Vers un marqueur biochimique des dégénérescences lobaires fronto-temporales : variations quantitatives et profils protéiques de la protéine TDP43 dans différentes matrices biologiques

Anthony Fourier

▶ **To cite this version:**

Anthony Fourier. Vers un marqueur biochimique des dégénérescences lobaires fronto-temporales : variations quantitatives et profils protéiques de la protéine TDP43 dans différentes matrices biologiques. Neurosciences. Université de Lyon, 2018. Français. ⟨NNT : 2018LYSE1269⟩. ⟨tel-02057585⟩

HAL Id: tel-02057585

https://theses.hal.science/tel-02057585v1

Submitted on 5 Mar 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

HAL Authorization

N° d'ordre NNT : 2018LYSE1269

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 476
Neurosciences et Cognition - NSCo

Spécialité de doctorat : Neurosciences
Discipline : Neurosciences cliniques

Soutenue publiquement le 30/11/2018, par :
Anthony FOURIER

Vers un marqueur biochimique des dégénérescences lobaires fronto-temporales :

Variations quantitatives et profils protéiques de la protéine TDP43 dans différentes matrices biologiques

---

Devant le jury composé de :

ZIMMER, Luc, PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1, Président

PAQUET, Claire, PU-PH, Université Paris Diderot, Rapporteure
PERRON, Hervé, PhD-HDR, GeNeuro-Innovation SAS, Rapporteur

ASSAL, Frédéric, Privat-Docent, Université de Genève, Examinateur

QUADRIO, Isabelle, PH, Hospices Civils de Lyon, Directrice de thèse
BOST, Muriel, PH-HDR, Hospices Civils de Lyon, Co-directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier vivement l'ensemble du jury pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mes travaux de recherche et de participer à la soutenance orale de ce travail de thèse.

Madame la Professeure Claire Paquet et Monsieur le Docteur Hervé Perron :

Je voudrais vous témoigner toute ma considération pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit, cette responsabilité supplémentaire et chronophage nécessitant une vigilance toute particulière de votre part

Monsieur le Privat-Docent Frédéric Assal :

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail qui, je l'espère, pourrait permettre de favoriser de futurs échanges et des collaborations fructueuses

Monsieur le Professeur Luc Zimmer :

Je vous remercie de participer à ce jury de thèse et de m'apporter vos conseils sur mes travaux de recherche mais également sur ma progression au sein de l'Université. Je suis très fier d'appartenir à votre équipe de recherche.

Madame la Docteure Muriel Bost :

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de co-encadrer ce travail de thèse et de me faire partager votre expérience méthodologique et scientifique dans le domaine de la biologie moléculaire.

Madame la Docteure Isabelle Quadrio :

Je te remercie infiniment de m'avoir proposé ce travail de thèse il y a 4 ans maintenant et pour ton encadrement quotidien. Je me sens particulièrement privilégié de pouvoir travailler dans l'Unité Fonctionnelle des Pathologies Neurodégénératives à tes côtés.

Résumé

Les dégénérescences lobaires frontotemporales (DLFT) représentent la troisième étiologie des troubles neurocognitifs chez l'adulte de moins de 65 ans. Les DLFT sont constituées d'un ensemble hétérogène de phénotypes cliniques et sont fréquemment héréditaires. Leurs particularités neuropathologiques communes reposent sur une atrophie des lobes frontaux et/ou temporaux associée à la présence d'inclusions de protéines agrégées parmi lesquelles la protéine *TAR DNA binding protein 43* (TDP43). Actuellement, aucun marqueur protéique n'est validé pour diagnostiquer les DLFT du vivant du patient.

Une cohorte de cas certains DLFT-TDP43 a été constituée grâce au développement d'outils spécifiques de diagnostic moléculaire. Une analyse des concentrations pondérales de protéine TDP43 dans le liquide cérébrospinal (LCS) a été réalisée dans cette cohorte, puis comparée à des cohortes bien caractérisées sur le plan clinique et neuropathologique. Finalement, les profils qualitatifs de la protéine TDP43 ont été étudiés dans différents compartiments accessibles du vivant du patient : les profils des formes solubles (LCS et plasma) et des formes intracellulaires (éléments figurés du sang) de la protéine TDP43 ont été comparés aux profils protéiques obtenus sur des tissus cérébraux présentant des inclusions de protéine TDP43. Les profils protéiques des culots plaquettaires présentent des similitudes avec le tissu cérébral et pourraient devenir un marqueur candidat pour le diagnostic probabiliste des DLFT.

Mots-clés

Dégénérescence lobaire frontotemporale ; Protéinopathies ; TDP43 ; C9ORF72 ;

Profils protéiques ; Criblage à haut débit ; Biomarqueurs

Abstract

Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) syndrome is the third most common etiology of presenile neurocognitive disorders. FTLD is a clinically heterogeneous syndrome and comprises many hereditary cases. Common neuropathological features rely on a degeneration of the frontal and/or anterior temporal lobes, associated to specific inclusions of aggregated proteins including *TAR DNA binding protein 43* (TDP43). Unfortunately, no practical protein marker is currently validated to improve FTLD diagnosis in living patients.

A cohort of FTLD patients with definite TDP43 pathology was defined with the development of specific genetic testing. An analysis of TDP43 concentrations in cerebrospinal fluid (CSF) was performed in this cohort and then compared to other cohorts well-characterized on clinical and neuropathological features. Finally, qualitative patterns of TDP43 were studied in compartments accessible from the patient's living: profiles of soluble TDP43 protein (in CSF or in plasma) and intracellular TDP43 protein (in the formed elements of blood) were compared to protein patterns observed in brain tissues with TDP43 protein inclusions. Platelet samples exhibit similar characteristics to brain tissue and could become a candidate biomarker for FTLD probabilistic diagnosis.

Keywords

Frontotemporal lobar degeneration; Proteinopathies; TDP43; C9ORF72;

Protein patterns; High throughput screening; Biomarkers

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES 8

LISTE DES TABLEAUX 10

LISTE DES ABREVIATIONS 11

PUBLICATIONS ASSOCIEES AU TRAVAIL DE THESE 12

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 13

1. TROUBLES NEUROCOGNITIFS ET PATHOLOGIES NEURODEGENERATIVES 14
2. LES DEGENERESCENCES LOBAIRES FRONTOTEMPORALES : TERMINOLOGIES ET PRESENTATIONS CLINIQUES 19
2.1 LA VARIANTE COMPORTEMENTALE : SYMPTOMATOLOGIE CLINIQUE 21
2.2 LES VARIANTS LANGAGIERS : SYMPTOMATOLOGIE CLINIQUE 22
2.3 PATHOLOGIES MOTRICES ASSOCIEES AUX DLFT 23
2.4 SYMPTOMATOLOGIES CLINIQUES EN FONCTION DES SOUS-TYPES DE DLFT 24
3. NEUROPATHOLOGIE DES DLFT : DES PROTEINOPATHIES 25
3.1 LA PROTEINE TDP43 26
3.2 LA PROTEINE TAU 35
3.3 LES AUTRES PROTEINES AGREGEES 42
4. GENETIQUE DES DLFT 46
4.1 MUTATIONS SUR LE GENE *MAPT* 46
4.2 MUTATIONS SUR LE GENE *GRN* 48
4.3 MUTATIONS SUR LE GENE *C9ORF72* 51
4.4 MUTATIONS SUR LE GENE *TARDBP* 54
4.5 MUTATIONS SUR LE GENE *VCP* 54
4.6 LES AUTRES MUTATIONS OBSERVEES 55

OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE 56

PARTIE I : CONSTITUTION D'UNE COHORTE DE CAS CERTAINS DE DLFT-TDP43 58

1. DEVELOPPEMENT D'OUTILS DE DIAGNOSTIC GENETIQUE DES DLFT-TDP43 59
1.1 MATERIELS ET METHODES 59
- PCR conventionnelle du gène *C9ORF72* 63
- RP-PCR du gène *C9ORF72* 65
- Southern Blot : quantification des expansions du gène *C9ORF72* 67
1.2 RESULTATS OBTENUS DANS LE CADRE DU DIAGNOSTIC MOLECULAIRE 69
2. DESCRIPTION DE LA COHORTE DE CAS CERTAINS DLFT-TDP43 75

3. LE DOSAGE DES PROTEINES PROGRANULINE ET C9ORF72 : UN OUTIL DE SCREENING PERFORMANT ? 77
3.1 MATERIELS ET METHODES 77
3.2 RESULTATS DES DOSAGES PROTEIQUES ET DISCUSSION 80

PARTIE II : VARIATIONS QUANTITATIVES DES BIOMARQUEURS DU LCS DANS LA COHORTE DE CAS CERTAINS DE DLFT-TDP43 85

1. MATERIELS ET METHODES 87
1.1 CONSTITUTION DE LA COHORTE DE PATIENTS ETUDIES 87
1.2 REALISATION DES DOSAGES 89
1.3 ANALYSES STATISTIQUES 89
2. RESULTATS ET DISCUSSION 90
2.1 LES MARQUEURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ISOLES 90
2.2 LES MARQUEURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER EN COMBINAISON 92
2.3 LES NEUROFILAMENTS 96
2.4 LA PROTEINE TDP43 TOTALE 99

PARTIE III : DETERMINATION DES PROFILS QUALITATIFS DE LA PROTEINE TDP-43 DANS DIFFERENTES MATRICES BIOLOGIQUES 104

1. MATERIELS ET METHODES 105
1.1 SELECTION ET PREPARATION DES MATRICES BIOLOGIQUES D'INTERET 105
1.2 DETERMINATION DES PROFILS QUALITATIFS 109
2. RESULTATS 118
2.1 DEVELOPPEMENT DE L'ESSAI SIMPLE WESTERN TDP43 118
2.2 LA PROTEINE TDP43 DANS LES ECHANTILLONS CEREBRAUX 123
2.3 LA PROTEINE TDP43 DANS LE LCS 130
2.4 LA PROTEINE TDP43 DANS LE SANG TOTAL 133

DISCUSSION & PERSPECTIVES 138

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 148

LISTE DES ANNEXES 171

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les six domaines neurocognitifs - d'après Sachdev, Blacker et al. 2014 14
Figure 2 : Causes de TNC d'apparition précoce (< 65 ans) et tardive (≥ 65 ans), d'après van der Flier and Scheltens 2005 17
Figure 3 : Diagnostic d'un trouble neurocognitif, Krolak-Salmon, Letrilliart et al. 2018 18
Figure 4 : Associations cliniques dans les DLFT, ... 20
Figure 5 : Proportions de patients présentant x symptômes cliniques et aucun signe clinique d'exclusion, Rascovsky, Hodges *et al.* 2011 21
Figure 6 : Atrophie du lobe frontal et du gyrus temporal supérieur plus marquée que l'atrophie pariétale et occipitale - Bigio 2013 26
Figure 7 : Structure de la protéine TDP43 - Buratti and Baralle 2012 27
Figure 8 : Modèle de métabolisme de la TDP43, dans des conditions physiologiques ou pathologiques - Huang, Bose et al. 2014 30
Figure 9 : Immunoblots anti-ubiquitine (A) et anti-TDP43 (B) réalisés sur des prélèvements cérébraux (fractions solubles dans l'urée), ... 31
Figure 10 : Caractéristiques histologiques des DLFT-TDP avec immunohistochimie TDP43, d'après Josephs, Hodges *et al.* 2011 32
Figure 11 : Classification des agrégats TDP43, d'après Lee, Porta *et al.* 2017 33
Figure 12 : Proportion des sous-types de DLFT-TDP43, ... 33
Figure 13 : A. p409/410 TDP43, couche 2 du néocortex ; B. agrégats TDP43 sous-type E, d'après Lee, Porta *et al.* 2017 34
Figure 14 : Stades de progression des inclusions de protéine TDP43 dans la variante frontale de dégénérescence lobaire fronto-temporale, d'après Brettschneider, Del Tredici *et al.* 2014 35
Figure 15 : Gène de la protéine Tau, différentes isoformes et leur structure - 37
Figure 16 : Mécanismes de dégénérescence neurofibrillaire - 39
Figure 17 : Histopathologie de la maladie de Pick - Dickson, Kouri *et al.* 2011 40
Figure 18 : Immunohistochimie Tau dans les tauopathies 4R - 41
Figure 19 : Western Blot de tissu humain cérébral - Sergeant, Delacourte *et al.* 2005 41
Figure 20 : Structure de la protéine FUS - Dormann and Haass 2011 42
Figure 21 : Associations clinico-pathologiques dans les DLFT, ... 44
Figure 22 : Représentation schématique des variants observés sur le gène MAPT - Ghetti, Oblak *et al.* 2015 47
Figure 23 : Métabolisme de la progranuline - Nguyen, Nguyen *et al.* 2013 48
Figure 24 : Aperçu des mutations sur le gène *GRN* (70 mutations présentes) - 50
Figure 25 : Transcrits du gène *C9ORF72* - Barker, Niblock *et al.* 2017 52
Figure 26 : Mutations génétiques responsables de DLFT et/ou SLA - 55
Figure 27 : Exemple de résultats obtenus avec la PCR *C9ORF72* 64
Figure 28 : Principe général de la RP-PCR, adapté de Warner, Barron *et al.* 1996 66
Figure 29 : Exemples d'un résultat positif (à gauche) et d'un résultat négatif (à droite) par la technique de RP-PCR *C9ORF72* 67
Figure 30 : A. Principe général du Southern Blot - Dreyer 2012 , B. Fragment d'ADN étudié après digestion enzymatique (entre les bases en rose) présentant la région d'hybridation de la sonde radioactive (en vert) et la zone d'intérêt (en bleu) ; C. Exemple de résultat après analyse sur le logiciel Multi Gauge Analysis 69

Figure 31 : Sélection des patients analysés et résultats obtenus pour la recherche de variants sur les gènes *GRN* et *C9ORF72* 70
Figure 32 : Résultats Alamut et Seqscape pour une patiente présentant le premier variant pathogène *GRN* 71
Figure 33 : Résultats Alamut et Seqscape pour une patiente présentant le deuxième variant pathogène *GRN* 71
Figure 34 : Distribution des allèles sains pour le gène *C9ORF72* 74
Figure 35 : Constitution de la cohorte de cas certains DLFT-TDP43 75
Figure 36 : Performances diagnostiques de la progranuline plasmatique 81
Figure 37 : Performances diagnostiques de la progranuline dans le LCS 81
Figure 38 : Performances diagnostiques de la protéine C9orf72 plasmatique 83
Figure 39 : Cohorte de patients pour l'étude des biomarqueurs du LCS 88
Figure 40 : Distribution de la protéine Tau totale (tTau) dans les 4 sous-groupes constitués (*** : $p < 0.01$) 91
Figure 41 : Distribution du ratio tTau/ Aβ 1-42 (à gauche) et du ratio pTau / tTau (à droite) dans les 4 sous-groupes constitués (*** : $p < 0.01$) 93
Figure 42 : Distribution des neurofilaments (NfL) dans les 4 sous-groupes constitués 96
Figure 43 : Distribution des NfL chez les patients DLFT-TDP43 présentant ou non une pathologie du motoneurone 99
Figure 44 : Distribution de la protéine TDP43 totale dans des cohortes de patients avec présence ou absence d'agrégats cérébraux TDP43 100
Figure 45 : Distribution de la protéine TDP43 totale chez les patients DLFT-TDP43 présentant ou non une pathologie du motoneurone 101
Figure 46 : Diagramme schématique du Western Blot - Ghosh, Gilda *et al.* 2014 111
Figure 47 : Exemple de préparation d'une plaque 114
Figure 48 : Principe de l'essai basé sur la taille des protéines - ProteinSimple® 115
Figure 49 : Détermination de la taille des protéines 116
Figure 50 : Structure de la protéine TDP43 et interactions avec les anticorps étudiés, adaptée de Vanden Broeck, Callaerts *et al.* 2014 117
Figure 51 : Profils de la protéine TDP43 recombinante 118
Figure 52 : Courbes de calibrations obtenues - Anticorps 10782-2-AP 120
Figure 53 : Profils obtenus pour une solution à 100 µg/L avec la plus faible (4 secondes) et la plus forte exposition (512 secondes) 120
Figure 54 : Profils protéiques de TDP43 endogène 121
Figure 55 : Profils WB TDP43 avec l'anticorps 10782-2-AP (cortex frontal) 123
Figure 56 : Profils WB TDP43 avec l'anticorps 12892-1-AP (cortex frontal) 125
Figure 57 : Profils WB TDP43 avec l'anticorps 22309-1-AP (cortex frontal) 126
Figure 58 : Profils WB TDP43 avec l'anticorps 2G10 (cortex frontal) 127
Figure 59 : Comparaison des profils protéiques entre Western Blot et Simple Western 128
Figure 60 : Profils SW TDP43 avec les anticorps 22309-1-AP et 2G10 (cortex frontal) 129
Figure 61 : Profils SW TDP43 avec l'anticorps 10782-2-AP (LCS) 130
Figure 62 : Profils SW TDP43 avec les anticorps 22309-1-AP et 2G10 (LCS) 132
Figure 63 : Profils TDP43 avec l'anticorps 10782-2-AP (sang total) 134
Figure 64 : Profils SW TDP43 dans le plasma 135
Figure 65 : Validation de méthode Simple Western sur échantillons plaquettaires 137

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Protéinopathies et protéines observées lors de l'examen histologique 17
Tableau II : Critères de diagnostic des 3 variants d'APP, d'après Gorno-Tempini, Hillis et al. 2011 23
Tableau III : Perturbations cognitives et comportementales dans les variantes de DLFT, ... 25
Tableau IV : Cibles de la protéine TDP43 et l'effet de cette dernière sur leur épissage (liste non exhaustive), d'après Buratti and Baralle 2012 28
Tableau V : Description des amorces utilisées pour la réalisation des PCR du gène GRN 62
Tableau VI : mix PCR GRN Tableau VII : protocole PCR GRN..... 62
Tableau VIII : mix séquence *GRN* Tableau IX : protocole séquence *GRN*..... 62
Tableau X : mix PCR *C9ORF72* Tableau XI : protocole PCR *C9ORF72*..... 64
Tableau XII : Calcul du nombre de répétitions G_4C_2 pour chaque allèle observé..... 65
Tableau XIII : mix RP-PCR *C9ORF72* Tableau XIV : protocole RP-PCR *C9ORF72*..... 66
Tableau XV : Description de la cohorte des cas certains DLFT-TDP43 : données démographiques, cliniques et disponibilité des prélèvements biologiques..... 76
Tableau XVI : Concentrations obtenues en progranuline dans le plasma et le LCS..... 81
Tableau XVII : Concentrations obtenues pour la protéine C9orf72 dans le plasma 83
Tableau XVIII : Concentrations obtenues pour les marqueurs tTau, pTau et Aβ 1-42..... 90
Tableau XIX : Résultats obtenus pour les combinaisons de marqueurs Alzheimer..... 93
Tableau XX : Concentrations obtenues pour les neurofilaments (NfL)..... 96
Tableau XXI : Concentrations obtenues pour la protéine TDP43 totale..... 100
Tableau XXII : Description des anticorps primaires utilisés dans notre étude..... 117
Tableau XXIII : Signaux obtenus (aires et hauteurs) pour des concentrations croissantes de protéine TDP43 recombinante - Anticorps 10782-2-AP 119

LISTE DES ABREVIATIONS

Aβ 1-42 : peptide amyloïde Abeta 1-42
APP : aphasie primaire progressive
AUC : Area Under the Curve
DCB : Dégénérescence Corticobasale
DLFT : Dégénérescence Lobaire Fronto-Temporale
DPR : Dipeptide Repeat Protein
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique acide
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FUS : Fused In Sarcoma
HRP : HorseRadish Peroxydase
LCS : liquide cérébrospinal
MCI : Mild Cognitive Impairment
MMSE : Mini Mental State Examination
NES : signal d'exportation nucléaire
NfL : chaîne légère des neurofilaments
NLS : signal de localisation nucléaire
PBS : phosphate buffer saline
PBS-T : phosphate buffer saline + Tween
PCR : Polymerase Chain Reaction
PSP : paralysie supranucléaire progressive
pTau : protéine Tau phosphorylée en position 181
ROC : Receiver Operating Characteristic
RP-PCR : repeat-primed PCR
SDS : sodium dodécylsulfate
SLA : sclérose latérale amyotrophique
SOD : superoxyde dismutase
SW : Simple Western
TDP43 : Transactive response DNA Binding protein 43
TMB : 3, 3', 5, 5' tétraméthylbenzidine
TNC : troubles neurocognitifs
tTau : protéine Tau totale
WB : Western Blot

PUBLICATIONS ASSOCIEES AU TRAVAIL DE THESE

- Publication internationale « C9orf72 protein plasmatic concentrations are similar between *C9ORF72* expansion carriers and non-carriers in frontotemporal dementia »

Fourier A, Formaglio M, Sauvée M, Perret-Liaudet A, Latour P, Bost M, Quadrio I.
Dement Geriatr Cogn Disord. 2018;46(3-4):180-185. doi: 10.1159/000492963.

- Communication affichée « Efficacité des biomarqueurs du LCR pour discriminer les troubles psychiatriques primaires des démences frontotemporales (DFT) - JNLF 2018

Fourier A, Formaglio M, Mollion H, Perret-Liaudet A, Sauvée M, Quadrio I.
Revue Neurologique 174 (2018). https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.01.020

- Publication internationale « Detection of CSF 14-3-3 Protein in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Patients Using a New Automated Capillary Western Assay »

Fourier A, Dorey A, Perret-Liaudet A, Quadrio I.
Mol Neurobiol. 2018 Apr;55(4):3537-3545. doi: 10.1007/s12035-017-0607-2.

- Publication internationale « Development of an automated capillary nano-immunoassay - Simple Western assay - to quantify total TDP43 protein in human platelet samples »

Fourier A, Escal J, Bernard E, Lachman I, Perret-Liaudet A, Leblanc P, Quadrio I.
Anal Bioanal Chem. 2018 Oct 29. doi: 10.1007/s00216-018-1437-4.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Troubles neurocognitifs et pathologies neurodégénératives

La cognition est la capacité des êtres vivants à assimiler et traiter des informations qui leur parviennent via différentes voies (perception, expérience, croyances...) pour les convertir en connaissances. La 5ème édition du Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux (DSM 5), rédigée par l'Association Américaine de Psychiatrie, décrit six domaines cognitifs, à savoir la mémoire et l'apprentissage, le langage, les fonctions exécutives, l'attention complexe, la cognition sociale et les fonctions perceptives et motrices. Chacun de ces 6 domaines cognitifs est constitué de sous-domaines (American Psychiatric Association 2013).

