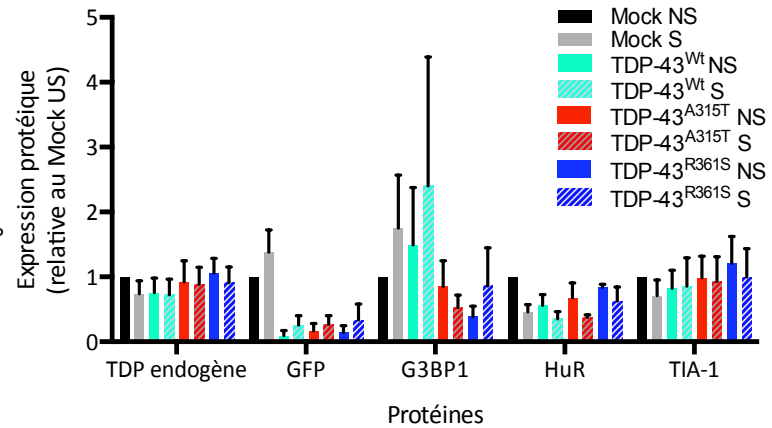


Figure 10: Expression des protéines des GSs en réponse à la surexpression de TDP-43

mutants. Des cellules HeLa ont été transfecté avec Mock (vecteur vide), TDP-43^{Wt} (noté aussi Wt (TDP-43 sauvage), TDP-43^{A315T} (noté aussi A315T (TDP-43 comportant la mutation A315T), TDP-43^{R361S} (noté aussi R361S (TDP-43 comportant la mutation R361S)). 24h après la transfection les cellules ont été traitées (S) ou non (NS) avec 0.5mM de sodium arsenite pendant 30min. 24h et 48h suivant le stress les cellules ont été collectées dans du tampon de lyse RIPA. A et C) Western blot séparé en deux gels avec les différentes conditions de transfections. Les anticorps utilisés : lapin TDP-43, lapin HuR, chèvre TIA-1, souris Actin, lapin GFP, souris G3BP1. B et D) Quantification d'intensités des bandes de protéines montrées respectivement dans A et C. Représentatif de 3 expériences indépendantes exceptées pour HuR seulement 2 expériences.

Annexe 4: G3BP2 est présente aux GSs dans les cultures primaires de cellules microgliales

G3BP2 (Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 2) est un proche parent de G3BP1 possédant la même structure. Elle est exprimée de façon ubiquitaire, et elle a été rapportée comme faisant partie des composants des GSs dans des lignées cellulaires transformées^{204,223}. Elle serait même impliquée dans leur formation, d'après une étude, où G3BP2 lié à une étiquette a été surexprimé^{290,291}. Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Dre Jasna Kriz, nous avons entrepris de déterminer si G3BP2 est bel et bien recrutée aux GSs formés suivant un stress au SA et ce dans des cultures primaires de cellules microgliales murines. J'ai soumis des cellules microgliales à un stress au SA de 0.5 mM et 1 mM pour une durée de 30 min et 1h. Dans toutes ces conditions G3BP2 était présente aux GSs formées (Fig. 11 A) et marquées par la sonde Oligo (dT).

Étant donné que G3BP2, tout autant que G3BP1, participe à la formation des GSs, on s'est alors demandé si la déplétion de TDP-43 affecte son expression aussi. Ainsi des cultures primaires d'astrocytes et de fibroblastes murins ont été transfectées avec des ARN interférents contrôles (siControl) et dirigés contre TDP-43 (siTDP-43). L'expression de G3BP2 a été observée grâce à un western blot. On peut voir que G3BP2 possèdent bien deux isoformes a et b comme rapporté précédemment²⁹². Aussi les deux isoformes semblent augmentées quand TDP-43 est déplété, la variabilité entre les expériences nous empêche cependant de conclure.