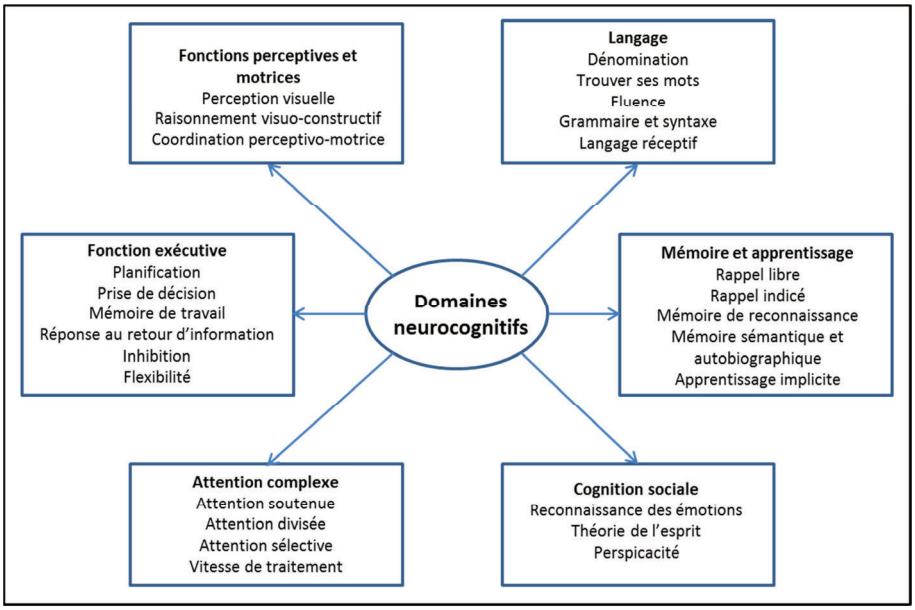


Figure 1 : Les six domaines neurocognitifs - d'après Sachdev, Blacker et al. 2014

Les troubles neurocognitifs (TNC) sont également définis dans le DSM 5 comme « une réduction acquise, significative et évolutive des capacités dans un ou plusieurs domaines cognitifs. Ce déclin cognitif est persistant, non expliqué par une dépression ou des troubles psychotiques ». On distinguera les TNC légers des TNC majeurs selon la préservation ou non de l'autonomie du patient. En effet, un TNC sera qualifié de léger si le patient présente une réduction acquise de ses capacités cognitives, objectivée lors de la réalisation d'évaluations neuropsychologiques, mais reste capable d'effectuer seul les activités de la vie quotidienne (gérer son budget, ses traitements, faire ses courses…). Le TNC

léger correspond donc au concept de « *Mild Cognitive Impairment* » ou MCI utilisé notamment dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (Albert, DeKosky et al. 2011). Il est intéressant de noter que ce stade, décrit uniquement pour le TNC lié à la maladie d'Alzheimer dans les précédentes versions du DSM, avait été décrit pour d'autres étiologies de TNC par des consensus d'experts (de Mendonca, Ribeiro et al. 2004, Meyer, Quach et al. 2005, McKeith, Boeve et al. 2017). La 5ème édition du DSM applique la classification de TNC léger à toutes les étiologies de TNC. Le TNC léger ne s'applique donc pas uniquement aux altérations de la mémoire ou des apprentissages. A l'inverse, le TNC sera qualifié de majeur si le patient n'est plus capable d'effectuer seul ces activités de la vie quotidienne et présente donc une perte d'autonomie. Le TNC majeur du DSM 5 ou l'expression « altération cognitive majeure » proposée par les associations de patients renvoient donc essentiellement à l'ancien terme « démence ». Malgré ce changement de nomenclature, ce terme reste encore largement utilisé dans la littérature.

Les troubles neurocognitifs majeurs représentent une préoccupation mondiale croissante sur le plan médical, sociétal mais aussi économique : en effet, plus de 46 millions de personnes étaient atteintes en 2015. La prévalence mondiale estimée pour les TNC serait de 132 millions en 2050. La raison principale à l'origine de cette forte augmentation de prévalence est l'allongement de l'espérance de vie, notamment dans les pays à revenus faibles et moyens, associé à une augmentation des pathologies chroniques (Alzheimer's Disease International 2015). En parallèle, certaines études observeraient une diminution de sa prévalence en Europe et aux Etats-Unis, grâce à une prise en charge plus adaptée des TNC et de leurs facteurs de risque (Grasset, Brayne et al. 2016). De nombreuses étiologies de TNC existent ou coexistent, et leur diagnostic précoce et fiable est crucial car ce dernier conditionne le pronostic et la thérapeutique proposée. Certains TNC sont curables ou potentiellement réversibles : ils représentent moins de 20 % de la totalité des TNC et sont plus fréquemment rencontrés chez les patients de moins de 65 ans (Weytingh, Bossuyt et al. 1995).

Il n'existe aucun traitement curatif des autres TNC. Dans ce groupe, on retrouvera les TNC vasculaires, représentant environ 20 % de la totalité des TNC. La prévalence de cette pathologie est estimée entre 1 et 4 % des patients âgés de plus de 65 ans et double par la suite tous les 5 à 10 ans (Hebert and Brayne 1995). De nombreux facteurs de risque sont à l'origine de TNC vasculaires, parmi lesquels le diabète de type 2, l'athérosclérose, les coronaropathies,

des anomalies du bilan lipidique, la consommation de tabac ou encore certaines étiologies héréditaires (McVeigh and Passmore 2006). Ces facteurs de risque peuvent entraîner une dysfonction endothéliale liée à une augmentation du stress oxydatif, une activation de l'inflammation ou encore une hypoxie tissulaire, causant alors des lésions de la substance blanche.

Une grande proportion de TNC est caractérisée par un ensemble vaste de maladies neurologiques, avec des phénotypes cliniques et neuropathologiques hétérogènes (Przedborski, Vila et al. 2003). Ces TNC présentent cependant un mécanisme physiopathologique commun, soit l'accumulation et l'agrégation de protéines mal conformées, à l'origine d'une amyloïdose progressive du système nerveux central (Forman, Trojanowski et al. 2004). Ces protéines sont présentes chez les individus sains sous forme de monomères solubles, et vont, dans certaines circonstances pathologiques, subir un changement conformationnel formant des oligomères qui pourront ensuite s'agréger en polymères insolubles. Ce mécanisme est défini par le concept de « protéinopathie » (Bayer 2015). La protéinopathie la plus fréquente est la maladie d'Alzheimer qui constitue la principale étiologie des TNC. La première description pathologique, réalisée en 1906 sur le cerveau de Mme Auguste D. par le Docteur Alzheimer, associait une atrophie cérébrale globale à la présence de plaques séniles extracellulaires dans le cortex cérébral et de dégénérescences neurofibrillaires (Dahm 2006). En 1912, le Docteur Lewy décrivait des inclusions éosinophiles dans les neurones d'un patient atteint de la maladie de Parkinson et mettait en évidence la signature des pathologies à corps de Lewy, deuxième cause de protéinopathie chez l'adulte de plus de 65 ans (Engelhardt and Gomes 2017). Des dizaines d'années plus tard furent identifiées les protéines anormalement agrégées dans ces pathologies, à savoir les peptides amyloïdes et la protéine Tau hyperphosphorylée dans la maladie d'Alzheimer ainsi que l'alphasynucléine dans les démences à corps de Lewy (Clinton, Blurton-Jones et al. 2010). Les dégénérescences lobaires frontotemporales ou DLFT constituent un groupe singulier de protéinopathies car différentes protéines agrégées peuvent être à l'origine de mêmes présentations cliniques. Les DLFT représentent la deuxième protéinopathie et la troisième étiologie des TNC chez l'adulte de moins de 65 ans, avec une incidence estimée dans différents pays européens entre 4 et 30 pour 100 000 (Luukkainen, Bloigu et al. 2015). Enfin, il existe d'autres protéinopathies moins fréquentes comme la maladie de Huntington ou la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Lee, Lim et al. 2011).

Le tableau I récapitule les protéinopathies décrites dans le DSM5 ainsi que les protéines mises en évidence dans ces pathologies lors de l'examen neuropathologique :

Protéinopathie	Protéine(s) mise(s) en évidence
Maladie d'Alzheimer	Tau hyperphosphorylée et peptides amyloïdes
Maladie à corps de Lewy	Alphasynucléine
Maladie de Parkinson	Alphasynucléine
Dégénérescence lobaire fronto-temporale	TDP43 ou Tau ou FUS principalement
Maladie de Huntington	Huntingtine

Tableau I : Protéinopathies et protéines observées lors de l'examen histologique
TDP43 : TAR DNA binding protein 43 ; FUS : Fused in Sarcoma protein

La figure 2 récapitule les principales étiologies des TNC d'apparition précoce (chez l'adulte de moins de 65 ans) et tardive (chez l'adulte de plus de 65 ans) :

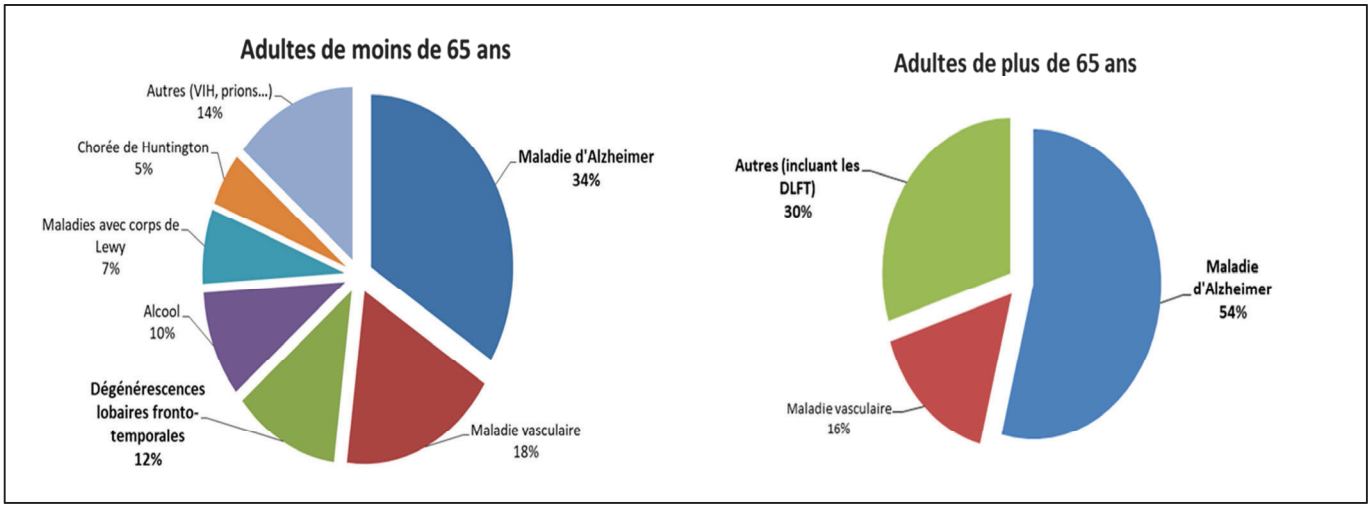
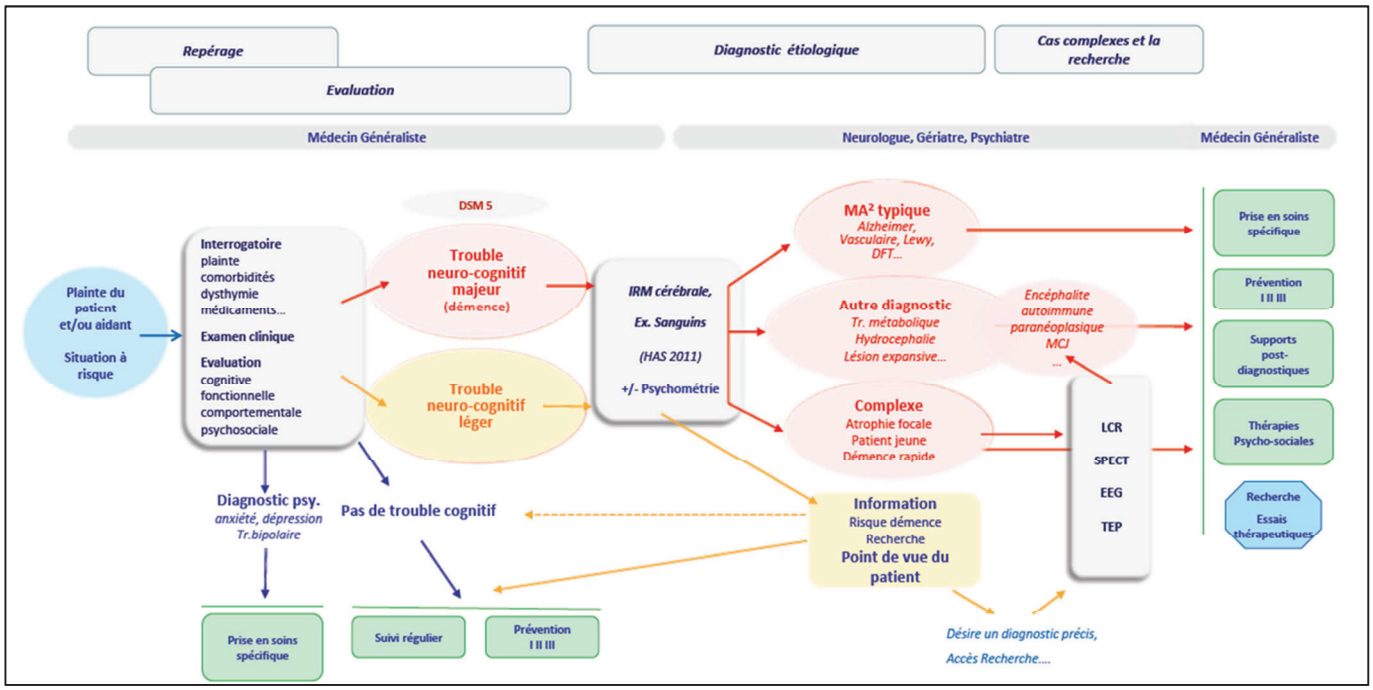


Figure 2 : Causes de TNC d'apparition précoce (< 65 ans) et tardive (≥ 65 ans), d'après van der Flier and Scheltens 2005

La figure 3 présente la démarche diagnostique globale pour un TNC. Ce dernier est multidisciplinaire et débutera généralement par la plainte d'un patient et/ou d'un aidant auprès d'un médecin généraliste. Après la réalisation d'un interrogatoire complet et d'un examen clinique, le médecin généraliste adressera le patient auprès d'un médecin spécialiste des TNC (neurologue, gériatre ou psychiatre) et proposera différents examens paracliniques comme des tests sanguins et de l'imagerie (notamment une imagerie par résonance magnétique IRM). Le médecin spécialiste proposera un diagnostic étiologique du TNC, en s'appuyant notamment sur l'interprétation des précédents examens et sur la réalisation de tests psychométriques.

Dans les cas complexes (présence d'une atrophie focale, en présence d'un patient jeune ou encore face à un TNC d'évolution rapide), des examens complémentaires pourront être prescrits. Ces derniers peuvent comprendre l'étude des marqueurs biologiques du liquide cérébrospinal - LCS - ou des examens d'imagerie plus spécifiques, permettant de mettre en évidence les lésions identifiées lors de l'examen neuropathologique des patients (Jack, Bennett et al. 2018). Les marqueurs du LCS, comprenant notamment la protéine Tau totale, sa forme hyperphosphorylée en position 181 et le peptide amyloïde Aβ1-42, ne sont pas réalisés pour les formes typiques des TNC, mais permettent de renforcer la probabilité diagnostique dans les présentations cliniques complexes (Mouton-Liger, Wallon et al. 2014, Troussiere, Wallon et al. 2014).



<u>Figure 3</u> : Diagnostic d'un trouble neurocognitif, Krolak-Salmon, Letrilliart et al. 2018

L'objectif de la démarche diagnostique est alors de proposer au patient un projet de santé, incluant une prise en charge spécifique pour la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées ou dans le cadre d'un TNC curable. Des interventions non-médicamenteuses (orthophonie, psychologue, aides à domicile…) seront également proposées au patient. Finalement des mesures de prévention pourront être mises en place comme la prise en charge de potentiels facteurs de risque ou encore des prescriptions médicamenteuses appropriées.

Malheureusement, il n'existe aucun traitement curatif des TNC d'étiologie neurodégénérative. Des traitements symptomatiques comme les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (donépézil, rivastigmine, galantamine) ou l'inhibiteur glutamatergique (mémantine) peuvent être prescrits. Cependant, d'après l'opinion de la Haute Autorité de Santé, leur bénéfice faible et la présence de nombreux effets secondaires a récemment conduit à leur déremboursement en France malgré l'opposition des spécialistes et des associations de patients (Krolak-Salmon, Dubois et al. 2018).

2. Les dégénérescences lobaires frontotemporales : terminologies et présentations cliniques

Les dégénérescences lobaires frontotemporales (DLFT) représentent un groupe hétérogène de maladies neurodégénératives dont le point commun est d'affecter principalement la partie antérieure des lobes frontaux et/ou temporaux du cerveau (Josephs 2007). Ces régions cérébrales sont le siège chez l'homme des fonctions de régulation du comportement social, des prises d'initiatives, de la génération et de l'analyse des émotions. Les lobes frontaux et temporaux gauches sont également très impliqués dans le langage, chez les sujets droitiers notamment.

La terminologie « DLFT » regroupe donc différents syndromes cliniques cognitifs prototypiques (Neary, Snowden et al. 1998) : la variante comportementale de la dégénérescence frontotemporale et trois troubles du langage regroupés sous le terme générique d'aphasie progressive primaire, à savoir le variant sémantique, le variant non fluent/agrammatique et le variant logopénique. Par ailleurs, ces troubles neurocognitifs sont potentiellement associés à des pathologies motrices comme la paralysie supranucléaire progressive, la sclérose latérale amyotrophique ou des pathologies mixtes motrices/cognitives comme le syndrome corticobasal (Josephs 2007, Irwin, Cairns et al. 2015). La prévalence globale des DLFT a été estimée entre 15 et 22 / 100 000 personnes dans une étude rétrospective de Onyike *et al*. Cette étude soulignait également la difficulté de déterminer avec précision la prévalence des DLFT face à des pathologies rares, dont les populations à

risques étaient larges et pour lesquelles le diagnostic reposait sur des cliniciens experts (Onyike and Diehl-Schmid 2013).

La figure 4 détaille ces différents syndromes cliniques ainsi que leur prévalence en France (la prévalence de chaque variant a été estimée à partir des données recueillies sur les sites d'associations de patients) :

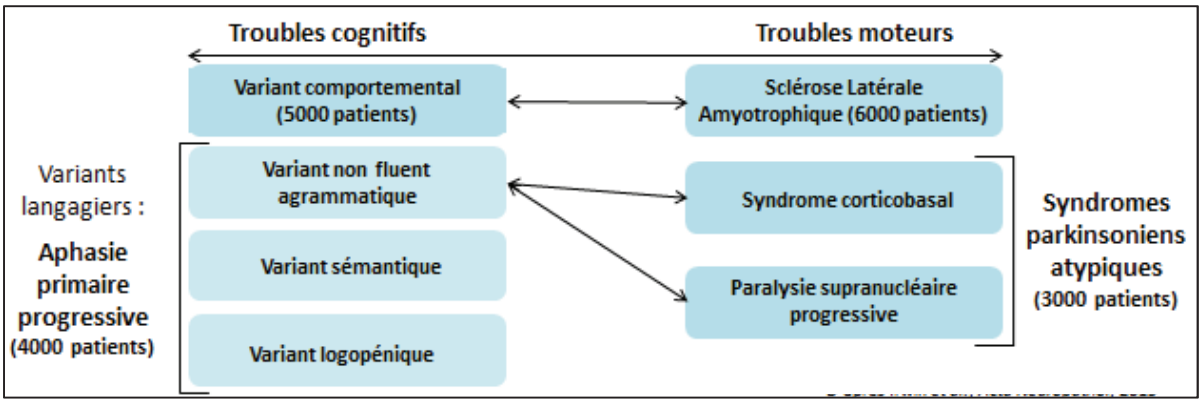


Figure 4 : Associations cliniques dans les DLFT, d'après Irwin, Cairns *et al.* 2015

A l'instar de la maladie de Creutzfeldt-Jacob ou de la maladie d'Alzheimer, le diagnostic de DLFT repose sur différents degrés de probabilité. Une DFLT sera possible si le patient présente certains symptômes cliniques (dont le nombre peut varier en fonction des différents sous-types). La probabilité pourra être renforcée par des examens paracliniques concordants (notamment en imagerie), rendant alors ce diagnostic probable. Enfin, le diagnostic de DLFT sera certain uniquement lorsqu'un examen neuropathologique positif ou la présence d'une mutation pathogénique connue seront associés à ces symptômes cliniques (Gorno-Tempini, Hillis et al. 2011, Rascovsky, Hodges et al. 2011).

L'analyse des marqueurs biochimiques du LCS peut être proposée pour renforcer le diagnostic de maladie d'Alzheimer du vivant du patient (Mouton-Liger, Wallon et al. 2014, Blennow, Dubois et al. 2015). Malheureusement, il n'existe aucun marqueur biochimique validé à ce jour pour le diagnostic ou le suivi des patients atteints de DLFT (Feneberg, Gray et al. 2018).

2.1 La variante comportementale : symptomatologie clinique

La variante comportementale du TNC frontotemporal est le variant le plus fréquent et serait responsable de 60% des cas de DLFT (Onyike and Diehl-Schmid 2013). Sa prévalence est estimée à environ 15 cas pour 100 000 habitants (Piguet and Hodges 2013), soit plus de 5000 patients en France (Boutoleau-Bretonniere, Lebouvier et al. 2014). Le sex-ratio de ce variant est de 1 et l'âge médian des patients au moment du diagnostic est de 63 ans : il s'agit donc du variant le plus précoce et/ou diagnostiqué le plus précocement dans les DLFT (Coyle-Gilchrist, Dick et al. 2016). Les symptômes cliniques observés sont très variés et le diagnostic de variant comportemental de DLFT repose actuellement sur les critères révisés par Rascovsky *et al* (Rascovsky, Hodges et al. 2011).

Les patients peuvent présenter une désinhibition comportementale (comportement inadapté, perte des convenances sociales), une apathie ou une inertie, une perte d'empathie ou de sympathie, la présence de comportements rituels ou stéréotypés (moteurs ou langagiers), une hyperoralité ou une modification du régime alimentaire ou bien encore un profil dysexécutif objectivé par un bilan neuropsychologique, avec préservation de la mémoire et des fonctions visuospatiales (Boutoleau-Bretonniere, Vercelletto et al. 2013). La présence récurrente d'au moins 3 de ces symptômes comportementaux ou cognitifs permet de proposer un diagnostic possible de variant comportemental.

La figure 5 détaille le nombre de symptômes présents parmi les 176 cas de variante comportementale de l'étude de Rascovsky *et al.* :

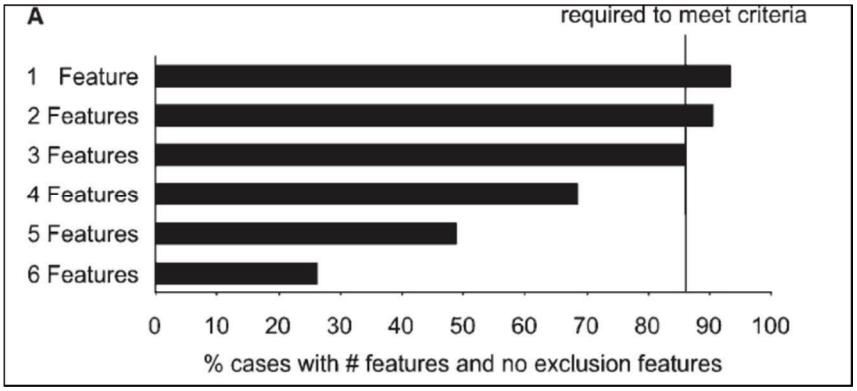


Figure 5 : Proportions de patients présentant x symptômes cliniques et aucun signe clinique d'exclusion, Rascovsky, Hodges *et al.* 2011

La sensibilité de ces critères était de 86% : en effet 14% patients présentaient un ou deux critères cliniques seulement. La spécificité de ces critères n'est pas parfaite non plus : environ 40% des patients atteints de variante comportementale ou dysexécutive de maladie d'Alzheimer présenteraient au moins 3 de ces critères diagnostiques (Ossenkoppele, Pijnenburg et al. 2015). Actuellement, le diagnostic de variant comportemental reste encore difficile à poser. Du fait des changements comportementaux, un diagnostic de pathologie psychiatrique primitive (troubles bipolaires, schizophrénie) serait posé pour plus de 50% des patients atteints du variant comportemental (Woolley, Khan et al. 2011). Par ailleurs, des troubles de la mémoire prédominants dès la phase débutante pourraient orienter vers une forme comportementale de maladie d'Alzheimer (Hodges, Davies et al. 2004). Le diagnostic de variant comportemental probable associera en plus aux signes cliniques précédemment décrits une perte d'autonomie et la présence d'anomalies compatibles à l'imagerie, qu'elles soient morphologiques (atrophie frontale ou temporale) ou fonctionnelles (hypoperfusion/hypométabolisme frontal ou temporal).

2.2 Les variants langagiers : symptomatologie clinique

L'aphasie primaire progressive regroupe différents variants entravant le langage, fonction essentielle de la cognition. On estime la prévalence de l'APP à 7 pour 100 000 habitants, soit environ 4000 patients en France (Teichmann 2010). Un diagnostic d'APP sera évoqué si le symptôme clinique principal concerne le langage, que ce trouble est présent dès le début de l'instauration de la maladie, qu'il reste le principal déficit dans les phases initiales de la maladie et qu'il est à l'origine d'une perturbation des activités de la vie quotidienne (Mesulam 2001). Les critères actuellement retenus pour le diagnostic des variants de l'aphasie primaire progressive sont ceux proposés par Gorno-Tempini *et al* en 2011, associant des critères majeurs et mineurs (Gorno-Tempini, Hillis et al. 2011).

Le tableau II détaille les différents signes cliniques et les anomalies observées à l'imagerie pour les variantes d'APP permettant de poser un diagnostic de ces pathologies :

	Forme sémantique	Forme non-fluente/agrammatique	Forme logopénique
Critères majeurs	Manque du mot en dénomination sur confrontation visuelle **ET** Troubles de la compréhension du mot isolé	Agrammatisme **OU** Discours hésitant, demandant un effort, avec des erreurs phonétiques	Manque du mot dans le discours spontané ou en dénomination **ET** Trouble de la répétition des phrases
Critères mineurs	**3 signes sur 4 parmi :** Perte des connaissances sur les objets **OU** Dyslexie ou dysgraphie de surface **OU** Préservation de la répétition **OU** Préservation de la grammaire	**2 signes sur 3 parmi :** Trouble de la compréhension des phrases de complexité syntaxique élevée **OU** Préservation de la compréhension des mots uniques **OU** Préservation des connaissances sur les objets	**3 signes sur 4 parmi :** Paraphasies phonémiques dans le discours spontané et en dénomination **OU** Préservation de la compréhension des mots uniques et des connaissances sur les objets **OU** Préservation des aspects moteurs du langage **OU** Pas d'agrammatisme
Imagerie	Atrophie ou hypoperfusion hypométabolisme au niveau **temporal antérieur**	Atrophie ou hypoperfusion hypométabolisme au niveau **fronto-insulaire postérieur gauche**	Atrophie ou hypoperfusion hypométabolisme au niveau **pariétal ou périsylvien postérieur gauche**

<u>Tableau II</u> : Critères de diagnostic des 3 variants d'APP, d'après Gorno-Tempini, Hillis et al. 2011

2.3 Pathologies motrices associées aux DLFT

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la pathologie dégénérative du motoneurone la plus fréquente, avec une prévalence estimée à 6 pour 100 000 cas (Talbott, Malek et al. 2016). Elle est liée à une dégénérescence des neurones moteurs centraux et périphériques. La plupart des patients (67 %) présentent initialement une forme spinale de la maladie (faiblesse musculaire focale des membres supérieurs ou inférieurs, généralement asymétrique). L'autre forme d'entrée dans la maladie est bulbaire, avec une dysarthrie et une hypersialorrhée. L'évolution est de 3 à 5 ans en moyenne et l'atteinte des muscles respiratoires cause généralement le décès du patient (Wijesekera and Leigh 2009). Le diagnostic de cette pathologie repose généralement sur les critères d'El Escorial révisés, associant des critères

cliniques comme le nombre de régions touchées et l'évolutivité des lésions à des critères paracliniques comme l'électrophysiologie ou l'histopathologie (Brooks 1994, Ludolph, Drory et al. 2015). On estime que 50% des patients atteints de sclérose latérale amyotrophique présentent un déficit cognitif : 15 % des patients présenteraient notamment les critères de trouble neurocognitifs frontotemporal (Ringholz, Appel et al. 2005). A l'inverse, 5 à 10% des patients atteints de DLFT développeraient des signes cliniques de sclérose latérale amyotrophique (Ferrari, Kapogiannis et al. 2011).

La paralysie supranucléaire progressive et le syndrome corticobasal appartiennent aux syndromes parkinsoniens atypiques (résistance à la Lévodopa), avec des prévalences respectives de 5 à 10 / 100 000 et de 1 / 100 000 personnes (Levin, Kurz et al. 2016). La paralysie supranucléaire progressive (PSP) est habituellement caractérisée par une triade associant un trouble du contrôle volontaire de l'oculomotricité, un trouble postural de l'axe du corps et de la marche entraînant des chutes et un syndrome cognitivo-comportemental de type frontal avec une apathie au premier plan (Levy 2011). Le syndrome corticobasal correspond à une entité clinicopathologique, caractérisée par la présence de troubles moteurs et cognitifs en relation avec des lésions histopathologiques spécifiques (Felician, Koric et al. 2009). Cette pathologie dégénérative affecte des structures sous-corticales, notamment des ganglions de la base. L'atteinte motrice est généralement asymétrique, et peut se traduire par une rigidité, une akinésie, des myoclonies et des troubles de la marche.

2.4 Symptomatologies cliniques en fonction des sous-types de DLFT

Le tableau III décrit la prévalence des perturbations cognitives et comportementales dans les différentes variantes de DLFT :

	bvFTD n = 90	**PNFA** n = 15	**SD** n = 16	**PSP** n = 6	**CBD** n = 2	**FTD-MND** n = 4
Perte de mémoire	33	12	13	4	1	2
Désinhibition	58	6	12	0	1	2
Apathie/inertie	34	6	10	2	2	1
Perte d'empathie	30	1	4	2	0	1
Désordres obsessionnels	23	4	4	1	0	0
Changements alimentaires	24	1	2	1	0	1
Hallucinations	14	0	2	1	0	1
Perturbations du langage	28	15	16	1	0	2

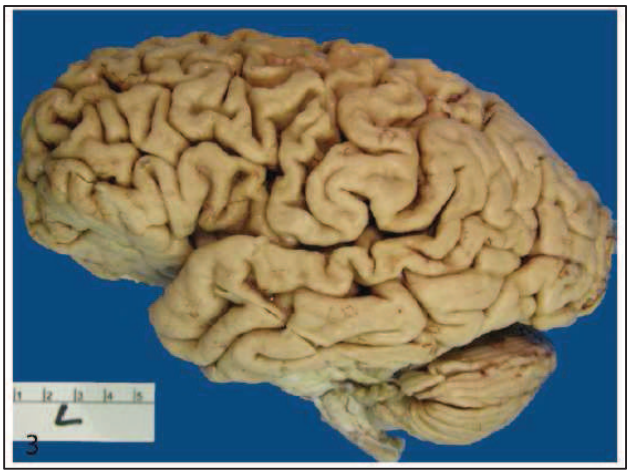
Tableau III : Perturbations cognitives et comportementales dans les variantes de DLFT, d'après Shi, Liu *et al.* 2017

bvFTD : variante comportementale ; SD : démence sémantique ; PNFA : aphasie non fluente agrammatique ; CBD : dégénérescence corticobasale ; FTD-MND : variante comportementale associée à des troubles moteurs

Cette étude montre la fréquence largement inférieure des troubles mnésiques dans la variante comportementale (37%) par rapport aux aphasies primaires progressives (25/31 = 81%). La désinhibition correspond au signe clinique le plus fréquent dans la variante comportementale (64%). Les perturbations du langage, comprises dans les critères diagnostiques des aphasies primaires progressives, sont présentes pour 31% des patients souffrant de variante comportementale.

3. Neuropathologie des DLFT : des protéinopathies

L'examen macroscopique du cerveau des patients atteints de DLFT mettra en évidence une atrophie plus marquée au niveau des lobes frontaux et/ou temporaux, en comparaison des autres régions cérébrales (Bigio 2013).



<u>Figure 6</u> : Atrophie du lobe frontal et du gyrus temporal supérieur plus marquée que l'atrophie pariétale et occipitale - Bigio 2013

Sur le plan microscopique, les DLFT appartiennent aux « protéinopathies ». Ce concept est relativement récent et provient de la mise en évidence de protéines spécifiques agrégées aux propriétés physico-chimiques altérées dans la plupart des maladies neurodégénératives (Bayer 2015, Kovacs 2016). Une analyse immuno-histochimique permettra de déterminer la nature de la/des protéine(s) agrégée(s) ainsi que la localisation et la structure des agrégats, permettant de proposer une classification moléculaire des DLFT (Mackenzie and Neumann 2016). Parmi les différentes protéines mises en évidence, la prévalence des agrégats de deux protéines est particulièrement élevée : la protéine TDP43 et la protéine Tau (Irwin, Trojanowski et al. 2013, Mackenzie and Neumann 2016). D'autres protéines agrégées peuvent également être rencontrées, mais avec une fréquence nettement inférieure : les protéines FUS « Fused In Sarcoma » et SOD « SuperOxyde Dismutase » (Seelaar, Klijnsma et al. 2010, Bennion Callister and Pickering-Brown 2014).

3.1 La protéine TDP43

La protéine TDP43, de nom complet *transactive response DNA binding protein 43 kDa*, a été découverte en 2006 comme la principale protéine agrégée dans les inclusions ubiquitine positives, tau et alphasynucléine négatives dans le système nerveux des patients souffrant de DLFT ou de SLA (Neumann, Sampathu et al. 2006). Ce chapitre détaillera le métabolisme et les fonctions physiologiques de cette protéine ainsi que la structure des agrégats TDP43 observables par des techniques d'immunohistochimie.

3.1.1 Métabolisme et fonctions de la protéine TDP43

La protéine TDP43 est codée par le gène *TARDBP (TAR DNA-binding protein 43)*. Ce gène est localisé sur le bras court du chromosome 1 - localisation cytogénétique : 1p36.22 - et contient 6 exons (Kabashi, Valdmanis et al. 2008). Ce gène est fortement conservé à travers l'évolution et retrouvé chez toutes les espèces d'eucaryotes supérieurs. Cinq des 6 exons du gène *TARDBP* codent pour la protéine TDP43, protéine ubiquitaire de 414 acides aminés appartenant à la classe des ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires ou hnRNPs. Toutes ces protéines contiennent 2 motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM) et une région riche en glycines (pour la protéine TDP43, cette région se situe à la toute fin de son domaine C-terminal aux alentours de l'acide aminé 400) permettant des interactions avec d'autres hnRNPS et assurant une partie de leur activité biologique. Les motifs de reconnaissance de l'ARN présentent une forte homologie entre les espèces, à la différence du domaine C-terminal riche en glycines (Sephton, Good et al. 2010). La protéine TDP43 contient également un signal de localisation nucléaire bipartite : NLS1 et NLS2 composés des acides aminés K82RK84 et K95VKR98 respectivement (Ayala, Zago et al. 2008). Finalement, cette protéine possède un signal d'exportation nucléaire NES (acides aminés 239 à 250) et un domaine riche en asparagines et glutamines dans sa partie C-terminale, lui conférant des propriétés prion-like (Fuentealba, Udan et al. 2010, Udan and Baloh 2011). La figure 7 détaille la structure de la protéine TDP43 et met en évidence les régions d'intérêt de cette protéine :

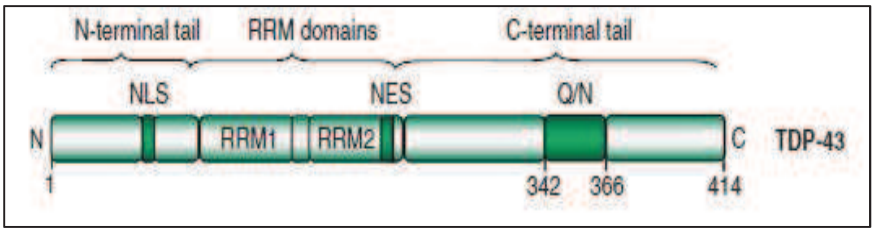


Figure 7 : Structure de la protéine TDP43 - Buratti and Baralle 2012
NLS : signal de localisation nucléaire ; NES : signal d'exportation nucléaire ;
RRM : motifs de reconnaissance de l'ARN ; Q/N : région riche en asparagines et glutamines

La protéine TDP43 effectue des navettes entre le noyau d'une cellule (sa localisation préférentielle) et son cytoplasme grâce aux signaux NLS et NES. Elle est capable de se lier aux ARN présentant des motifs UG répétés, lui permettant notamment d'assurer son rôle dans la transcription et l'épissage alternatif des pré-ARN messagers (Dormann and Haass 2011,

Buratti and Baralle 2012). Cette fonction dans l'épissage alternatif de ces différents ARN est réalisée notamment grâce à ses acides aminés N-terminaux, lui permettant de former des homodimères (Zhang, Caulfield et al. 2013). La protéine TDP43 peut ainsi augmenter ou inhiber l'épissage de différentes cibles (tableau IV) :

Gènes/exons avec inhibition d'épissage	Gènes/exons avec augmentation d'épissage
CTFR/exon 9	*BRCA1*/exon 12
ApoAII/exon 3	*SKAR*/exon 3
ETF1/exon 7	*MAPT*/exon 10
RXRG/exon 7	

Tableau IV : Cibles de la protéine TDP43 et l'effet de cette dernière sur leur épissage (liste non exhaustive), d'après Buratti and Baralle 2012

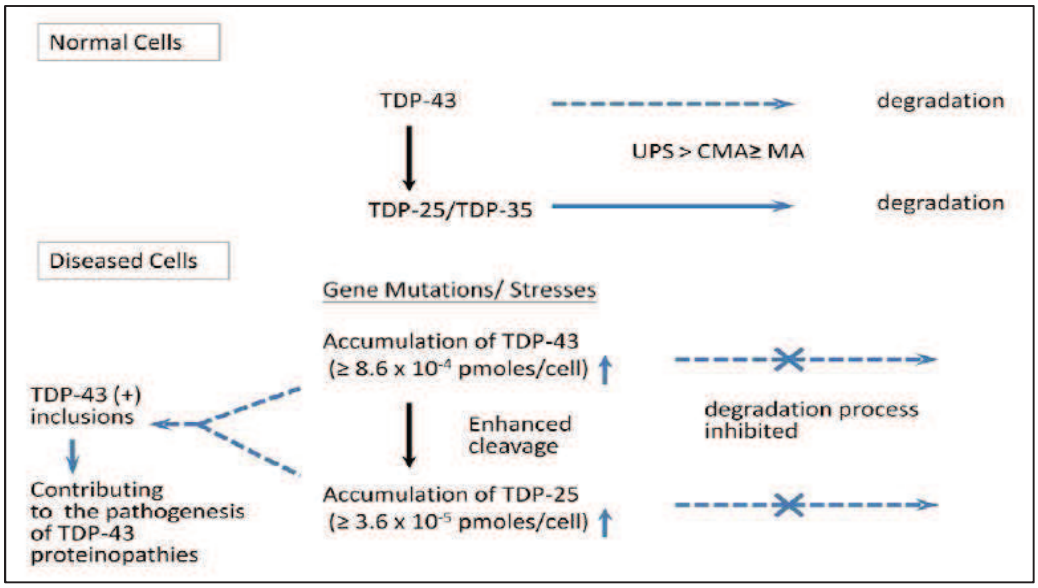
La protéine TDP43 intervient aussi dans la régulation de la transcription du virus HIV-1 (son nom provient d'ailleurs du fait qu'elle se lie à l'élément de réponse de trans-activation de ce dernier) et stabilise certains ARN messagers (Buratti and Baralle 2008). De manière notable, on pourra citer la fixation de la protéine TDP43 au transcrit de l'isoforme de bas poids moléculaire des neurofilaments *hNFL*, prévenant ainsi sa dégradation. Des agrégats de neurofilaments étant observés chez les patients atteints de SLA, on peut s'interroger sur un lien entre ces agrégats et une altération de fonction de la protéine TDP43 dans cette pathologie (Strong, Volkening et al. 2007).

La protéine TDP43 peut subir différentes modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles la génération de fragments C-terminaux, la phosphorylation ou encore l'ubiquitination. Ces principaux mécanismes sont à l'origine de modifications des propriétés physico-chimiques ou biologiques de la protéine : stabilité, localisation subcellulaire, interactions avec des protéines ou des ARN, et enfin sa clairance (Buratti 2018). La présence de fragments C-terminaux présentant des masses apparentes d'environ 25 et 35 kDa est l'une des modifications principales observées dans les agrégats de protéine TDP43. La plupart des études ont considéré l'origine de ces fragments comme étant la conséquence d'une protéolyse de la protéine TDP43 totale. En effet, la protéine TDP43 est naturellement clivée afin de permettre son élimination. Les caspases 3 et 7 génèrent 3 fragments différents d'environ 42, 35 et 25 kDa *in vitro* (Zhang, Xu et al. 2007). Les calpaïnes peuvent également cliver la protéine TDP43 (Yamashita, Hideyama et al. 2012). D'autres hypothèses sur l'origine de ces fragments ont émergé par ailleurs, impliquant un potentiel épissage alternatif ou encore une différence dans le codon initiateur de la traduction (Nishimoto, Ito et al. 2010, Xiao, Sanelli et

al. 2015). Les fragments C-terminaux obtenus perdent leur signal de localisation nucléaire - NLS -, la conséquence directe étant une altération des navettes entre le noyau et le cytoplasme de la cellule. Par ailleurs, ces fragments favorisent l'agrégation de la protéine TDP43 totale et sont toxiques pour la cellule (Zhang, Xu et al. 2009).

La seconde modification majeure observée dans les agrégats est la phosphorylation de la protéine TDP43. Elle présente 64 sites potentiels de phosphorylation, principalement localisés dans la partie C-terminale de la protéine. Différentes enzymes peuvent entraîner la phosphorylation de TDP43 parmi lesquelles la caséine-kinase 1, responsable entre autre de la phosphorylation des sérines en position 403/404 et 409/410 (Kametani, Nonaka et al. 2009). La phosphorylation de la protéine TDP43 est l'une des premières modifications post-traductionnelles mises en évidence sur tissu cérébral de patient atteint de DLFT ou SLA (Hasegawa, Arai et al. 2008). D'autres kinases comme la caséine kinase 2, les Tau tubuline kinases 1 et 2 ou encore la protéine kinase α1 activée par l'AMP sont également impliquées dans ces différents processus de phosphorylation (Liu, Ju et al. 2015, Taylor, McMillan et al. 2018). A l'inverse, la protéine TDP43 phosphorylée en position 409/410 peut subir l'action de phosphatases comme la calcineurine ou la protéine phosphatase 1 (Liachko, Saxton et al. 2016, Gu, Wang et al. 2018). Les conséquences de la phosphorylation sont toujours en cours d'étude, mais cette dernière influencerait la solubilité et la demi-vie de la protéine dans l'espace cellulaire, favorisant son agrégation (Yamashita, Teramoto et al. 2016).

La protéine intacte et ses différents fragments C-terminaux sont dégradés par différents mécanismes selon des proportions variables : le système ubiquitine/protéasome, l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes et la macroautophagie. L'ubiquination des agrégats dans les DFT ou SLA était d'ailleurs le marqueur utilisé pour le diagnostic de ces pathologies avant la découverte de la protéine TDP43 (Ikeda and Tsuchiya 2004). Dans certaines conditions pathologiques liées à un stress ou à des mutations génétiques, les processus de dégradation physiologique de la TDP43 et des fragments semblent inhibés. Par ailleurs, le clivage de la forme intacte de la protéine en ses fragments C-terminaux est augmenté (25 kDa principalement et 35 kDa). La diminution de la dégradation de la protéine TDP43 et de ses fragments associée à une augmentation de clivage de la TDP43 en TDP25 seraient à l'origine des agrégats cytoplasmiques observés en pathologie (Huang, Bose et al. 2014).