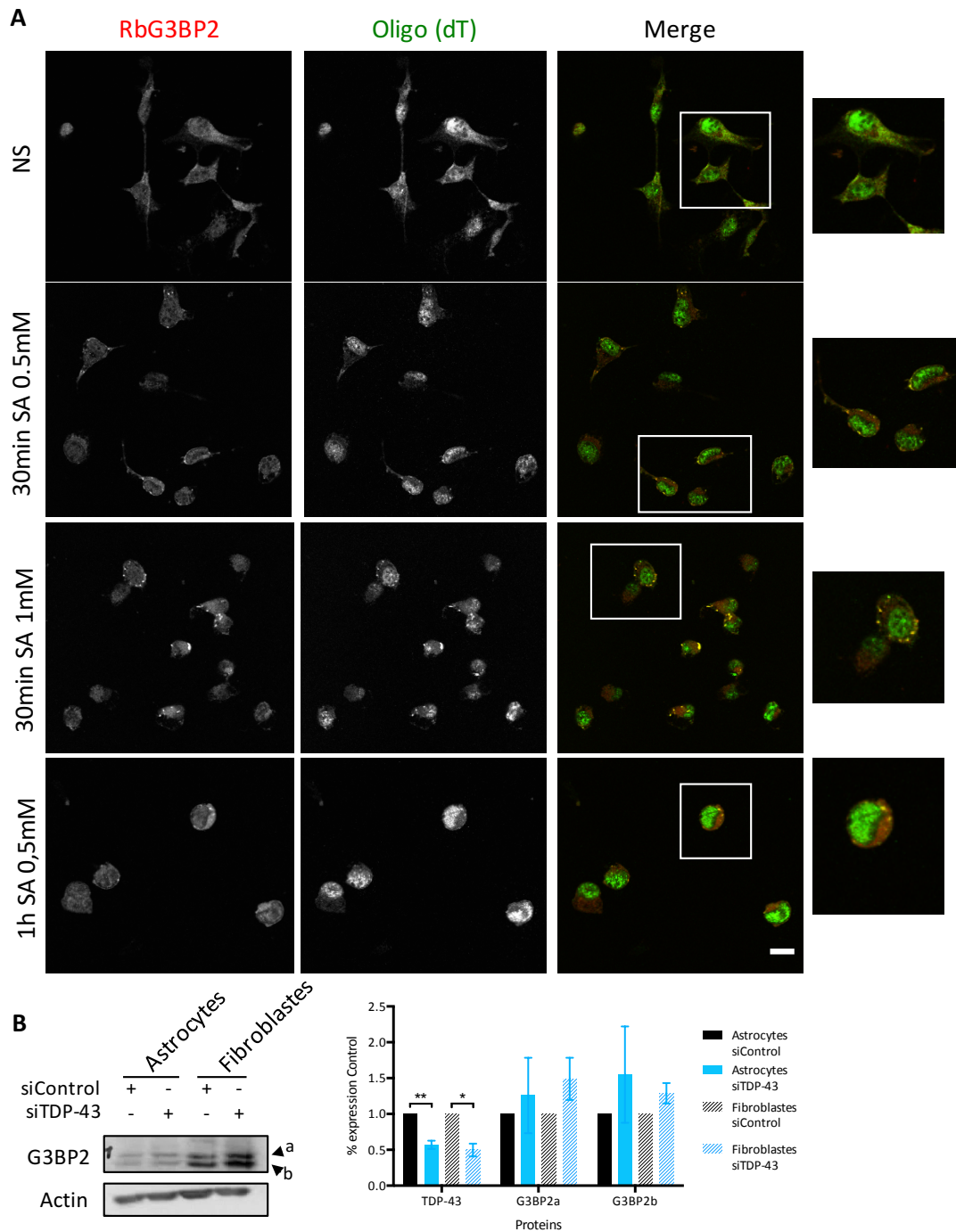


Figure 11: L'implication de G3BP2 dans les GSs. A) Des cellules cellulaires microgliales issues de culture primaire de souris ont été traitées au sodium arsénite (SA) aux différentes concentrations et différents temps de traitement indiqués sur la figure. Les granules de stress sont visualisés grâce à Oligo(dT) une probe qui reconnaît la queue polyadénylée des ARNm. G3BP2 est reconnue grâce à l'anticorps lapin (Bethyl A302-040A). B) Des cultures primaires d'astrocytes et fibroblastes de souris ont été transfectées avec siControl ou siTDP-43 puis collectés 72h plus tard dans un tampon de lyse RIPA. La quantification d'intensité des bandes du western blot à gauche, est montrée dans le graphique à droite. $n=3$. $*p<0.05$ student t-test. L'échelle représente 10 μm .

Annexe 5: HSP27 est présente aux GSs dans les cultures primaires de cellules microgliales sous conditions inflammatoires

Comme mentionné dans l'introduction, les GS sont composés de nombreuses protéines. Ne possédant pas une membrane lipidique, il n'existe pas encore de méthode permettant de les purifier. L'immunomarquage des protéines d'intérêts reste encore un moyen efficace pour confirmer leurs présences aux GSs. Ici, encore dans le cadre de notre collaboration avec le laboratoire du Dre Jasna Kriz, on montre la présence de la protéine HSP27 dans les GSs formées aux suites d'un traitement inflammatoire au LPS des cellules microgliales. Cette présence est démontrée par la colocalisation de HSP27 et les GSs marquées au moyen d'Oligo (dT). HSP27 est un membre de la famille des « heat shock proteins »^{293,294}, elle est considérée comme une chaperonne permettant à la cellule de résister à de multiples stress. Sa présence aux GSs n'a jamais été démontrée auparavant.

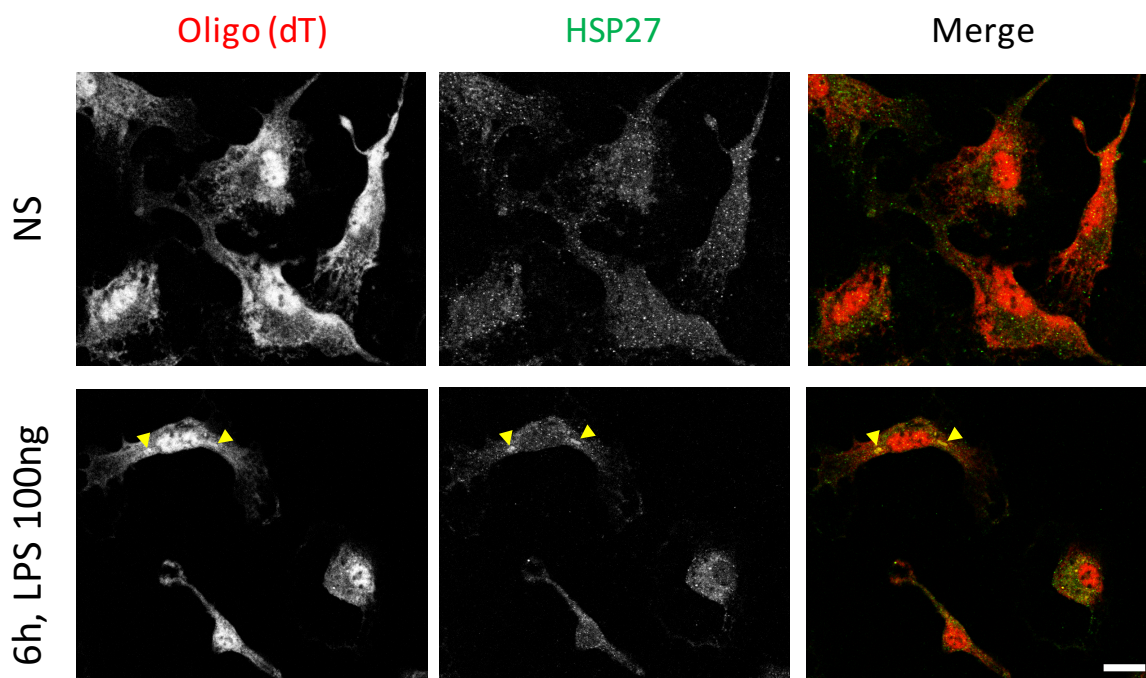


Figure 12: Présence de HSP27 dans les GSs. Des cellules microgliales issues de culture primaire de souris ont été traitées avec plusieurs concentrations de LPS (Lipopolysaccharides, une endotoxine), ici on montre les images pour 100 ng. Plusieurs temps de traitements, ici les images montrent 6h de traitement. Puis après fixation avec 1% de PFA on les a immunomarcués au moyen de HSP27 en vert. Les granules de stress sont visualisés grâce à Oligo(dT) une probe qui reconnaît la queue polyadénylée des ARNm. La tête de flèche jaune montre les GSs. L'échelle représente 10 µm.