<u>Figure 8</u> : Modèle de métabolisme de la TDP43, dans des conditions physiologiques ou pathologiques - Huang, Bose et al. 2014
TDP25/TDP35 : TDP43 de 25 kDa et 35 kDa ; UPS : système ubiquitine/protéasome ; CMA : autophagie médiée par des protéines chaperonnes ; MA : macroautophagie

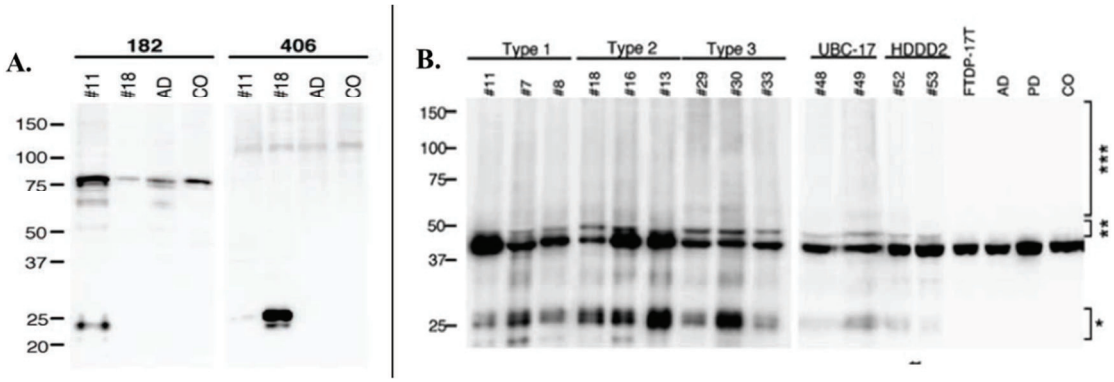
Une des difficultés majeures est de savoir dans quel ordre séquentiel surviennent ces différentes modifications post-traductionnelles et de développer des modèles - cellulaires ou animaux - qui puissent conjuguer ces dernières afin de se rapprocher le plus possible du métabolisme physiologique et/ou pathologique de la protéine TDP43.

3.1.2 Morphologie et localisation des agrégats protéiques TDP43

Depuis la découverte des agrégats cérébraux de protéine TDP43 en 2006, la morphologie de ces derniers est utilisée afin de proposer des classifications neuropathologiques des DLFT-TDP. En effet, différentes structures peuvent être observées lors de l'analyse immunohistochimique des prélèvements cérébraux et il existe des liens entre la structure des agrégats et certains phénotypes cliniques.

L'étude de Neumann *et al.* présentait des résultats de profils protéiques des agrégats marqués à la fois avec des anticorps anti-ubiquitine et anti-TDP43 (Neumann, Sampathu et al. 2006). Les anticorps anti-ubiquitine mAbs 182 et mAbs 406 mettaient en évidence différentes bandes. Parmi elles, des bandes à 24 et 26 kDa étaient présentes chez les patients DLFT-U

(lignes #11 et #18), et absentes chez les patients AD (maladie d'Alzheimer) et CO (contrôle) (Figure 9A).

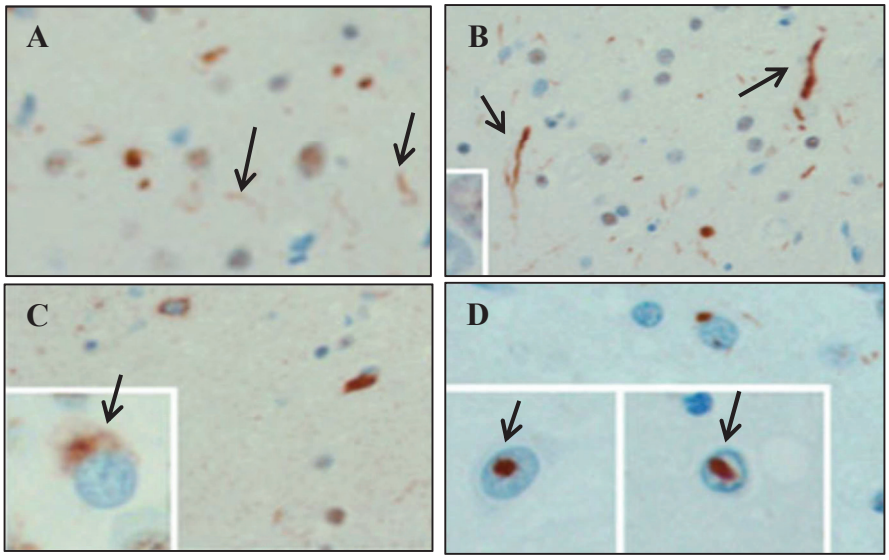


<u>Figure 9</u> : Immunoblots anti-ubiquitine (A) et anti-TDP43 (B) réalisés sur des prélèvements cérébraux (fractions solubles dans l'urée), d'après Neumann, Sampathu *et al.* 2006

Le profil biochimique de prélèvements hippocampiques ou temporaux de patients atteints de DLFT-U mettaient également un profil spécifique en comparaison de différents témoins avec un anticorps anti-TDP43. Des bandes pathologiques à environ 25 kDa (*), 45 kDa (**) et un *smear* correspondant à un marquage traînant et diffus de la membrane (***), étaient observées chez les patients DLFT-U (Figure 9B). Ces bandes n'étaient pas observées dans les prélèvements de patients FTDP-17T (DLFT associée à une mutation sur le gène de la protéine Tau), AD (maladie d'Alzheimer), PD (maladie de Parkinson) et CO (contrôle).

La morphologie des agrégats TDP43 a été étudiée par deux équipes en parallèle, chacune ayant alors proposé une classification des DLFT-TDP basée sur des techniques d'immunohistochimie (Mackenzie, Baborie et al. 2006, Sampathu, Neumann et al. 2006). Dans un souci d'harmonisation, les deux classifications immunohistochimiques ont alors été regroupées dans un travail ultérieur afin de faciliter l'intégration et la comparaison des données neuropathologiques au sein des études internationales (Mackenzie, Neumann et al. 2011). Cette nouvelle classification de 2011 sera donc la base de travail de ce chapitre.

Des neurites dystrophiques de petite taille et fins, ainsi que d'autres de plus grande taille et épaisses peuvent être observés. On retrouvera également des inclusions neuronales cytoplasmiques et intranucléaires (figure 10).



<u>Figure 10</u> : Caractéristiques histologiques des DLFT-TDP avec immunohistochimie TDP43, d'après Josephs, Hodges *et al.* 2011

Neurites dystrophiques de petite taille (A) ou de taille plus grande (B), inclusions neuronales cytoplasmiques (C) et inclusions neuronales intranucléaires (D)

Les différents types de la classification de Mackenzie incluent à la fois la morphologie des agrégats de la protéine TDP43 agrégée mais aussi leur localisation dans les différentes couches corticales. Le type A associera préférentiellement de nombreuses inclusions neuronales cytoplasmiques et des neurites dystrophiques de petite taille. Le type B mettra en évidence des inclusions intra neuronales cytoplasmiques de manière quasi exclusive. Le type C présentera de longues neurites dystrophiques, avec très peu d'inclusions neuronales cytoplasmiques. Enfin, le type D est caractérisé par la présence d'inclusions intranucléaires lentiformes et de très rares inclusions cytoplasmiques. Les inclusions des types A et C sont majoritairement superficielles (dans la couche corticale 2 notamment) alors que les inclusions des types B et D sont observables dans les couches superficielles et profondes du cortex cérébral. Enfin, de rares inclusions oligodendrogliales curvilinéaires sont observables dans la substance blanche pour les sous-types A et B (Lee, Porta et al. 2017). La figure 11 reprend les principales caractéristiques des 4 sous-types A à D de la classification de Mackenzie de 2011.

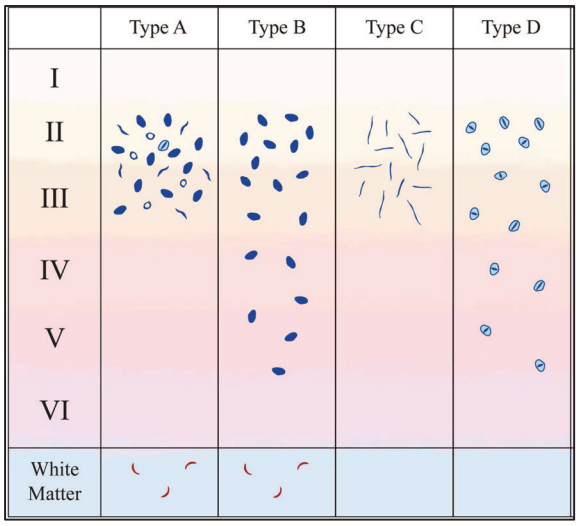


Figure 11 : Classification des agrégats TDP43, d'après Lee, Porta *et al.* 2017

L'étude clinico-pathologique réalisée sur 4 cohortes de patients (au total 200 patients atteints de DLFT) dont le typage pour la protéine TDP43 était positif a permis de définir la prévalence de chacun des sous-types (figure 12). A noter que l'étude de ces 4 cohortes de patients n'avait mis en évidence aucun sous-type D (Josephs, Hodges et al. 2011).

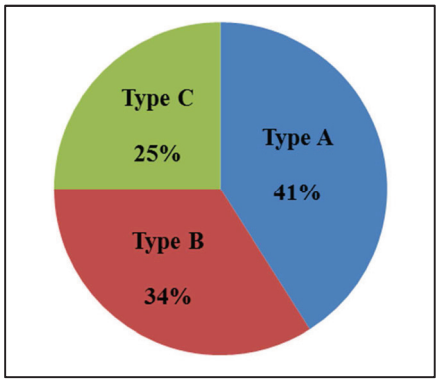


Figure 12 : Proportion des sous-types de DLFT-TDP43, d'après Josephs, Hodges *et al.* 2011

Récemment, une étude histopathologique de 7 patients atteints de DLFT et dont l'évolution clinique avait été très rapidement défavorable (décès dans les 3 ans suivant l'apparition des signes cliniques) a mis en évidence un nouveau profil d'agrégation TDP43, sous forme d'inclusions granulofilamenteuses neuronales - GFNI - et de grains abondants dans les couches corticales superficielles et profondes. Par ailleurs, de nombreuses inclusions

oligodendrogliales curvilinéaires sont présentes dans la matière blanche pour ce nouveau sous-type baptisé E.

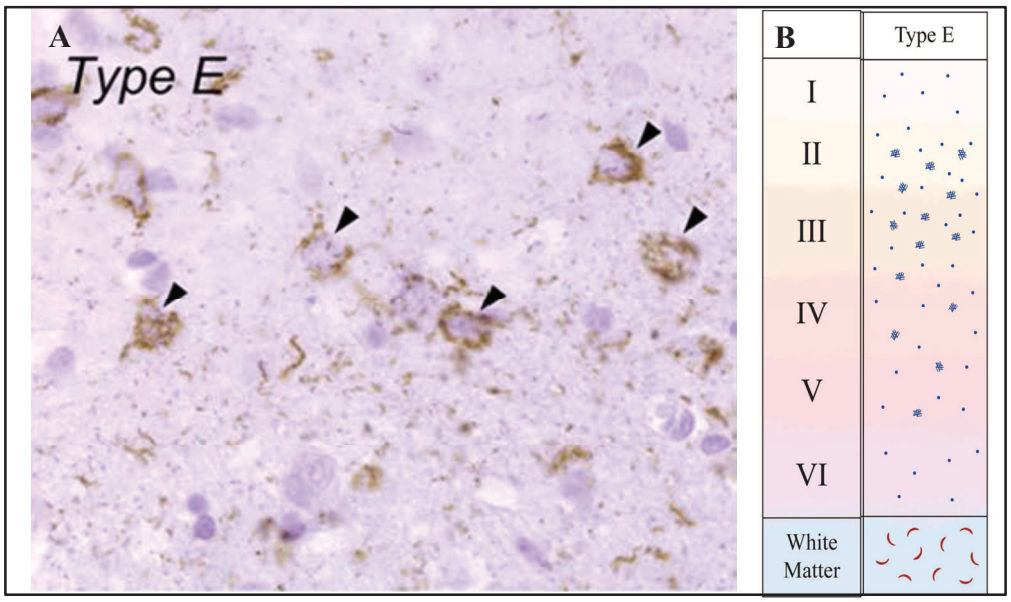
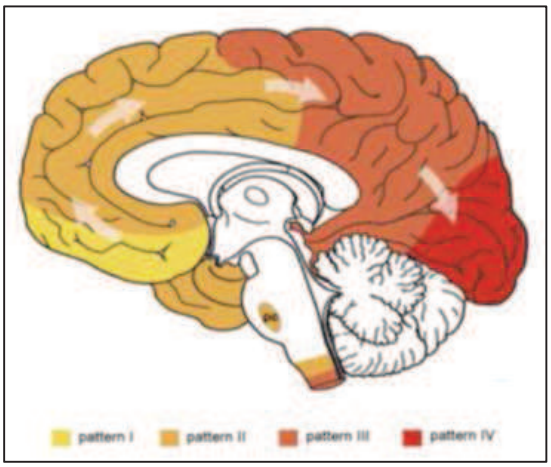


Figure 13 : A. p409/410 TDP43, couche 2 du néocortex ; B. agrégats TDP43 sous-type E, d'après Lee, Porta *et al.* 2017

Différents stades de progression des inclusions de la protéine TDP43 au niveau du système nerveux central ont été décrits, permettant de définir des régions d'intérêt pour l'analyse immunohistochimique. Les mécanismes de dissémination des formes pathologiques de la protéine TDP43 sont toujours en cours d'étude. Certaines équipes proposent une transmission de cellule à cellule entre sous-types cellulaires voisins dans le système nerveux central (Kanouchi, Ohkubo et al. 2012, Jucker and Walker 2013). Cependant, des observations de Brettschneider *et al*. mettraient plutôt en avant un phénomène de dissémination axonale, expliquant la présence d'agrégats dans les oligodendrocytes à proximité des axones des neurones porteurs d'inclusions et à l'inverse des cellules voisines du soma neuronal indemnes de lésions (Brettschneider, Del Tredici et al. 2014). Dans cette étude regroupant 39 cas de variante frontale autopsiés, 4 stades de progression avaient été identifiés. Le stade I, présentant les dépôts les plus modérés, mettait en évidence des agrégats de protéine TDP43 phosphorylée sur les portions basales et antérieures du néocortex préfrontal. Le stade II incluait en plus des lésions dans des zones plus caudales et une atteinte de la face médiale du lobe frontal. Le stade III ajoutait aux deux premiers stades des lésions dans les aires de Brodmann 4 et 6, définissant le cortex moteur primaire et l'aire prémotrice, et dans le cortex pariétal. Finalement, les cas avec la plus grande quantité d'inclusions de protéine TDP43 présentaient des agrégats au niveau du cortex occipital (stade IV). La figure 14 illustre

la progression des lésions TDP43 et les 4 stades neuropathologiques associés proposés dans cette étude.



<u>Figure 14</u> : Stades de progression des inclusions de protéine TDP43 dans la variante frontale de dégénérescence lobaire fronto-temporale, d'après Brettschneider, Del Tredici *et al.* 2014

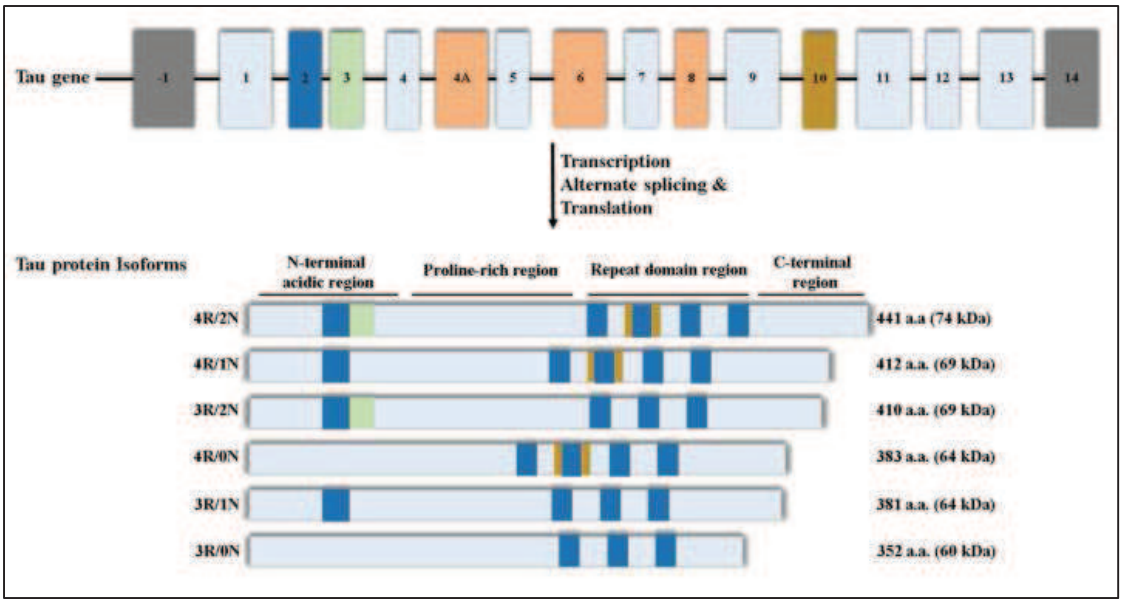
La même équipe avait également analysé la progression des inclusions de protéine TDP43 pour 76 patients atteints de sclérose latérale amyotrophique. Une nouvelle fois, 4 stades de progression avaient été proposés. Le stade I était caractérisé cette fois par la présence d'agrégats de protéine TDP43 dans les aires de Brodmann 4 et 6 (cortex moteur), le stade 2 incluait en plus des agrégats dans le cortex préfrontal (gyrus frontal médian et formation réticulée). Le stade 3 incluait des lésions additionnelles du cortex préfrontal, dans le gyrus rectus et dans les gyri orbitaux. Finalement, le stade 4 reposait sur la présence supplémentaire d'agrégats dans le cortex temporal antéromédial et dans l'hippocampe (Brettschneider, Del Tredici et al. 2013).

3.2 La protéine Tau

La protéine Tau est la deuxième protéine agrégée dans les DLFT par ordre de fréquence. L'objectif de ce chapitre est de présenter le métabolisme de la protéine Tau et ses principales fonctions physiologiques. Nous verrons également la structure et la composition des agrégats de protéine Tau dans les DLFT-Tau.

3.2.1 Métabolisme et fonctions de la protéine Tau

La protéine Tau est codée par le gène *MAPT (Microtubule Associated Protein Tau)*. Ce gène est localisé sur le bras long du chromosome 17 - localisation cytogénétique : 17q21.3 - et est composé de 16 exons (Bukar Maina, Al-Hilaly et al. 2016). La protéine Tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules et est abondamment exprimée dans le système nerveux central avec une prédominance pour les neurones, bien qu'on la retrouve en faible quantité dans les cellules gliales (LoPresti, Szuchet et al. 1995). Elle est également exprimée (à un niveau plus faible) dans les tubules rénaux et les poumons notamment (Mietelska-Porowska, Wasik et al. 2014). Six isoformes de la protéine Tau sont exprimées dans le cerveau humain adulte : ces isoformes proviennent d'un épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 du gène *MAPT*. Les isoformes naturelles de Tau sont appelées 3R ou 4R selon le nombre de domaines de liaison aux microtubules de la protéine, à savoir 3R en présence de 3 domaines codés par les exons 9, 11 et 12 et 4R en présence de 4 domaines codés par les exons 9, 10, 11 et 12. Par ailleurs, l'inclusion isolée de l'exon 2 ou l'inclusion conjointe des exons 2 et 3 se traduit par l'ajout d'inserts N-terminaux (N1 ou N1 + N2) sur les protéines Tau 3R et 4R (Brunden, Trojanowski et al. 2009). L'épissage est régulé au cours du développement : lors de la vie fœtale, seule l'isoforme de Tau la plus courte (3R0N) est exprimée. Un cerveau adulte exprimera les 6 isoformes de Tau précédemment décrites selon des proportions variables. Enfin, il est intéressant de noter qu'il existe également un épissage alternatif des exons 4A, 6 et 8. Ces exons sont inclus dans les ARN messagers des tissus périphériques, mais non retrouvés dans le système nerveux central.



<u>Figure 15</u> : Gène de la protéine Tau, différentes isoformes et leur structure - Bukar Maina, Al-Hilaly *et al.* 2016

Dans le système nerveux central, on retrouve autant de protéines Tau 3R que de Tau 4R (le rapport est de 1). La distribution entre les formes 0N (exclusion des exons 2 et 3), 1N (inclusion de l'exon 2) et 2N (inclusion des exons 2 et 3) varie quant à elle : les formes majoritaires sont les formes 1N (environ 50 %), suivies des formes 0N (environ 40 %). La forme 2N est très minoritaire (Trabzuni, Wray et al. 2012).

La partie C-terminale de la protéine Tau, appelée domaine d'assemblage, contient les domaines de liaison aux microtubules, permettant ainsi l'assemblage et la stabilisation de ces derniers. Les microtubules appartiennent au cytosquelette neuronal et assurent donc le maintien de la structure cellulaire. Les isoformes 4R, grâce à un domaine supplémentaire de liaison aux microtubules, interagissent plus fortement avec ces derniers que les isoformes 3R (Mietelska-Porowska, Wasik et al. 2014). La partie N-terminale de la protéine Tau, est constituée d'une région acide (d'autant plus en présence des acides aminés provenant de l'épissage des exons 2 et 3) et est appelée domaine de projection. Cette partie de la protéine est responsable de l'espacement entre les microtubules dans les dendrites et les axones (Chen, Kanai et al. 1992). Enfin, la région centrale de la protéine riche en prolines est capable d'interagir avec d'autres protéines comme la spectrine et les filaments d'actine, permettant une association entre les microtubules ou encore la membrane plasmique (Buee, Bussiere et al. 2000). Les fonctions de la protéine Tau sont donc majoritairement axonales : en régulant la

dynamique microtubulaire tout d'abord, mais également en modulant le transport axonal rétrograde et antérograde par interaction avec la kinésine et la dynéine (Dixit, Ross et al. 2008). La protéine Tau exerce également certaines fonctions nucléaires comme le maintien de l'intégrité des acides nucléiques (Sultan, Nesslany et al. 2011). Finalement, d'autres études attribueraient à la protéine Tau un rôle dans la régulation de l'activité synaptique, bien qu'elle soit présente en plus faible quantité dans ce compartiment (Kimura, Whitcomb et al. 2014).