Annexe 6: LPS ne semble pas induire de GSs dans les astrocytes malgré l'activation de NF- κ B /p65

Dans notre deuxième chapitre, portant sur l'étude des dynamiques des GSs en utilisant différents stress, on s'est intéressés à utiliser un stress inflammatoire aux moyens de LPS (Lipopolysaccharides, une endotoxine). En effet, les astrocytes ayant un rôle dans l'inflammation on s'est alors demandé si une infection au LPS induisait la formation de GSs de la même façon que dans les cellules microgliales. Après l'essai de multiples concentrations de LPS (10, 50 et 100 ng) ainsi que différents temps de traitements (2, 6, 8, 12 et 24h), on observe l'activation de la voie de signalisation de NF- κ B avec la translocation de p65 dans le noyau, mais jamais de formation de GSs marqué par TIA-1. Notre résultat peut donc ajouter le LPS à la liste des traitements n'entraînant pas de GSs dans les cultures primaires d'astrocytes.

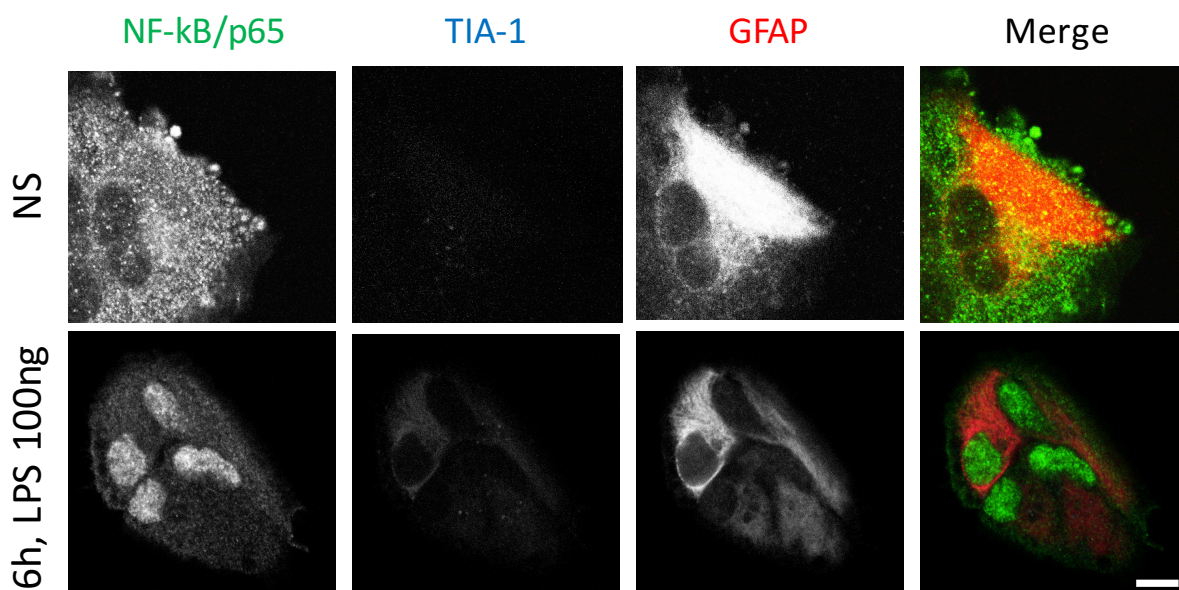


Figure 13 : LPS ne semble pas induire de GSs dans les astrocytes malgré l'activation de Nf κ B/p65. Des cultures primaires d'astrocytes de souris ont été traitées avec plusieurs concentrations de LPS (Lipopolysaccharides, une endotoxine), ici on montre les images pour 100 ng. Plusieurs temps de traitements, ici les images montrent 6h de traitement. Puis après fixation avec 1% de PFA on les a immunomarcués au moyen de TIA-1 en bleu. Afin de vérifier la pureté de la culture, GFAP (marqueur des filaments) est indiqué en rouge. Pour vérifier l'activation de la voie de signalisation, les cellules sont marquées avec NF- κ B/p65 en vert pour observer sa translocation au noyau. Ces images sont représentatives de 3 expériences indépendantes. L'échelle représente 10 μ m.