Tout comme la protéine TDP43, la protéine Tau subit de nombreuses modifications post-traductionnelles, la plus étudiée étant la phosphorylation. La protéine Tau contient 51 sites potentiels de phosphorylation, situés préférentiellement dans le domaine riche en prolines et la région C-terminale encadrant les domaines de liaison aux microtubules (Morris, Knudsen et al. 2015). Une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau est à l'origine d'une diminution d'affinité de liaison aux microtubules, entraînant alors leur déstabilisation (Mietelska-Porowska, Wasik et al. 2014). De plus, cet état d'hyperphosphorylation est à l'origine d'une diminution de solubilité de la protéine Tau. En effet, les agrégats de protéine Tau appelés PHF (paired helicoidal filaments) contiennent majoritairement des formes phosphorylées (Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986). La troncation, deuxième modification post-traductionnelle similaire à celles observées pour la protéine TDP43, peut survenir suite à l'action de nombreuses enzymes comme les caspases, les calpaïnes ou encore les aminopeptidases. Ces fragments ainsi générés ont également la possibilité de s'agréger, à moins qu'ils ne soient dégradés par le système ubiquitine/protéasome ou par autophagie (Chesser, Pritchard et al. 2013). Finalement, d'autres modifications post-traductionnelles sont observées sur la protéine Tau, parmi lesquelles la glycosylation ou l'acétylation (Morris, Knudsen et al. 2015).

La figure 16 détaille les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la dégénérescence neurofibrillaire, aboutissant à la perte neuronale et aux altérations cognitives. La protéine Tau devient anormalement phosphorylée, par augmentation de l'activité des kinases et diminution parallèle de l'affinité de certaines phosphatases. Cette protéine hyperphosphorylée ne peut plus se lier correctement aux microtubules, entraînant leur désorganisation, puis la dégénérescence neuronale. Dans le même temps, la protéine Tau hyperphosphorylée séquestre la protéine Tau et les autres protéines associées aux

microtubules, formant les PHF et les dégénérescences neurofibrillaires. En grandissant, ces agrégats pourraient favoriser la lyse neuronale.

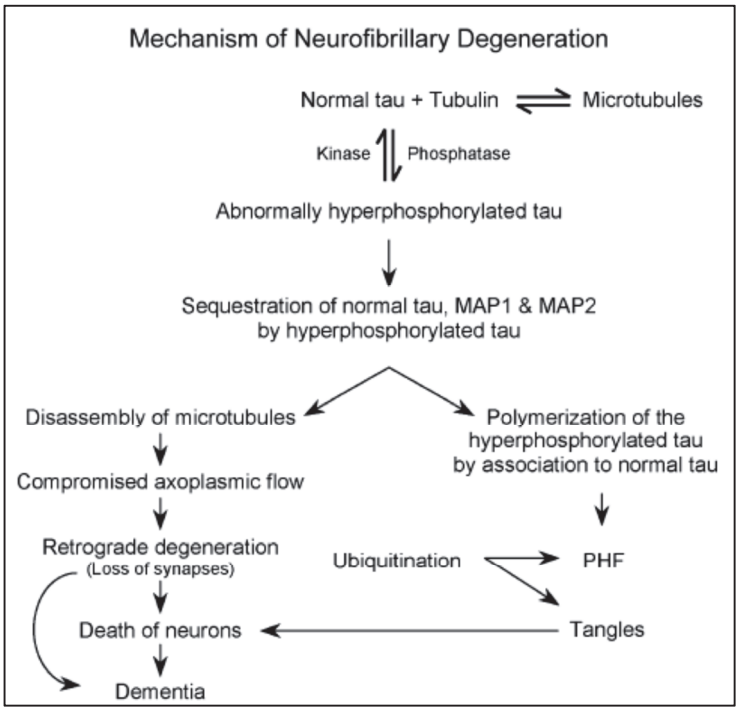


Figure 16 : Mécanismes de dégénérescence neurofibrillaire - Iqbal, Alonso Adel *et al.* 2005

3.2.2 Morphologie et localisation des agrégats protéiques Tau

La morphologie et la composition des agrégats de protéine Tau est une nouvelle fois utilisée afin de proposer des classifications neuropathologiques des DLFT-Tau. Il existera en effet des liens entre la structure des agrégats et certains phénotypes cliniques. Physiologiquement, le rapport entre Tau 3R (3 domaines de liaison aux microtubules) et Tau 4R (4 domaines de liaison aux microtubules) est de 1. Dans la maladie d'Alzheimer, ce ratio est conservé dans les agrégats observés (Goedert, Spillantini et al. 1989). L'analyse des isoformes 3R et 4R est capitale pour la classification neuropathologique des DLFT-Tau. Dans certaines pathologies, les agrégats de protéine Tau contiendront autant de Tau 3R que de Tau 4R. A l'inverse, on retrouvera des agrégats constitués uniquement de Tau 3R ou de Tau 4R dans d'autres phénotypes cliniques, mettant en évidence un déséquilibre de production entre les différentes isoformes (Munoz, Dickson et al. 2003). La distribution cellulaire de la protéine Tau (neuronale, gliale ou mixte) est également étudiée (Kovacs 2016).

Les agrégats de protéine Tau 3R, appelés corps de Pick, correspondent à des inclusions neuronales cytoplasmiques (NCIs) compactes, rondes et argyrophiles (colorés suite à un traitement par un sel d'argent). Ils sont majoritairement localisés dans le néocortex (couches II à IV), dans le gyrus denté et dans l'hippocampe (Kovacs, Rozemuller et al. 2013). Des cellules de Pick (neurones ballonnés) peuvent également être rencontrées.

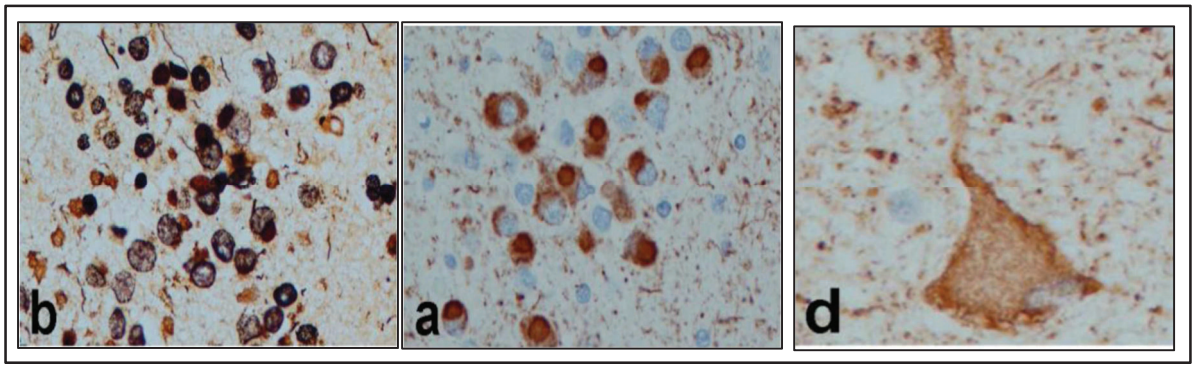
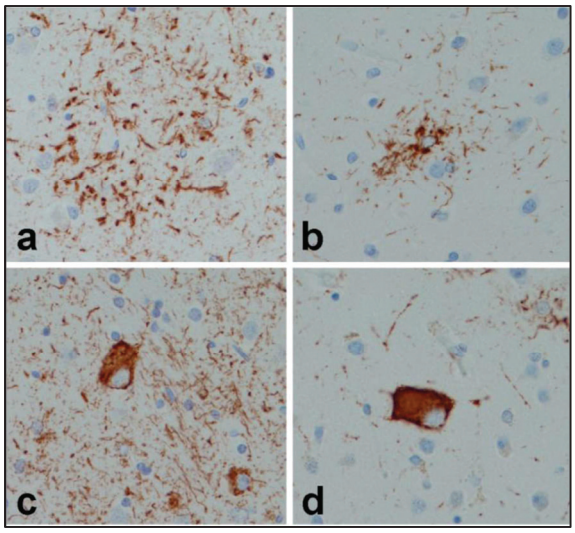


Figure 17 : Histopathologie de la maladie de Pick - Dickson, Kouri *et al.* 2011
De gauche à droite : corps de Pick (coloration à l'argent de Bielschowsky) ; corps de Pick (immunohistochimie Tau) ; cellules de Pick (immunohistochimie Tau)

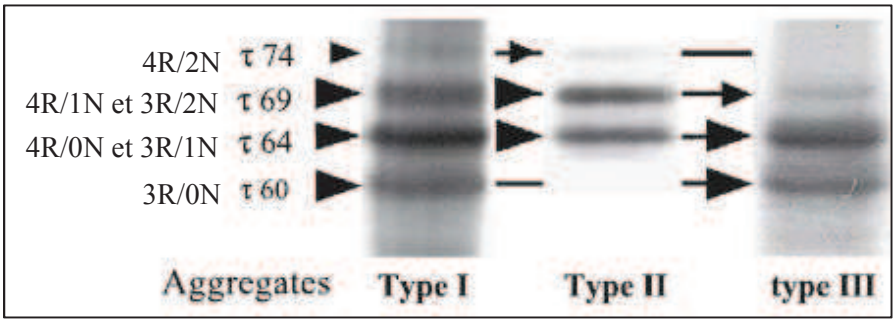
Les agrégats de protéine Tau 4R sont constitués d'inclusions neuronales mais également d'inclusions astrocytaires. Dans la PSP, des dégénérescences neurofibrillaires ont été initialement décrites dans des régions sous-corticales (comme les ganglions de la base), le tronc cérébral et le cervelet. Par la suite, ces inclusions ont également été observées dans le cortex préfrontal et temporal inférieur ou encore le cortex moteur primaire. Des plaques astrocytaires en étoile sont également observées (Buee, Bussiere et al. 2000). La lésion histopathologique la plus spécifique de la dégénérescence corticobasale est la plaque astrocytaire en couronne (différente de celle en étoile de la PSP). Les inclusions neuronales sont pléomorphes et on peut retrouver des neurones ballonnés comme dans la maladie de Pick. Les lésions dans la DCB sont observées dans le cortex, les ganglions de la base ou la substance blanche (Dickson, Kouri et al. 2011).



<u>Figure 18</u> : Immunohistochimie Tau dans les tauopathies 4R - Dickson, Kouri *et al.* 2011

a. Plaques astrocytaires en couronne dans la DCB ; b. Plaques astrocytaires en étoile dans la PSP ; c. Inclusion neuronale dans la DCB ; d. Inclusion neuronale dans la PSP

L'analyse du profil biochimique de tissus cérébraux humains par électrophorèse puis Western Blot permet de confirmer la nature des agrégats Tau observés en immunohistochimie.



<u>Figure 19</u> : Western Blot de tissu humain cérébral - Sergeant, Delacourte *et al.* 2005

Nature des agrégats. Type I : 4 bandes à 60, 64, 69 et 74 kDa ;
Type II : 2 bandes principales à 64 et 69 kDa ; Type III : 2 bandes principales à 60 et 64 kDa

Le type I correspond à l'ensemble des six isoformes cérébrales de la protéine Tau et se rencontre *a priori* lors du vieillissement cérébral physiologique (individus âgés de plus de 75 ans), mais également dans la maladie d'Alzheimer ou dans certaines formes de démences frontotemporales associées à un syndrome parkinsonien (cette entité est liée à des mutations

du gène *MAPT*). Le type II correspond aux tauopathies 4R alors que le type III correspond aux tauopathies 3R (Sergeant, Delacourte et al. 2005).

3.3 Les autres protéines agrégées

De manière moins fréquente que pour les protéines TDP43 et Tau, d'autres protéines peuvent être mises en évidence dans des inclusions chez des patients atteints de DLFT. Ce paragraphe permettra de décrire brièvement le métabolisme et les fonctions de ces protéines, ainsi que la nature des agrégats observés.

3.3.1 La protéine FUS

La protéine FUS (pour *Fused In Sarcoma*) est une protéine de 526 acides aminés codée par le gène *FUS* - localisation cytogénétique : 16p11.2 - qui est composé de 15 exons. Cette protéine appartient à la famille des ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires ou hnRNPS, comme la protéine TDP43. Elle possède donc certaines homologies de structure avec cette dernière.

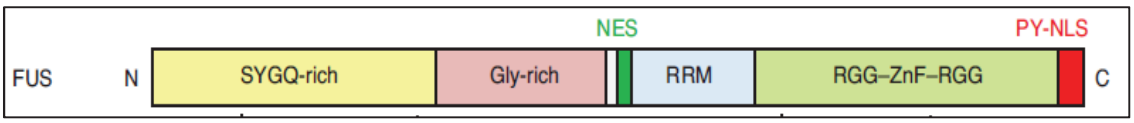


Figure 20 : Structure de la protéine FUS - Dormann and Haass 2011

La protéine FUS possède un signal de localisation nucléaire (NLS) et un signal d'exportation nucléaire (NES). La partie N-terminale de la protéine FUS, riche en acides aminés sérine, tyrosine, glycine et glutamine, contient un domaine d'activation de la transcription. Les autres domaines de la protéine, à savoir son motif de reconnaissance de l'ARN (RRM), le domaine riche en glycine et le domaine C-terminal contenant un doigt de zinc sont tous impliqués dans la liaison aux ARN (Dormann and Haass 2011). Les fonctions de la protéine FUS décrites à ce jour sont donc le transport et la traduction des ARN messagers, l'épissage et l'expression des gènes. Des modifications post-traductionnelles de la

protéine FUS ont été mises en évidence, parmi lesquelles nous pouvons à nouveau citer la phosphorylation et l'ubiquitination (Rhoads, Monahan et al. 2018).

3.3.2 La protéine SOD

Environ 20 % des formes génétiques de SLA (environ 1 % de l'ensemble des SLA) sont dues à des mutations du gène *SOD1*, localisé sur le chromosome 21. Ce gène code pour la protéine cuivre-zinc superoxyde dismutase, une enzyme anti-oxydante. Le développement de la pathologie serait dû à la présence de ces mutants de la protéine SOD1 ainsi générés, plutôt qu'au déficit de la protéine SOD1 physiologique - mécanisme de gain de fonction - (Valentine, Doucette et al. 2005).

Il semblerait que des inclusions de SOD1 ayant subi des modifications post-traductionnelles soient mises en évidence chez les patients atteints de forme génétique *SOD1* de la SLA bien sûr, mais également dans un certain nombre de SLA sporadiques. Ces inclusions n'auraient pas été mises en évidence auparavant par manque de sensibilité des techniques et de la très difficile mise en évidence d'une très faible quantité de l'isoforme mal conformée par rapport à la forme normale, bien plus abondante (phénomène de masquage) (Steinacker, Berner et al. 2014).

3.3.3 La pathologie Alzheimer

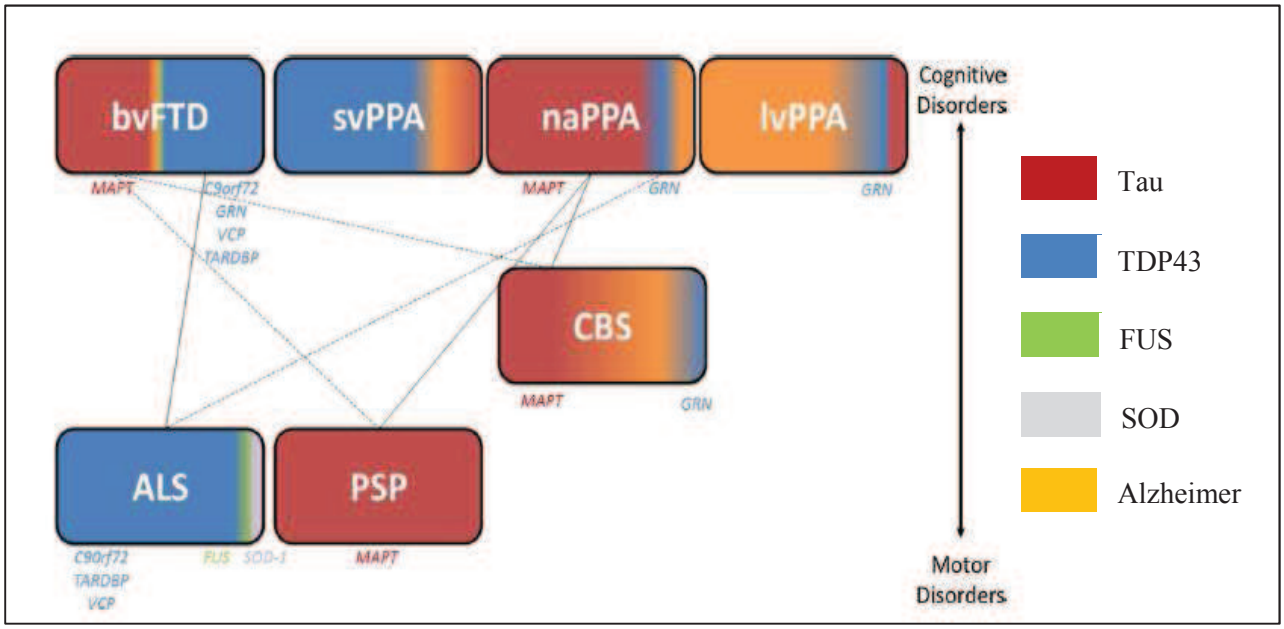
Les inclusions observées dans certains sous-types cliniques de DLFT sont superposables à ce que l'on peut observer chez les patients souffrant de maladie d'Alzheimer. L'examen neuropathologique mettra ainsi en évidence des dépôts extracellulaires de fibrilles amyloïdes Aβ - dans le parenchyme sous forme de plaques ou dans la paroi vasculaire dans l'angiopathie amyloïde cérébrale - associés à une accumulation intraneuronale de Tau hyperphosphorylée, sous forme d'un mélange équimolaire de protéines Tau 3R et 4R (Kovacs 2016).

3.3.4 Des protéines encore inconnues ?

Lors de l'examen neuropathologique, de rares patients présentent des inclusions ubiquitine positives, tau, TDP43 et FUS négatives (DLFT-UPS). Actuellement, une seule étiologie est assignée à cette entité : les DLFT avec mutation du gène *CHMP2B* (Kovacs 2014).

3.3.5 Nature des protéines agrégées et associations cliniques

Une même protéine agrégée peut être mise en évidence dans des variants cliniques différents. A l'inverse, le même variant clinique peut être associé à différentes protéines agrégées. La fréquence des agrégats observés est détaillée ci-après en fonction des différentes symptomatologies cliniques.



<u>Figure 21</u> : Associations clinico-pathologiques dans les DLFT, adaptée de Irwin, Cairns *et al.* 2015

bvFTD : variante comportementale de la dégénérescence frontotemporale ; svPPA : variant sémantique ; naPPA : aphasie non fluente/agrammatique; lvPPA : variant logopénique ; CBS : syndrome corticobasal ; ALS : sclérose latérale amyotrophique ; PSP : paralysie supranucléaire progressive

Dans la variante comportementale, on retrouve environ 50 % d'agrégats TDP43, 40 % d'agrégats Tau et les 10 % restants étant principalement des agrégats FUS (Bahia, Takada et

al. 2013, Irwin, Trojanowski et al. 2013). Parmi les patients présentant une variante comportementale associée à une pathologie Tau, l'examen neuropathologique mettra en évidence une maladie de Pick - inclusions de Tau 3R - dans 70 % des cas. 20 % des patients présenteront des lésions compatibles avec un syndrome corticobasal et les 10 % restant présenteront des lésions neuropathologiques caractéristiques de la paralysie supranucléaire progressive - agrégats de Tau 4R - (Bahia, Takada et al. 2013). Enfin, les associations variante comportementale et SLA sont quasiment exclusivement TDP43 alors que les associations variante comportementale et syndromes parkinsoniens atypiques (PSP et syndrome corticobasal) sont liées à des agrégats Tau (Irwin, Trojanowski et al. 2013).

Des agrégats TDP43 sont préférentiellement rencontrés dans les variants sémantiques (Landin-Romero, Tan et al. 2016). Dans la forme non fluente/agrammatique, les cohortes autopsiées présentaient plus fréquemment une pathologie Tau, notamment en cas d'association aux syndromes parkinsoniens atypiques (Grossman 2012). Des agrégats de Tau 4R sont plus fréquemment observés dans ce variant (Caso, Mandelli et al. 2014). Enfin, on peut observer que le variant logopénique de l'aphasie primaire progressive est lié dans la majorité des cas à une pathologie Alzheimer sous-jacente. Dans une cohorte de patients atteints du variant logopénique et autopsiés, 64% des patients (7 prélèvements sur 11) présentaient des marqueurs immunohistochimiques compatibles avec la maladie d'Alzheimer (Mesulam, Wicklund et al. 2008). Des études d'imagerie avaient mises en évidence le fait que l'atrophie prédominait dans les régions pariétales et qu'il existait une fixation des marqueurs amyloïdes. Par ailleurs, une surreprésentation de l'haplotype E4 et des marqueurs du LCS compatibles avec une maladie d'Alzheimer biologique étaient également décrits (Henry and Gorno-Tempini 2010). Les cas restants sont répartis entre agrégats TDP43 et Tau.

Concernant les pathologies motrices associées aux DLFT, on retrouve des inclusions de protéine TDP43 dans quasiment tous les cas de SLA sporadique. Les cas de SLA familiale (environ 10% des patients) présentent des inclusions TDP43 ou SOD, en fonction des mutations génétiques à l'origine de la maladie (Mackenzie, Bigio et al. 2007). La PSP est caractérisée par la présence d'agrégats de protéine Tau 4R sur le plan neuropathologique (Dickson, Kouri et al. 2011). Enfin, la principale protéine agrégée dans le syndrome corticobasal (50% des cas) est la protéine Tau 4R. Une proportion importante de patients

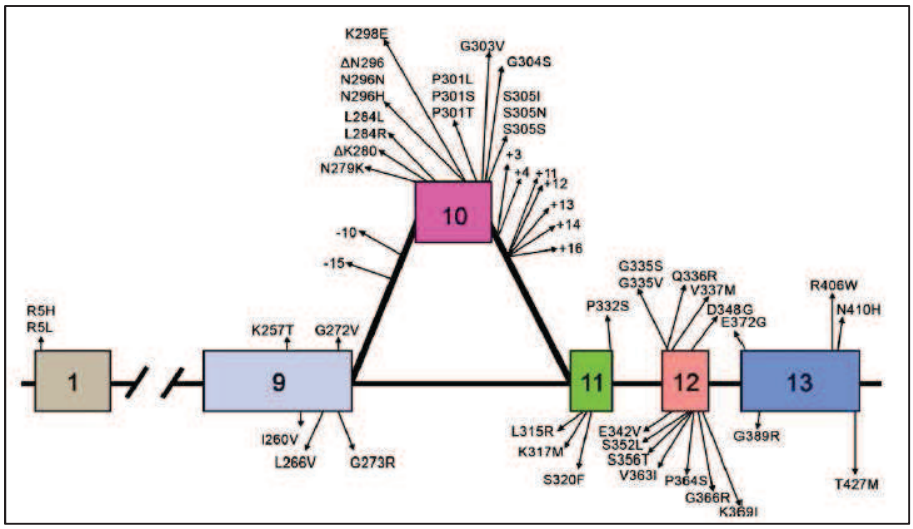
autopsiés présenterait des lésions compatibles avec une maladie d'Alzheimer, représentant la deuxième étiologie protéique de ce syndrome (Hassan, Whitwell et al. 2011).