Annexe 7 : Stress osmotique n'induit pas de granules de stress dans les neurones corticaux

Il est apprécié que la composition des GSs peut varier en fonction de l'exposition au stress et que leur dynamique pourrait également être variable. Nous avons donc voulu étudier la formation des GSs dans les neurones corticaux après un stress osmotique. Notre choix des concentrations de sorbitol allant de 0,4 à 1M est basé sur une précédente étude qui a montré une formation de GSs grâce à ces concentrations. A notre grande surprise ce stress, qui induit la formation de GSs dans les astrocytes (chapitre 2, Fig. 5), n'induit pas de GSs dans les neurones corticaux. Nous avons bien évidemment essayé plusieurs concentrations et plusieurs temps d'exposition. Les astrocytes semblent réagir au stress osmotique grâce aux canaux AQP4, les neurones quant à eux possèdent plus communément AQP1 ou 9 (réf :277). Leur mécanisme est très peu connu. Ce résultat démontre encore une fois des réponses au stress très différentes suivant les types cellulaires.

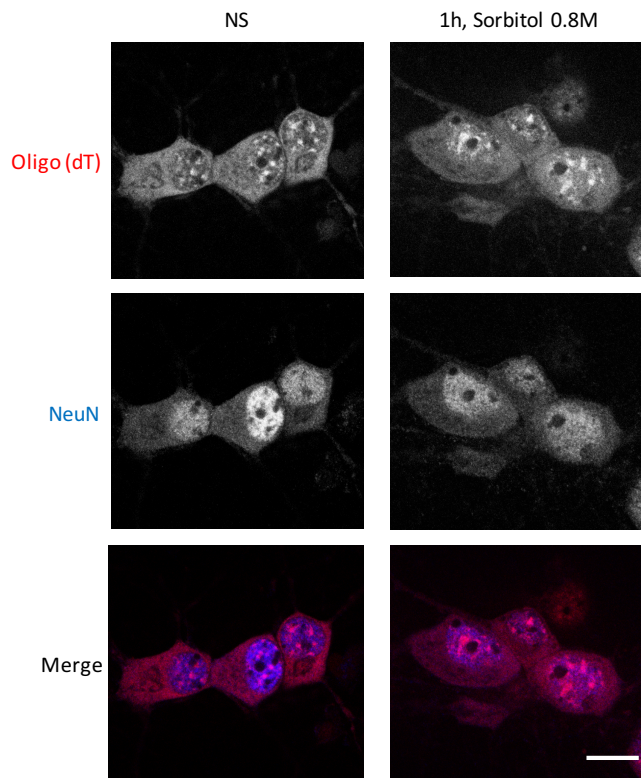


Figure 14: Stress osmotique n'induit pas de granules de stress dans les neurones corticaux. Des cultures primaires de neurones corticaux de souris (DIV 7) ont été traitées avec plusieurs concentrations de sorbitol, ici on montre les images pour 0.8M. Pendant plusieurs temps de traitements, ici les images montrent 1h de traitement. Puis après fixation avec 1% de PFA on a immunomarcqué les ARNm au moyen de l'Oligo(dT) en rouge : une probe qui reconnaît la queue polyadénylée. Aussi afin de vérifier la pureté de la culture NeuN (marqueur nucléaire des neurones) est indiqué en bleu. Ces images sont représentatives de 3 expériences indépendantes. L'échelle représente 10 μ m.