4. Génétique des DLFT

Une histoire familiale est décrite chez 40 à 50 % des patients atteints de dégénérescence lobaire frontotemporale (au moins 1 parent de premier degré atteint de TNC, SLA ou maladie de Parkinson). De 10 % à 27 % des patients présenteraient une présentation de la maladie compatible avec un mode de transmission autosomique dominant (Pottier, Ravenscroft et al. 2016). La forte prévalence des DLFT familiales est notable et diffère de la prévalence des formes autosomiques dominantes observées dans les maladies d'Alzheimer - environ 1% - et de Parkinson - environ 2 % - (Klein and Westenberger 2012, Van Cauwenberghe, Van Broeckhoven et al. 2016). Cette différence mérite donc de s'arrêter sur les principales mutations génétiques rencontrées dans les DLFT, de mettre en lumière le lien unissant ces dernières et les anomalies observées lors de l'examen neuropathologique et également de décrire leur prévalence au sein des différentes présentations cliniques des DLFT. La plupart des mutations génétiques dans ces pathologies présentent une transmission autosomique dominante.

4.1 Mutations sur le gène *MAPT*

Le gène *MAPT (Microtubule Associated Protein Tau)* - localisation cytogénétique : 17q21.3 - code pour la protéine Tau et a été le premier gène identifié comme étant responsable de cas de FTLD familiales (Hutton, Lendon et al. 1998). D'après la base de données *Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database*, 80 variants ont été rapportés sur le gène *MAPT*. Parmi ces 80 variants, 30 (37.5 %) ont été classés comme non pathogènes et 6 d'entre eux (7.5 %) seraient de signification clinique incertaine. A l'exception de 2 variants probablement pathogènes ou pathogènes situés sur l'exon 1, les autres variants se situent dans les exons 9 à 13 et dans l'intron suivant l'exon 10. La plupart des mutations observées sont de type faux-sens ou des micro-délétions (Cruts, Theuns et al. 2012). La figure 22 détaille la liste des variants reportés à ce jour :



<u>Figure 22</u> : Représentation schématique des variants observés sur le gène MAPT - Ghetti, Oblak *et al.* 2015

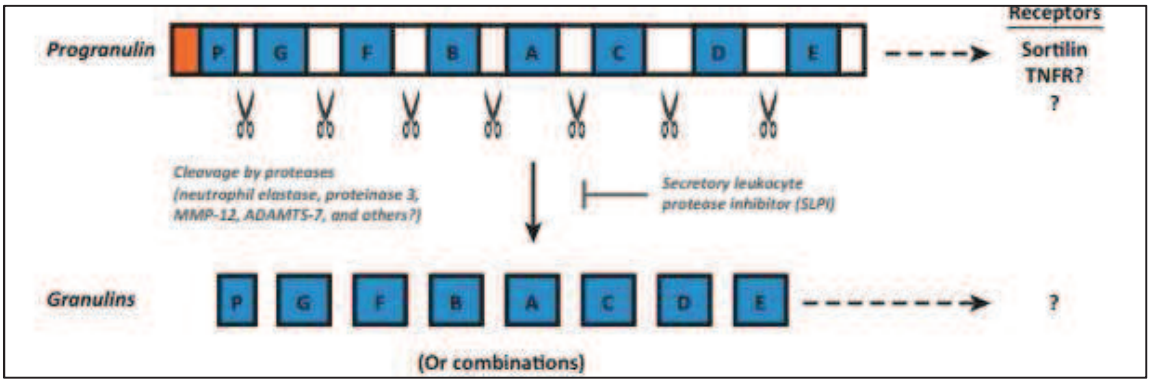
En France, la fréquence des mutations sur le gène MAPT est d'environ 3 % dans les formes sporadiques et elle est proche de 10 % dans les formes familiales. L'âge d'apparition des premiers symptômes est précoce, avec une moyenne de 55 ans et les patients présentent deux principaux phénotypes cliniques : une variante frontale ou un syndrome parkinsonien atypique (Le Ber 2013). Des essais fonctionnels sur des protéines Tau recombinantes porteuses des premières mutations décrites mettaient en évidence une diminution de leur capacité à fixer les microtubules et donc une perte d'efficacité dans l'assemblage de ces derniers (Hong, Zhukareva et al. 1998).

Sur le plan neuropathologique, des inclusions neuronales et gliales de protéine Tau hyperphosphorylée sont systématiquement observées dans les régions corticales et sous-corticales. La distribution anatomique des lésions, la morphologie et la composition biochimique des inclusions (à savoir la présence de Tau 3R et/ou Tau 4R) sont identiques aux formes sporadiques (Mackenzie and Neumann 2016). Il existe cependant des corrélations entre la nature du variant et la composition biochimique des agrégats Tau observés. En effet, les variants localisés sur les exons 9, 11, 12 et 13 seront corrélés à la présence d'agrégats Tau 3R, avec principalement des corps de Pick et des inclusions axonales. A l'inverse, les variants localisés sur l'exon 10 ou l'intron 10 seront associés à une prédominance d'agrégats de Tau 4R, comme ce que l'on peut observer dans le syndrome corticobasal ou la PSP. Finalement, certains variants entraîneront la formation d'agrégats de Tau 3R et 4R. On peut citer par

exemple les variants V337M (Chr17:44095995 G>A) et R406W (Chr17:44101427 C>T) pour lesquels l'examen neuropathologique mettra en évidence des dégénérescences neurofibrillaires comparables à celles de la maladie d'Alzheimer (Ghetti, Oblak et al. 2015). Il est important de noter que les mutations sur le gène *MAPT* sont les seules à ce jour associées à des agrégats de protéine Tau.

4.2 Mutations sur le gène *GRN*

En 2006, un deuxième gène responsable de formes familiales de FTLD a été mis en évidence. Le gène *GRN (granulin precursor)* - localisation cytogénétique : 17q21.31 - contient 13 exons dont 12 codants et est situé à proximité du gène *MAPT* (Baker, Mackenzie et al. 2006, Cruts, Gijselinck et al. 2006). Ce gène code pour la protéine progranuline qui est composée de 593 acides aminés et qui est très fortement glycosylée. La progranuline est constituée de 7.5 domaines conservés consistant chacun en une répétition de 12 motifs cystéine, appelés également les domaines granuline (figure 23). Une fois sécrétée, la progranuline est clivée par l'action de différentes protéases libérant alors la paragranuline et les granulines A à G, des peptides de 6 kDa (Beel, Moisse et al. 2017).



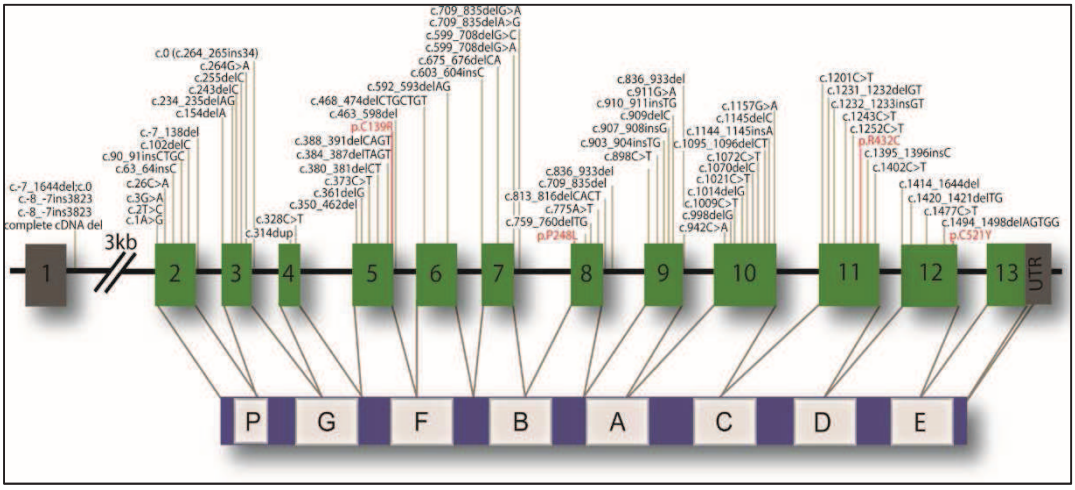
<u>Figure 23</u> : Métabolisme de la progranuline - Nguyen, Nguyen *et al.* 2013
La progranuline est composée de 7.5 domaines fortement conservés, les domaines granuline (en bleu sur le schéma), séparés les uns des autres par des domaines de liaison (en blanc). La progranuline peut être clivée en granulines par l'action de l'élastase neutrophile, de la protéinase 3, MMP-12 et ADAMTS-7. Ce clivage peut être inhibé par l'inhibiteur sécrétoire de la protéase leucocytaire (SLPI).

La progranuline possède des fonctions biologiques multiples incluant un rôle comme facteur de croissance, la modulation de la réponse immunitaire ou encore un rôle métabolique (notamment avec le diabète de type 2 ou l'obésité). Différents mécanismes de transduction du signal sont mis en jeu parmi lesquels la voie de signalisation RAS/MAPK ou encore la voie phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) dont les rôles sont particulièrement étudiés en biologie tumorale car elles sont à l'origine d'une dérégulation de la croissance, de la prolifération et de la survie cellulaire (De Muynck and Van Damme 2011). Le rôle de la progranuline comme facteur de croissance au niveau cérébral a été mis en évidence par plusieurs études. L'expression de la progranuline a été démontrée comme un facteur favorisant la survie des neurones et la croissance neuritique chez le rat (Van Damme, Van Hoecke et al. 2008). A l'inverse, une diminution d'expression de la progranuline par ajout d'ARN interférents (siRNA) diminue la longueur et l'arborescence neuronales (Tapia, Milnerwood et al. 2011). Par ailleurs, une étude réalisée chez le poisson-zèbre a mis en évidence le rôle de la progranuline dans le développement et la ramification des motoneurones (Chitramuthu, Baranowski et al. 2010).

La progranuline et ses dérivés les granulines ont des actions opposées dans l'inflammation. Alors que les granulines augmentent l'expression de cytokines pro-inflammatoires, la progranuline est un puissant inhibiteur du TNFα et promeut la production de cytokines anti-inflammatoires. Ces actions opposées sont notamment régulées par l'inhibiteur sécrétoire de la protéase leucocytaire qui assure un équilibre entre progranuline et granulines (Zhu, Nathan et al. 2002). Un déficit en progranuline est à l'origine d'une gliose cérébrale (Martens, Zhang et al. 2012). De plus, des souris déficientes en progranuline possèdent des macrophages produisant plus de cytokines pro-inflammatoires que ceux des souris saines. La progranuline pourrait donc moduler l'inflammation au niveau du système nerveux central ; les conséquences inflammatoires seraient donc augmentées suite à une agression toxique ou métabolique chez les individus déficients en progranuline (Yin, Banerjee et al. 2010).

La base de données *Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database* recense 172 variants sur le gène *GRN* décrits chez des patients souffrant de DLFT. Parmi ces 172 variants, 48 (27.9 %) ont été classés comme non pathogènes et 45 d'entre eux (26.1 %) seraient de signification clinique incertaine. Les variants pathogènes (79 soit 45.9 %)

sont principalement des mutations de type non-sens et des micro-insertions ou délétions à l'origine d'un décalage du cadre de lecture, dont le point commun est la formation prématurée d'un codon Stop. Ces variants sont localisés sur l'ensemble du gène (figure 24).



<u>Figure 24</u> : Aperçu des mutations sur le gène *GRN* (70 mutations présentes) - Nicholson, Gass *et al.* 2012

Les variants pathogènes sont rencontrés à l'état hétérozygote chez les patients atteints de DLFT. La fréquence des mutations du gène *GRN* est d'environ 15% chez les patients atteints de DLFT. L'âge moyen d'apparition des premiers signes cliniques est supérieur à celui des porteurs de mutations sur le gène *MAPT*, 65 ans en moyenne (Le Ber 2013). La conséquence de l'apparition d'un codon Stop prématuré est à l'origine d'une diminution de l'expression des ARN messagers (Baker, Mackenzie et al. 2006). En effet, un mécanisme de *nonsense mediated decay* est mis en place par les cellules, correspondant à un contrôle de qualité des ARNm : les ARNm non-sens sont dégradés pour éviter la formation de protéines tronquées (Hug, Longman et al. 2016). Il en résulte donc une diminution de synthèse de la protéine progranuline : ce phénomène est appelé haplo-insuffisance.

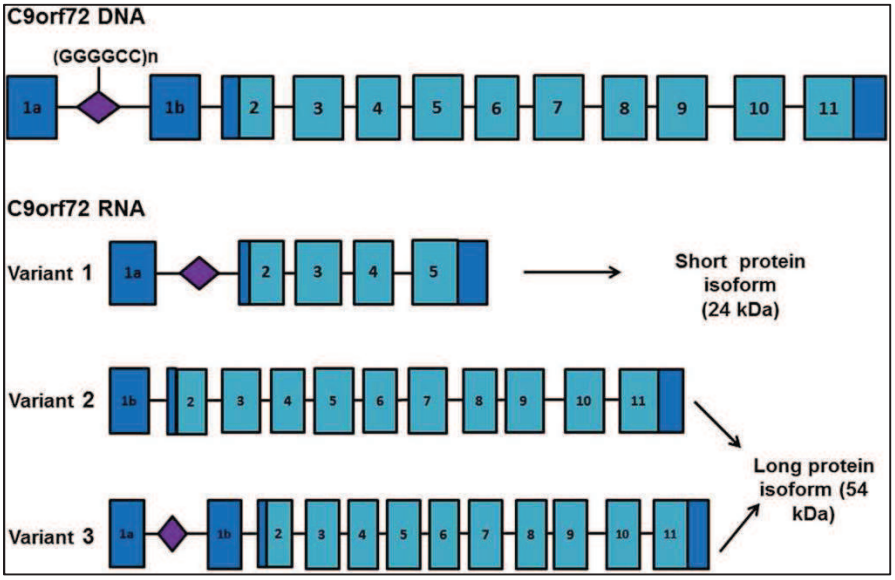
L'examen neuropathologique des patients porteurs de mutations sur le gène *GRN* met en évidence des agrégats de protéine TDP43 de manière systématique. La pathologie associée correspond au type A de la classification harmonisée de 2011 de Mackenzie (Mackenzie, Neumann et al. 2011). Pour rappel, on retrouvera de nombreuses inclusions neuronales cytoplasmiques et des neurites dystrophiques de petite taille. De plus, des inclusions intraneuronales lentiformes pourront être observées (Mackenzie and Neumann 2016). La

relation unissant l'haplo-insuffisance de la progranuline et les agrégats TDP43 reste cependant encore à établir. En 2007, il avait mis en évidence qu'un déficit en progranuline entraînait une augmentation du clivage de la protéine TDP43 par la caspase 3 sur deux lignées cellulaires différentes. A l'inverse, ce clivage était inhibé par l'administration d'un inhibiteur de caspase (Zhang, Xu et al. 2007). Cependant, une autre étude avait montré que ce clivage accru par la caspase 3 était présent chez les patients atteints de DLFT indépendamment de la présence d'une mutation sur le gène *GRN* (Dormann, Capell et al. 2009). Enfin, les modèles murins déficients en progranuline montrent des profils neuropathologiques variables, allant d'une absence de pathologie TDP43 à la présence d'une phosphorylation et délocalisation cytoplasmique de cette dernière (Yin, Dumont et al. 2010, Filiano, Martens et al. 2013). Une autre hypothèse serait que le déficit en protéine progranuline observée chez les patients atteints de mutations sur le gène *GRN* augmenterait le stress cellulaire et pourrait entraîner une mauvaise localisation et une perte de solubilité de la protéine TDP43 (Kumar-Singh 2011).

4.3 Mutations sur le gène *C9ORF72*

La mutation présente sur le gène *C9ORF72* (*Chromosome 9 Open Reading Frame 72*) - localisation cytogénétique : 9p21.2 - est différente de celles précédemment décrites pour les gènes *MAPT* et *GRN*. En effet, 2 équipes ont identifié en 2011 la présence de grandes expansions d'un hexanucléotide (G_4C_2) répété de nombreuses fois dans une région non codante de ce gène (DeJesus-Hernandez, Mackenzie et al. 2011, Renton, Majounie et al. 2011). Le nombre de répétitions de l'hexanucléotide G_4C_2 est variable dans la population générale, avec des répétitions de 2, 5 ou 8 hexanucléotides considérées comme les allèles les plus fréquents. Les premières études avaient suggéré un nombre maximal de 30 répétitions chez les patients contrôles. Les expansions présentes chez les patients atteints de DLFT sont beaucoup plus importantes, et peuvent aller de 400 jusqu'à plusieurs milliers de répétitions (Woollacott and Mead 2014). Cette mutation est la plus fréquente dans les formes familiales de DLFT (10 à 25 % d'après les études) et sa prévalence s'élève très fortement (jusqu'à 66%) en cas d'association DLFT et SLA (Le Ber 2013).

Le gène *C9ORF72* est constitué de 11 exons incluant 2 exons alternatifs non codants 1a et 1b. La figure 25 illustre la transcription physiologique du gène *C9ORF72* pour former ses 3 transcrits naturels.



<u>Figure 25</u> : Transcrits du gène *C9ORF72* - Barker, Niblock *et al.* 2017
L'expansion de l'hexanucléotide $(G_4C_2)_n$ est localisée entre les exons 1a et 1b du gène *C9ORF72*. Il existe 3 transcrits naturels du gène : 2 transcrits contiennent respectivement l'exon non codant 1b ou 1a associés aux exons codants 2 à 11 et entraînent la formation d'une protéine C9orf72 de 481 acides aminés (54 kDa). Le dernier transcrit est composé de l'exon non codant 1a associé aux exons codants 2 à 5 et entraîne la formation d'une protéine C9orf72 plus courte de 222 acides aminés (24 kDa).

Les fonctions de la protéine C9orf72 ne sont pas encore totalement élucidées à ce jour. Cependant, une étude structurale de cette protéine a permis de montrer de fortes homologies entre la partie N-terminale de la protéine C9orf72 et les protéines LCHN et AVL9 ainsi qu'entre la partie C-terminale de C9orf72 et les protéines FNIPs. Ces observations permettent donc de classer la protéine C9orf72 parmi les protéines portant un domaine DENN (Levine, Daniels et al. 2013). Les protéines portant un domaine DENN (pour *differentially expressed in normal and neoplastic cells*) fonctionnent comme des facteurs d'échange de GDP/GTP pour les Rab GTPases (membres de la superfamille des protéines G monomériques Ras) (Marat, Dokainish et al. 2011). La protéine C9orf72 régulerait donc le trafic endosomal des protéines en incluant également la sécrétion des vésicules extracellulaires, et intervient également dans l'autophagie (Aoki, Manzano et al. 2017).

Les mécanismes physiopathologiques liés la présence de l'expansion des hexanucléotides $(G_4C_2)_n$ sur le gène *C9ORF72* sont toujours en cours d'étude eux aussi. Trois principales hypothèses sont actuellement débattues (pour revue (Gendron and Petrucelli 2018)). La première d'entre elles correspond à une perte de fonction de la protéine C9orf72 (haplo-insuffisance), suggérée par une diminution des transcrits d'ARNm dans le système nerveux central (Gijselinck, Van Langenhove et al. 2012). Cette dernière pourrait être expliquée par la structure en épingle à cheveux formée par les répétitions dans les ARNm, leur donnant la capacité de se fixer à de l'ADN (Fratta, Mizielinska et al. 2012). Par ailleurs, ces expansions pourraient modifier la méthylation de l'ADN et des histones, ce mécanisme étant connu pour réprimer l'expression génique (Barski, Cuddapah et al. 2007). La deuxième hypothèse consiste en une toxicité induite par les transcrits d'ARNm porteurs des expansions $(G_4C_2)_n$ qui formeraient des foci et emprisonneraient à l'intérieur de ces derniers les protéines capables de se lier aux ARN (Cooper-Knock, Walsh et al. 2014, Rossi, Serrano et al. 2015). Finalement, le dernier mécanisme physiopathologique à l'étude est la formation de protéines composées de dipeptides ou DPR (*Dipeptide repeat proteins*). Ces protéines sont traduites à partir des expansions malgré l'absence d'un codon initiateur ATG et selon différents cadres de lecture (Freibaum and Taylor 2017). Les DPR sont au nombre de 5 dans les DLFT, à savoir les protéines poly(GA), poly(GP), poly(GR), poly(PR) et poly(PA) et leur présence pourrait conduire à la dégénérescence neuronale. Cette traduction non canonique a été décrite pour les DLFT associées à la mutation du gène *C9ORF72*, mais également dans le syndrome de l'X fragile et la maladie de Huntington (Green, Linsalata et al. 2016).

Sur le plan neuropathologique, les examens immunohistologiques des prélèvements cérébraux des patients porteurs d'une mutation sur le gène *C9ORF72* mettent en évidence des agrégats de protéine TDP43, notamment de type B d'après la classification de Mackenzie *et al.* de 2011 (Mackenzie, Neumann et al. 2011). Pour rappel, le type B correspond à la présence d'inclusions intra neuronales cytoplasmiques sur l'ensemble des couches corticales. Une nouvelle fois, la relation entre la présence d'une mutation sur le gène *C9ORF72* et la présence d'agrégats de protéine TDP43 reste à définir. Cependant, des souris transgéniques exprimant des protéines poly(GA) présentent une augmentation des concentrations de TDP43 phosphorylée (Schludi, Becker et al. 2017). De plus, cette expression de protéines poly(GA) activerait le clivage de la protéine TDP43 dans des cultures cellulaires (Lee, Baskaran et al. 2017).

De plus, les protéines DPR forment des inclusions cytoplasmiques en formes d'étoiles. Ces dernières sont observées dans l'ensemble du système nerveux central, et sont particulièrement abondantes dans l'hippocampe, le cervelet, les cortex frontal et temporal ainsi que dans le cortex moteur (Ash, Bieniek et al. 2013). Par contre, les inclusions de DPR sont beaucoup plus rares que les inclusions de protéine TDP43 dans la corne antérieure de la moelle épinière (Gomez-Deza, Lee et al. 2015).