Annexe 8 : La déplétion de TDP-43 ne semble pas augmenter l'agrégation d'AQP4

La déplétion de TDP-43 induit une augmentation d'expression d'AQP4 (aquaporine 4), de presque 2 fois par rapport au contrôle, comme montré dans le deuxième chapitre. Cette augmentation est aussi accompagnée par l'absence du canal à la surface des astrocytes. L'une des hypothèses avancées pour expliquer cette différence est possiblement l'agrégation de la protéine à l'intérieur de la cellule. En effet, j'ai observé la formation d'agrégats d'AQP4 par immunofluorescence dans les cellules où TDP-43 est déplété (Fig. 15 A). Or au moyen de la technique de piège à filtre, précédemment publiée⁴⁰, on n'observe que très peu de différence d'agrégats d'AQP4 entre le contrôle et les cellules dépourvus de TDP-43. Cette absence de différence peut s'expliquer du fait qu'AQP4 est une protéine qui a tendance à s'oligomériser et qu'il est très difficile de séparer. Ce résultat n'exclut pas l'hypothèse de l'agrégation de l'excédent de la protéine, mais il est nécessaire d'utiliser une autre technique pour répondre à la question.

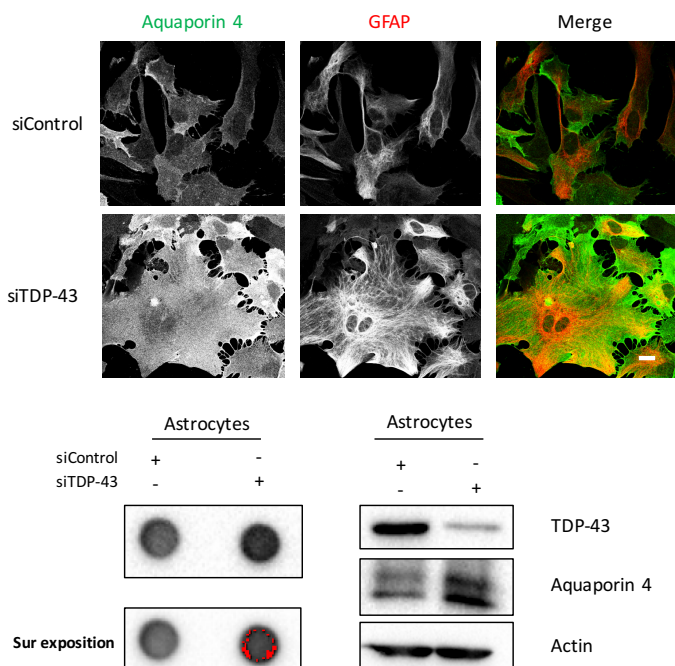


Figure 15: Conséquence de la déplétion de TDP-43 sur l'agrégation d'AQP4. A) Des cultures primaires d'astrocytes de souris ont été transfectées avec des ARN interférants contrôles (siControl) et contre TDP-43 (siTDP-43). Après fixation avec 1% de PFA on les a immunomarcués au moyen d'un anticorps contre aquaporine 4 en vert. Afin de vérifier la pureté de la culture, GFAP (marqueur des filaments) est indiqué en rouge. L'agrégat d'aquaporine 4 est montré grâce à la tête de flèche. L'échelle représente 10 μm . B) Gauche : on a conduit une technique de filtre (0.2 μm) qui retient les amas protéiques supérieurs à 200 nm. Puis marquer la membrane avec un anticorps contre aquaporine 4. Droite : western blot qui représente les mêmes cellules qu'utilisées à gauche pour vérifier la déplétion de TDP-43.

Annexe 9 : Les neurones corticaux sont plus vulnérables aux stress multiples que les astrocytes