4.4 Mutations sur le gène *TARDBP*

Le gène *TARDBP (TAR DNA-binding protein 43)* - localisation cytogénétique : 1p36.22 - code pour la protéine TDP43. D'après la base de données *Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database*, 44 variants ont été rapportés sur ce gène. Parmi ces variants, 9 sont classés comme non pathogènes et 2 sont de signification indéterminée. Les mutations pathogènes, de type faux-sens, sont toutes localisées sur l'exon 6 du gène, codant pour la partie C-terminale de la protéine TDP43 (Cruts, Theuns et al. 2012). Les mutations sur le gène *TARDBP* sont responsables de 2% des formes familiales de DLFT (Le Ber 2013). On les retrouve cependant plus fréquemment dans les SLA familiales. Les inclusions neuropathologiques observées chez les patients porteurs de mutations sur le gène *TARDBP* sont des agrégats de protéine TDP43 (Van Deerlin, Leverenz et al. 2008).

4.5 Mutations sur le gène *VCP*

Le gène *VCP* (*Valosin containing protein*) - localisation cytogénétique : 9p13.3 - code pour la protéine VCP, de la famille des ATPases associées à de multiples activités. Cette protéine est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires parmi lesquelles la biogénèse des organelles et la dégradation des protéines médiée par l'ubiquitine (Weihl, Pestronk et al. 2009). Il existe 20 variants sur le gène *VCP* : 19 pathogènes et 1 de signification indéterminée (Cruts, Theuns et al. 2012) qui sont responsables de 3% des formes familiales de DLFT (Le Ber 2013). Le phénotype clinique associé à des mutations sur ce gène est particulier car il associe en plus d'une DLFT une maladie à corps d'inclusions et une maladie de Paget (Mehta, Khare et al. 2013). Les patients atteints de mutations sur le gène *VCP* présentent des

inclusions intranucléaires lentiformes et des petites neurites dystrophiques de protéine TDP43, correspondant au type D de la classification de Mackenzie *et al* (Mackenzie, Neumann et al. 2011).

4.6 Les autres mutations observées

D'autres mutations avec des fréquences individuelles faibles (inférieures à 1 %) ont été rapportées dans des cas de DLFT associées à une SLA. La figure 26 détaille l'ensemble des mutations décrites dans les DLFT pures ou associées à des pathologies neuromusculaires mises en évidence jusqu'en 2017.

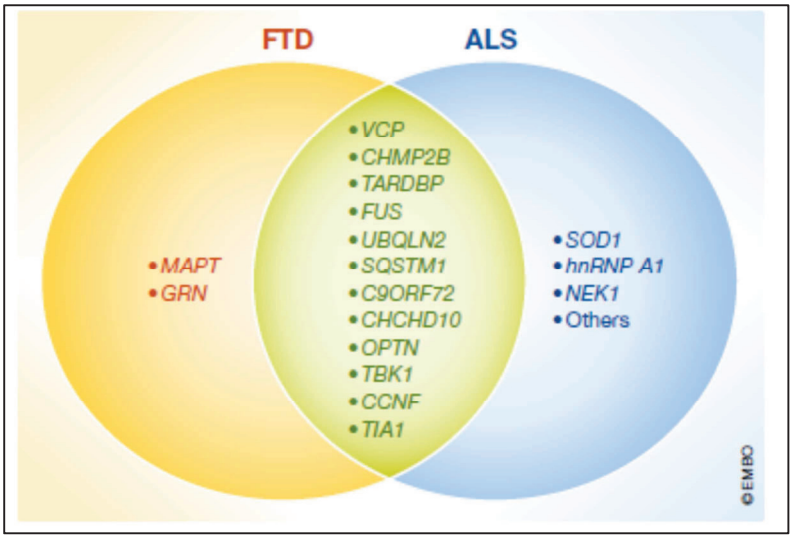


Figure 26 : Mutations génétiques responsables de DLFT et/ou SLA - Gao, Almeida *et al.* 2017

OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Le spectre des dégénérescences lobaires fronto-temporales (DLFT), troisième cause de TNC chez l'adulte de moins de 65 ans, représente un groupe de maladies hétérogènes sur les plans cliniques et génétiques. De plus, la nature des lésions protéiques caractérisées à l'examen neuropathologique est elle aussi hétérogène, les deux principales protéines agrégées étant les protéines Tau et TDP43. Actuellement, les critères diagnostiques des DLFT reposent sur différents stades de probabilité : possible, probable ou certaine. Une DLFT sera certaine lorsque l'on associera, en plus d'une clinique évocatrice, la mise en évidence des lésions neuropathologiques ou d'un variant génétique connu. Les stades diagnostiques possible et probable associent quant à eux des éléments cliniques et radiologiques : il n'existe aucun marqueur étiologique protéique validé permettant de renforcer la certitude diagnostique du vivant du patient.

L'objectif de ce travail de thèse est donc d'étudier le potentiel intérêt diagnostique de la protéine TDP43 dans des matrices accessibles du vivant du patient, à savoir le liquide cérébrospinal ou le sang.

Pour cela, nous avons tout d'abord développé des outils de biologie moléculaire afin de constituer une cohorte de patients DLFT-TDP43 certaine. Nous avons alors étudié les variants pathogènes présents sur chacun des 2 gènes *C9ORF72* et *GRN*, systématiquement associés à la présence d'inclusions cérébrales de protéine TDP43.

Dans une seconde partie, l'analyse quantitative des protéines Tau, des neurofilaments et de la protéine TDP43 a été réalisée dans le liquide cérébrospinal afin de déterminer des caractéristiques biologiques communes à cette catégorie de patients. Cette cohorte de cas certains était comparée en parallèle à une population de patients atteints de DLFT-Tau et à une cohorte de patients atteints de pathologies non neurodégénératives.

Finalement, une analyse qualitative a complété l'étude de la protéine TDP43 grâce à des immuno-essais miniaturisés sur une plate-forme automatisée. Les différentes formes de TDP43 ont été recherchées dans le liquide cérébrospinal et les différentes fractions du sang total en comparaison des profils protéiques obtenus sur des échantillons cérébraux caractérisés.

PARTIE I : CONSTITUTION D'UNE COHORTE DE CAS CERTAINS DE DLFT-TDP43

Pour rappel, le diagnostic des DLFT repose sur différents degrés de probabilité. Un diagnostic de certitude sera posé lorsque l'on retrouvera, en plus d'une symptomatologie évocatrice d'un phénotype clinique de DLFT, la présence :

- D'une mutation pathogénique connue

ET/OU

- De protéines agrégées lors de l'examen immunohistochimique du tissu cérébral, définissant alors une pathologie DLFT-TDP43, DLFT-TAU ou encore DLFT-FUS.

L'objectif principal de cette première partie du travail expérimental était donc de constituer une cohorte de patients DLFT-TDP43 répondant à l'un de ces critères au moins. Pour cela, nous avons tout d'abord développé des outils de biologie moléculaire destinés à la mise en évidence des variants sur les gènes *GRN* et *C9ORF72*, qui représentent à elles deux environ 40% des DLFT familiales et qui représentent une très large majorité des cas de DLFT-TDP43 associés à une anomalie génétique.

Ce développement a par ailleurs permis de tester l'un des mécanismes actuellement discutés pour expliquer la pathogénie des mutations *C9ORF72*, à savoir l'haplo-insuffisance (diminution de synthèse de protéine en conséquence d'une mutation génétique).

1. Développement d'outils de diagnostic génétique des DLFT-TDP43

1.1 Matériels et méthodes

1.1.1 Sélection des patients pour la constitution d'une cohorte certaine DLFT-TDP43

Une première sélection rétrospective a permis de déterminer, parmi l'ensemble des prélèvements disponibles au laboratoire, les patients dont le diagnostic moléculaire des gènes *C9ORF72* et *GRN* avait été préalablement réalisé dans l'UF de Neurogénétique Moléculaire et Cellulaire de la Pitié-Salpêtrière (AP-HP, Dr F. Clot). Cinq patients porteurs d'un variant

sur le gène *GRN* et 3 patients porteurs d'une expansion sur le gène *C9ORF72* ont ainsi été sélectionnés. Les analyses génétiques n'ont pas été refaites dans notre laboratoire sur cette sélection de patients déjà caractérisée et ces patients n'ont donc pas été intégrés par la suite lors de l'estimation des fréquences observées pour les mutations.

Une seconde sélection rétrospective a été réalisée pour des patients avec un diagnostic de DLFT certaine basé sur les résultats de l'examen neuropathologique et pour lesquels des prélèvements cérébraux potentiellement associés à des prélèvements biologiques périphériques étaient disponibles au CHU de Lyon. Cette sélection de six patients a été permise grâce au Docteur David Meyronet et au Docteur Nathalie Streichenberger, tous deux membres du consortium Brain-Net Europe, qui avaient proposé le diagnostic de DLFT certaine d'après des protocoles méthodologiques validés. Les résultats immunohistochimiques obtenus étaient similaires à ceux présentés dans les Rappels bibliographiques de ce manuscrit (figure 10 pour la protéine TDP43 et figures 17 et 18 pour la protéine Tau). De l'ADN était disponible dans notre laboratoire pour ces patients.

En parallèle, une étude prospective et multicentrique a été instaurée en partenariat avec les services de Neurologie des centres hospitaliers universitaires de Lyon, Grenoble et Saint-Etienne, ainsi qu'avec des centres hospitaliers généraux de la région Rhône-Alpes. Des patients présentant des troubles cognitifs, parmi lesquels des troubles du comportement, consultaient les médecins neurologues ou gériatres spécialistes des troubles neurocognitifs de ces différents centres. Le diagnostic de TNC était alors confirmé. Afin de proposer une étiologie pour le TNC diagnostiqué et du fait de la présence d'antécédents familiaux de TNC, des examens complémentaires intégrant des prélèvements biologiques (sang +/- LCS) pouvaient être réalisés après la signature d'un consentement éclairé pour la réalisation de recherches génétiques ainsi que d'un consentement pour l'utilisation des prélèvements à des fins de recherche dans le cadre de protocoles de soins courants (des exemplaires du consentement de génétique et d'utilisation des prélèvements à des fins de recherche sont proposés en annexes 1 et 2 de ce document). Le diagnostic étiologique était finalement discuté lors de réunions de concertation pluridisciplinaires, en intégrant les données des examens cliniques et des bilans neuropsychologiques, ainsi que les résultats d'imagerie, des biomarqueurs et de génétique. Au total, les résultats pour 72 patients inclus dans cette étude sont présentés dans ce travail.

1.1.2 Prélèvements sanguins et extraction de l'ADN

Pour la cohorte prospective de 72 patients détaillée précédemment, du sang total prélevé dans 2 tubes EDTA était collecté et acheminé au laboratoire. A la réception des prélèvements sanguins, des aliquots de plasma et des préparations plaquettaires étaient préparés selon le protocole détaillé en annexe 3. Après remise en suspension des éléments figurés du sang, une extraction d'ADN manuelle était réalisée avec le kit Nucléon BACC 3 (Amersham®). L'intérêt d'une extraction manuelle résidait dans le fait de pouvoir obtenir de très grands fragments d'ADN à la fin de l'extraction (données fournisseur : de 23 à 250 kpb) et d'adapter le volume de reprise final de l'ADN pour obtenir de bonnes concentrations d'ADN dans un volume satisfaisant pour nos analyses.

Brièvement, les cellules étaient lysées par des détergents (5 mL de réactif A puis 2 mL de réactif B du kit pour 5 mL de sang total), puis les protéines étaient dénaturées par ajout de 500 µL de perchlorate de sodium. Après agitation, l'ajout de 2 mL de chloroforme permettait la dissolution des lipides dans cette phase alors que l'ADN restait dans la phase aqueuse. Ensuite, les protéines associées à l'ADN dans la chromatine étaient fixées par ajout de 300 µL de résine Nucléon. Après centrifugation, la phase aqueuse contenant l'ADN était alors récupérée dans un tube stérile et 5 mL d'éthanol absolu froid étaient alors ajoutés. Le mélange était alors agité jusqu'à la formation d'un précipité (pelote d'ADN). La pelote était récupérée, rincée dans un tube contenant 1 mL d'éthanol froid puis finalement dissoute dans du tampon TE (Tris, EDTA), avec un volume ajouté de TE dépendant de la grosseur de la pelote d'ADN. Le dosage de l'ADN génomique était alors réalisé sur un Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific®) et l'ADN était ensuite conservé à + 4°C.

1.1.3 PCR et séquençage du gène *GRN*

Une amplification d'ADN était réalisée pour l'ensemble des 13 exons du gène GRN grâce à la réalisation de 6 PCR (Polymerase Chain Reaction) simultanées. L'absence de polymorphismes connus sur chacune des amorces avait été préalablement vérifiée à l'aide du logiciel SNPCheck® (https://secure.ngrl.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm). Le tableau V détaille les amorces utilisées et les exons amplifiés pour chaque réaction.

Exon(s) amplifiés	Amplicon (pb)	Amorce Sens (F)	Amorce Antisens (R)
Exon 1	503	CTGCAGGATGGGTTAAGGAA	CGTCACTGCAATTACTGCTTC
Exons 2 à 4	801	GGGTACTGAGTGACCCTAG	TTGCTTAGTACAGATGCCACA
Exons 5 à 7	769	CAGCTCCTTGTGTGATGGG	CCTGCATCAGCCAGGCTC
Exons 8 à 10	868	GTGCTACTGAGCCTGGAAG	AAGCAATAGGAGCTTGGCCA
Exons 11 et 12	650	CACATAGTGGCTACCTACAA	GACCTGGTCCCTGGCCAT
Exon 13	573	ATGGCCAGGGACCAGGTC	TTGGCAGTGGACGTGAACC

Tableau V : Description des amorces utilisées pour la réalisation des PCR du gène *GRN*

Les réactions d'amplification d'ADN par PCR étaient réalisées grâce au kit HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen®) selon les protocoles de mix (tableau VI) et d'amplification (tableau VII) suivants :

Volumes (µL)	**n = 1**
Taq Hot Star 5U	0.13
dNTP 10 mM	0.5
Tampon (avec $MgCl_2$)	2.5
H_2O	16.67
Amorce X_F 20 µM	0.6
Amorce X_R 20 µM	0.6
Total Mix	**21**
ADN à 15 ng / 100 µL	**4**
Total final	**25**

Tableau VI : mix PCR *GRN*

Dénaturation initiale	95°C	15 min	
Dénaturation	95°C	40 sec	**35 cycles**
Hybridation	**64°C**	40 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation finale	72°C	10 min	

Tableau VII : protocole PCR *GRN*

Après purification des amplicons PCR par une ultrafiltration sur une plaque NucleoFast (Macherey-Nagel®), ces derniers étaient analysés avec l'automate Labchip GX (Perkin Elmer®) afin de déterminer la taille et la concentration des différents amplicons obtenus. Après dilution des amplicons, la réaction de séquençage Sanger était réalisée selon les protocoles de mix (tableau VIII) et de réaction de séquençage (tableau IX) suivants :

Volumes (µL)	**n = 1**
BigDye v1.1	8
Amorce X_F 5 µM	1
OU Amorce X_R 5 µM	1
Total Mix	**9**
ADN purifié	**1**
Total final	**10**

Tableau VIII : mix séquence *GRN*

Dénaturation initiale	96°C	1 min	
Dénaturation	96°C	10 sec	**40 cycles**
Hybridation	**50°C**	5 sec	
Elongation	60°C	2.5 min	

Tableau IX : protocole séquence *GRN*

Les réactions de séquence ainsi obtenues étaient finalement analysées sur le séquenceur capillaire ABI 3500 xL (Applied Biosystems®). Les séquences étaient tout d'abord étudiées à l'aide du logiciel SeqScape (Applied Biosystems®), ce logiciel permettant l'alignement des séquences obtenues et la mise en évidence des variants par rapport à la séquence de référence utilisée (NCBI Reference Sequence du gène *GRN* : NC_000017.11). De plus, la pathogénicité des variants obtenus était également analysée avec le logiciel Alamut Visual (Interactive Biosoftware®).

1.1.4 Détection d'une expansion pathologique sur le gène C9ORF72

La mise en évidence des expansions pathologiques sur le gène *C9ORF72* a été réalisée par l'utilisation de 2 techniques complémentaires : une PCR conventionnelle et une repeat-primed PCR (RP-PCR). La PCR conventionnelle permettait de déterminer le nombre d'allèles sains (1 ou 2) ainsi que leur nombre de répétitions G_4C_2. Pour rappel, un nombre de répétitions G_4C_2 inférieur à 30 est considéré comme normal d'après les données de la littérature. La RP-PCR est une technique qualitative permettant de mettre en évidence la présence d'une grande expansion mais ne permet de déterminer le nombre de répétitions G_4C_2 dans l'allèle (les allèles) pathologique(s).

- **PCR conventionnelle du gène *C9ORF72***

La PCR permettait d'amplifier la région intronique du gène *C9ORF72* entre les exons 1a et 1b (pour rappel, voir la figure 23) comprenant les répétitions $(G_4C_2)_n$. Les réactions d'amplification d'ADN ont été réalisées grâce au kit Multiplex PCR (Qiagen®) selon les protocoles de mix (tableau X) et d'amplification (tableau XI) suivants, à l'aide des amorces sens - F - GGAGGGAAACAACCGCAGCC et antisens - R - TCCTCACTCACCCACTCGC.

Volumes (µL)	n = 1
2X PCR Master Mix	12.5
7-deaza-2 deoxy GTP 10 mM	0.5
DMSO	1.75
5x Solution Q	5
H_2O	0.75
Amorce F 20 µM	0.5
Amorce R 20 µM	0.5
Total Mix	**21**
ADN à 15 ng / 100 µL	**4**
Total final	**25**

Tableau X : mix PCR *C9ORF72*

Dénaturation initiale	95°C	15 min	
Dénaturation	95°C	30 sec	**35 cycles**
Hybridation	**60°C**	30 sec	
Elongation	68°C	1 min	
Elongation finale	68°C	10 min	

Tableau XI : protocole PCR *C9ORF72*

A noter que le mix PCR utilisé ici diffère légèrement du protocole précédemment décrit pour la PCR du gène *GRN*. En effet, 3 réactifs supplémentaires ont été ajoutés au mix, à savoir le 7-deaza-2 deoxy GTP, le DMSO (diméthylsufoxyde) et la solution Q (Qiagen®). La région à amplifier étant particulièrement riche en nucléotides GC (à l'origine de modification de la structure secondaire de l'ADN), ces différents réactifs permettaient d'améliorer l'hybridation des amorces et donc d'augmenter les concentrations des amplicons obtenus. Après purification des amplicons, ces derniers étaient analysés avec l'automate Labchip GX (Perkin Elmer®) afin de déterminer le nombre d'allèles et leur taille. Pour cela, un patient hétérozygote préalablement séquencé (2 et 9 répétitions G_4C_2) était déposé en parallèle des patients analysés. La figure 27 présente un exemple de résultats obtenus lors d'un essai :

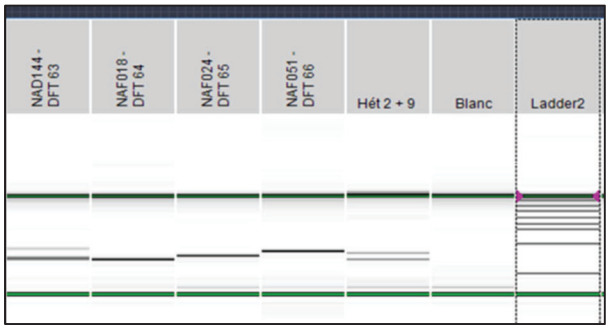


Figure 27 : Exemple de résultats obtenus avec la PCR *C9ORF72*
Deux allèles sont détectés par la technique PCR *C9ORF72* pour le patient DFT63 et le patient contrôle (Hét 2 + 9), 1 allèle est détecté pour les patients DFT64, DFT65 et DFT66. Le blanc PCR est analysé systématiquement pour vérifier l'absence d'amplification en absence d'ADN. La taille des amplicons, calculée automatiquement par le logiciel, peut varier pour chacun des patients, reflétant la variabilité inter-individuelle du nombre de répétitions G_4C_2.

Connaissant le nombre exact de répétitions de l'hexanucléotide G_4C_2 pour le patient témoin qui a été séquencé (un allèle de 2 répétitions et un allèle de 9 répétitions), on peut alors comparer la taille des allèles de chaque patient par rapport au témoin pour déterminer le nombre de répétitions de ces derniers. Dans notre exemple, on obtient ainsi :

Patient	Bandes	Allèle 1	Répétitions G_4C_2	Allèle 2	Répétitions G_4C_2
Hét 2 + 9	**2**	**194 pb**	**2**	**236 pb**	**9**
Blanc	**0**	**N.A**		**N.A**	
DFT 63	2	206 pb	4	267 pb	14
DFT 64	1	194 pb	2	N.A	
DFT 65	1	219 pb	6	N.A	
DFT 66	1	248 pb	11	N.A	

Tableau XII : Calcul du nombre de répétitions G_4C_2 pour chaque allèle observé

L'ajout du témoin dans chaque essai était indispensable car les résultats obtenus par le Labchip pouvaient présenter des variations (taille de l'allèle 1 du témoin pouvant varier de 192 à 195 pb). Par ailleurs, les tailles calculées ne donnaient pas forcément un nombre entier de répétitions G_4C_2 (exemple de l'allèle 1 du patient DFT65 = 6.17 répétitions G_4C_2). Les résultats sont donc rendus à +/- 1 répétition G_4C_2 pour les allèles mesurés. Enfin, ce protocole ne permet pas de mettre en évidence des expansions de grande taille : la présence d'un seul allèle observé pouvant alors correspondre soit à un patient homozygote sain soit à un patient hétérozygote avec une expansion pathologique.

- **RP-PCR du gène *C9ORF72***

Cette technique est sensiblement différente de la première d'un point de vue technique car elle associe 3 amorces dans le même mix réactionnel. La première amorce (P1) est fluorescente et fixe l'ADN en amont de la zone d'intérêt, elle est donc spécifique du gène à amplifier. La seconde amorce (P2) est constituée de 2 parties distinctes : la première partie de l'amorce est constituée d'une série de nucléotides dont la séquence n'est pas retrouvée dans l'ADN humain et sa deuxième partie est spécifique des répétitions G_4C_2 du gène *C9ORF72*. Enfin, la dernière amorce P3 correspond à la première partie de l'amorce P2 (la séquence non retrouvée dans l'ADN humain). En pratique, dans les premiers cycles de la RP-PCR, des amplicons de tailles différentes (correspondant au nombre de répétitions G_4C_2 présentes sur les deux allèles) sont

constitués grâce à l'association des 2 amorces P1 et P2. Dans les cycles suivants, l'amorce P3 prend le relais de l'amorce P2 et augmente de manière importante le nombre de copies de chacun des amplicons formés précédemment (figure 28).