Comme mentionner dans l'introduction l'hypothèse de multiples facteurs de stress environnementaux¹⁴ devient de plus en plus centrale dans la pathologie de la SLA. Il est admis que les neurones sont plus vulnérables aux stimuli externes comparés aux autres types cellulaires. Mais qu'en est-il vraiment de leur sensibilité aux multiples stress qu'ils peuvent connaître comparés à leurs voisins les astrocytes ? Nous avons entrepris de tester les conséquences de multiples stress sur les astrocytes et neurones corticaux. J'ai utilisé l'imageur en temps réel IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System® (Essen Biosciences, Ann Arbor, MI, USA) afin de compter automatiquement, grâce à son logiciel en temps réel, le nombre de cellules mortes suivant les stress multiples. On observe qu'après 24h (Fig. 16 A) les astrocytes qui n'ont subi qu'un seul stress ne meurent pas plus que les cellules qui n'ont pas reçu de traitement. Ce n'est qu'au deuxième et troisième stress que la mortalité des astrocytes augmente. Les neurones corticaux quant à eux sont très sensibles, malgré leur conditionnement avec du milieu d'astrocytes, un seul stress suffit pour tuer une grande partie d'entre eux. Cependant, les stress supplémentaires ne change pas la courbe de mortalité. Ce résultat nous confirme la vulnérabilité des neurones aux stress, mais de façon intéressante nous démontre la robustesse des astrocytes qui résistent au premier stress et ce n'est qu'au deuxième et troisième qu'ils montrent une vulnérabilité.

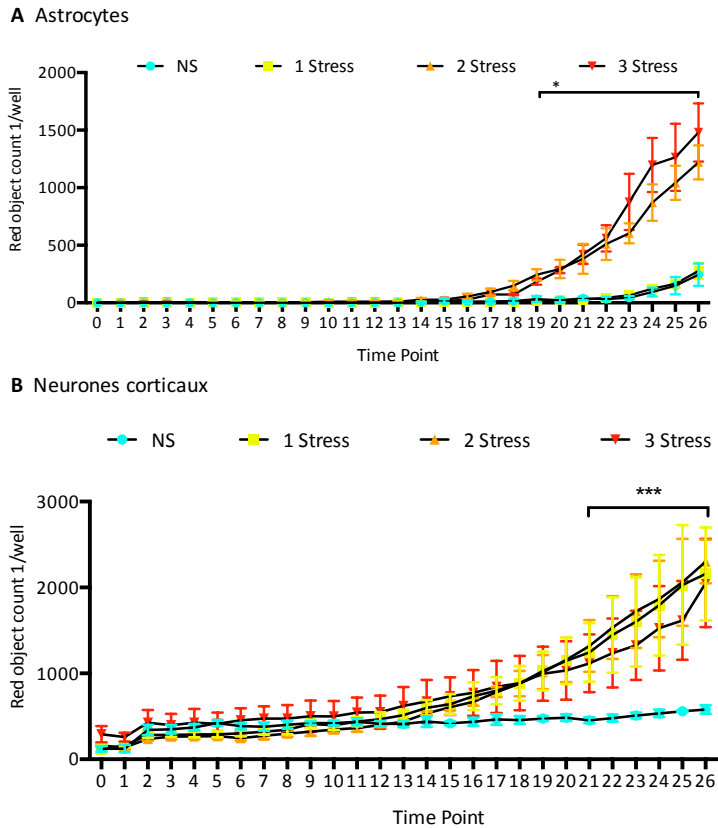


Figure 16: Viabilité des astrocytes et neurones corticaux après multiples stress.

IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System® (Essen Biosciences, Ann Arbor, MI, USA) a été utilisé pour surveiller la viabilité des cellules. Les cellules ont été déposées dans des plaques de 48 puits (astrocytes : 15 000 cellules / puits, neurones corticaux : 60 000 cellules / puits) et laissées pour adhérence à 37 ° C (astrocytes : 2 jours, neurones corticaux : 7 DIV). La mort cellulaire a été évaluée en ajoutant de l'iodure de propidium (PI : P4864, Sigma-Aldrich) dilué au 1/6000 directement dans le milieu avant les traitements au SA. Le nombre de cellules de coloration PI positives a été déterminé à chaque instant en utilisant automatiquement le logiciel d'analyse de IncuCyte S3. Les cellules ont été traitées au SA à 0.5 mM, 1h puis laissées pour récupération. Un deuxième traitement est alors effectué après un cycle entier de cinétique de GSs (3h pour les astrocytes et 5h pour les neurones corticaux. n=3. *p<0.05, ***p<0.0001 two- way anova.