Les amorces utilisées étaient les suivantes :

- P1 : FAM-AGTCGCTAGAGGCGAAAGC (FAM étant le composé fluorescent)

- P2 : TACGCATCCCAGTTTGAGACGGGGGCCGGGGCCGGGGCCGGGG

- P3 : TACGCATCCCAGTTTGAGACG (identique à la première partie de P2)

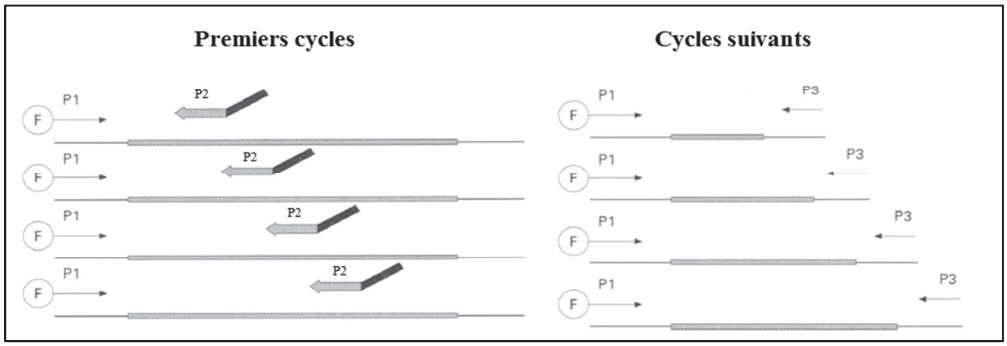


Figure 28 : Principe général de la RP-PCR, adapté de Warner, Barron *et al.* 1996

Les réactions d'amplification ont été réalisées grâce au kit Multiplex PCR (Qiagen®) selon les protocoles de mix (tableau XIII) et d'amplification (tableau XIV) suivants :

Volumes (µL)	n = 1
2X PCR Master Mix	12.5
7-deaza-2 deoxy GTP 10 mM	0.5
DMSO	1.75
5x Solution Q	5
Amorce P1 33 µM	0.42
Amorce P2 17 µM	0.42
Amorce P3 33 µM	0.42
Total Mix	**21**
ADN à 50 ng / 100 µL	**4**
Total final	**25**

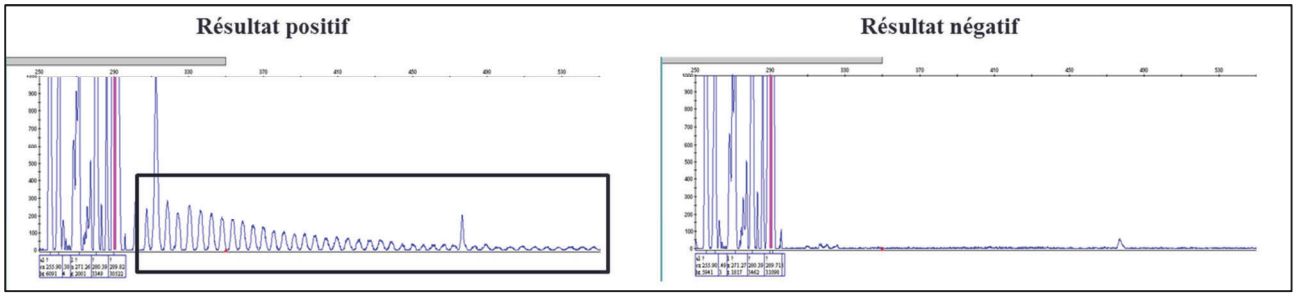
Tableau XIII : mix RP-PCR *C9ORF72*

Dénaturation initiale	95°C	15 min	
Dénaturation	94°C	1 min	**2-8 cycles**
Hybridation	**70-58°C**	1 min	1 cycle supplémentaire par diminution de 2°C
Elongation	72°C	3 min	
Dénaturation	94°C	1 min	
Hybridation	**56°C**	1 min	**5 cycles**
Elongation	72°C	3 min	
Elongation finale	72°C	10 min	

Tableau XIV : protocole RP-PCR *C9ORF72*

Le protocole d'amplification était constitué ici d'un touchdown (diminution de la température d'hybridation des amorces au cours des cycles afin de faciliter la formation des amplicons). Par ailleurs, la concentration initiale en ADN était supérieure à celles des PCR précédemment décrites (50 ng/100 µL contre 15 ng/100 µL précédemment) afin de garantir des concentrations finales d'amplicons satisfaisantes. A la fin de la réaction d'amplification,

une étape de dénaturation au formamide (95°C pendant 5 min) puis par choc thermique (40C pendant 2 min) permettait de maintenir les amplicons sous forme de simple brin d'ADN et on ajoutait également pour chaque patient un marqueur de taille GeneScan Rox 500 HD (Thermo Fisher Scientific®) selon les ratios suivants : Formamide/Marqueur/Amplicon = 14.6 µL/0.4 µL/1µL. L'analyse des fragments était réalisée sur le séquenceur capillaire ABI 3500 xL (Applied Biosystems®) puis interprétée à l'aide du logiciel GeneMapper (Thermo Fisher Scientific®). Les résultats obtenus sont qualitatifs : un résultat positif témoignant de la présence d'une grande expansion de répétitions G_4C_2 est mise en évidence par la présence d'un profil particulier en dents de scie (figure 29). Cependant, la taille des expansions n'est pas calculable par cette technique.



<u>Figure 29</u> : Exemples d'un résultat positif (à gauche) et d'un résultat négatif (à droite) par la technique de RP-PCR *C9ORF72*

- **Southern Blot : quantification des expansions du gène *C9ORF72***

Le Southern Blot permet la mise en évidence de grands fragments d'ADN d'intérêt par électrophorèse puis hybridation avec une sonde complémentaire. Cette technique est actuellement la seule à pouvoir estimer la taille des allèles porteurs de répétitions G_4C_2 observées dans les DLFT, où l'on peut observer plusieurs centaines voire milliers de ces répétitions (Woollacott and Mead 2014). Cette technique est totalement manuelle et le délai de réalisation technique est d'une semaine environ. Les différentes étapes de la réalisation technique du Southern Blot *C9ORF72* sont détaillées ci-dessous.

La première étape consistait en une digestion enzymatique de l'ADN pendant 1 nuit à 37°C : 5 µg d'ADN étaient mélangés à 1.5 µL d'enzyme de restriction XbaI (New England

Biolabs®), en présence de CutSmart Buffer (3 µL) et de spermidine (1µL), pour un volume final total de 30 µL. L'enzyme de restriction XbaI clivait dans ces conditions l'ADN au site de restriction T^CTAGA, formant ainsi de nombreux fragments d'ADN de taille réduite. Le CutSmart Buffer permettait d'activer l'enzyme, optimisant alors la digestion enzymatique. Six microlitres de 5x SLM (sucrose loading mix, réactif permettant d'alourdir les échantillons pour faciliter le dépôt dans le gel et de suivre leur migration) étaient ajoutés au mélange réactionnel qui était alors chauffé à 65°C pendant 15 minutes pour arrêter la réaction enzymatique.

Les fragments d'ADN ainsi créés étaient séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%. En parallèle, un marqueur de taille λ DNA-HindIII Digest (New England Biolabs®) était déposé en duplicat pour chaque gel réalisé. La migration durait une nuit avec un voltage appliqué de 27 Volts : la migration se déroulait de la cathode vers l'anode, avec une mobilité accrue pour les fragments d'ADN de petite taille. Une étape de dépurination (HCl 0.25N) puis de dénaturation du gel en solution alcaline dénaturait les molécules d'ADN double brin en simple brin pour faciliter l'étape de transfert. Les brins d'ADN étaient alors transférés du gel d'agarose sur une membrane en nylon Hybond-XL (Amersham®) par capillarité pendant 1 nuit en contact avec du tampon saline sodium citrate (SSC).

Une sonde spécifique de la région d'ADN à hybrider (280 pb) avait été préparée préalablement au sein de laquelle était intégrée des nucléotides marqués au phosphore 32 ($dCT^{32}P$). Après purification par chromatographie d'exclusion, la sonde radioactive était alors mise en contact avec la membrane pendant une nuit à 65°C sous une faible agitation. La membrane était alors lavée plusieurs fois au SSC pour éliminer la sonde radioactive en excès et placée dans une cassette hermétique, en contact d'un écran (face blanche contre la membrane) pendant une nuit au minimum. La luminescence émise était alors mesurée par le scanner Fujifilm FLA7000® et les résultats étaient interprétés avec le logiciel Multi Gauge Analysis®. La taille des bandes observées était alors quantifiée en comparant la distance de migration de chaque bande par rapport au marqueur de taille posé sur chaque gel (6 bandes correspondant à des fragments d'ADN de 2027 à 23130 pb. Les allèles sains migraient le plus loin (petits fragments en bas sur la figure 30 C) et les grandes expansions présentes chez

certains patients formaient des *smear* dont le centre était utilisé pour la quantification (en haut sur la figure 30 C).

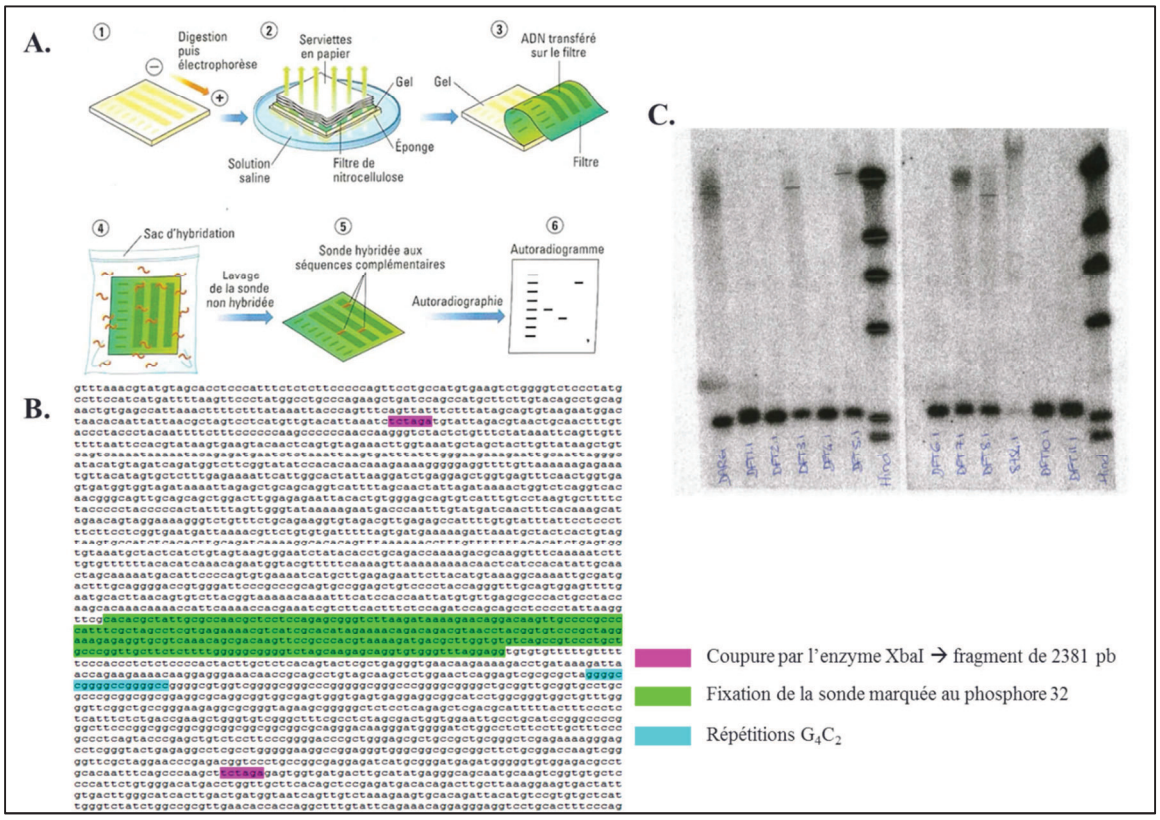


Figure 30 : A. Principe général du Southern Blot - Dreyer 2012 , B. Fragment d'ADN étudié après digestion enzymatique (entre les bases en rose) présentant la région d'hybridation de la sonde radioactive (en vert) et la zone d'intérêt (en bleu) ; C. Exemple de résultat après analyse sur le logiciel Multi Gauge Analysis

1.2 Résultats obtenus dans le cadre du diagnostic moléculaire

Six patients avec un diagnostic de DLFT certaine d'après les résultats immunohistochimiques sur tissu cérébral ont pu être sélectionnés au sein du laboratoire. Parmi ces 6 patients, 2 d'entre eux avaient été diagnostiqués comme DLFT-Tau (les phénotypes cliniques étaient respectivement une variante comportementale et une PSP). Un diagnostic certain de DLFT-TDP43 avait été posé pour les 4 patients restants d'après les résultats des examens immunohistochimiques. Parmi ces 4 patients, 3 présentaient un phénotype clinique de variant comportemental de DLFT associé à une sclérose latérale amyotrophique et le dernier présentait un variant comportemental de DLFT. Deux patients (un homme et une femme) présentaient une grande expansion sur le gène *C9ORF72*. Parmi les 72 patients de la cohorte

prospective, 12 grandes expansions sur le gène *C9ORF72* et 2 variants sur le gène *GRN* ont été mis en évidence. Sur les 78 prélèvements analysés, 16 mutations ont donc été mises en évidence.

La figure 31 reprend la méthodologie de sélection des patients analysés ainsi que les résultats obtenus :

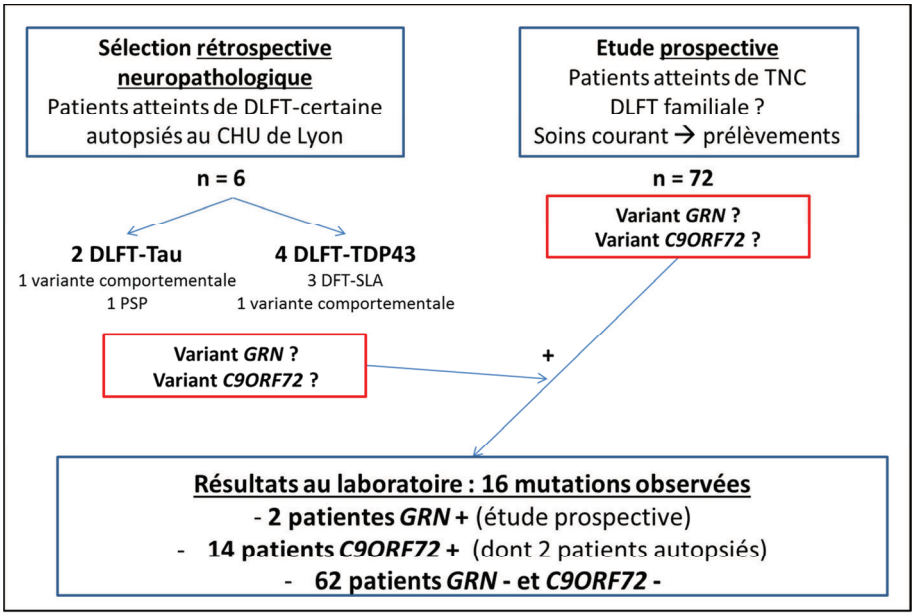


Figure 31 : Sélection des patients analysés et résultats obtenus pour la recherche de variants sur les gènes *GRN* et *C9ORF72*

1.2.1 Variants pathogènes dans le gène *GRN*

Le premier variant pathogène a été mis en évidence dans l'exon 6 du gène *GRN* et consistait en une duplication d'une paire de base (localisation génomique Chr17 :g.44350545dup et localisation au niveau de l'ADN codant : c.566dup), à l'origine d'un décalage du cadre de lecture à partir du codon Lys190 de la protéine. Le nouveau cadre de lecture se terminait sur un codon STOP 8 positions en aval - nomenclature au niveau protéique p.(Lys190Glufs*8) -.

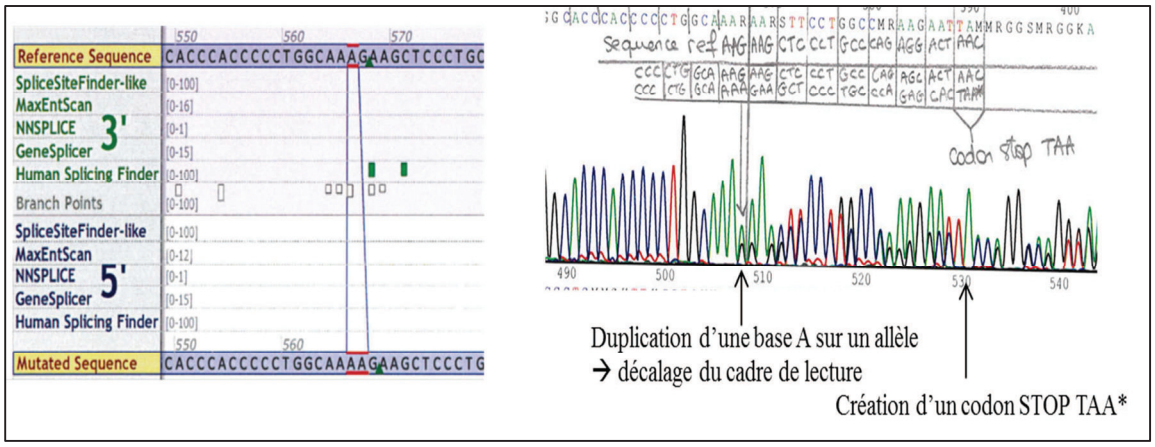


Figure 32 : Résultats Alamut et Seqscape pour une patiente présentant le premier variant pathogène *GRN*

Le deuxième variant pathogène était localisé dans l'exon 5 du gène *GRN* et consistait en une délétion de 2 paires de bases (localisation génomique Chr17 :g.44350321_44350322del et localisation au niveau de l'ADN codant : c.443_444del). Ce variant était donc à l'origine d'un décalage du cadre de lecture à partir du codon Gly148 de la protéine. Le nouveau cadre de lecture se terminait lui aussi sur un codon STOP 11 positions en aval - nomenclature au niveau protéique p.(Gly148Valfs*11) -.

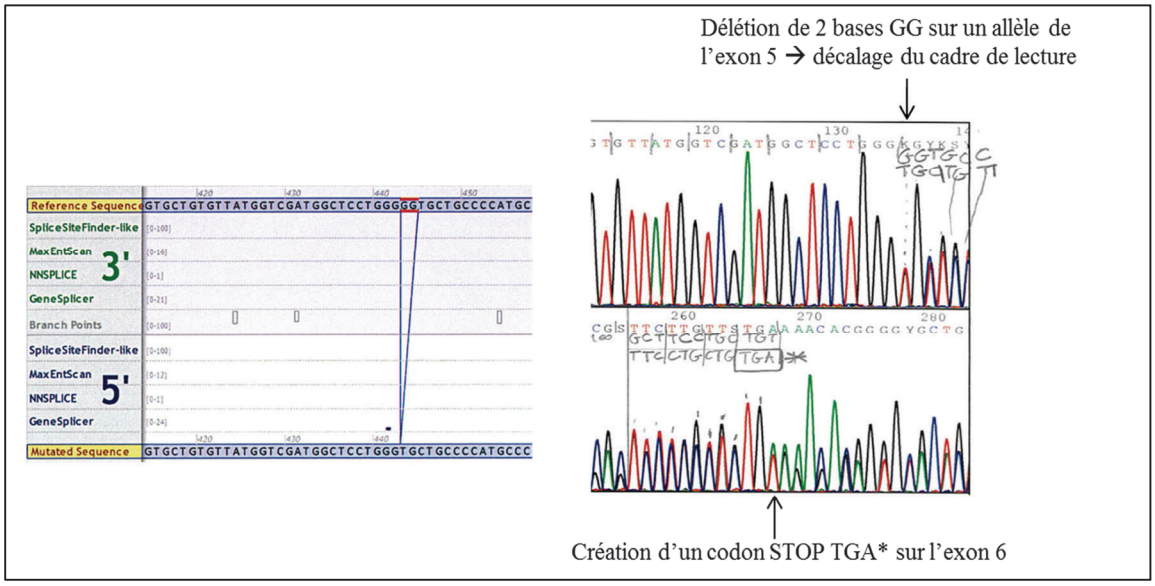


Figure 33 : Résultats Alamut et Seqscape pour une patiente présentant le deuxième variant pathogène *GRN*

Il est intéressant de noter que ces 2 variants ne sont pas encore répertoriés dans la base de données *Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database*. La pathogénie de ces nouveaux variants, très probable du fait de l'apparition d'un codon STOP quelques acides aminés en aval du variant et à l'origine de la formation d'une protéine progranuline prématurément tronquée, a été confirmée par le dosage de cette dernière (voir partie 2.2.1 : La protéine progranuline : un bon marqueur diagnostique ?).

1.2.2 Grandes expansions (G4C2)n sur le gène C9ORF72

Quatorze patients (7 hommes et 7 femmes) présentaient un profil en dents de scie avec la technique de la RP-PCR *C9ORF72*, ce profil étant synonyme de la présence d'une grande expansion d'hexanucléotides $(G_4C_2)_n$ sur ce gène. La technique de PCR *C9ORF72* mettait en évidence pour tous ces patients la présence d'un seul allèle : ce résultat était donc concordant avec la RP-PCR *C9ORF72* puisque la PCR classique n'est pas capable d'amplifier les allèles pathologiques porteurs de grandes expansions $(G_4C_2)_n$. Parmi ces 14 patients, la technique de Southern Blot, la seule capable de quantifier la taille des expansions, a pu être réalisée pour 10 patients. En effet, un patient présentait une quantité d'ADN extrait trop faible pour la réalisation de la technique du Southern Blot, l'ADN d'un deuxième patient avait été précédemment extrait par technique automatisée à l'origine d'une qualité et d'un volume d'ADN insuffisants pour cette technique et 2 patients dont le Southern Blot reste en attente car le diagnostic moléculaire est très récent. Le Southern Blot a également été réalisé pour 59 patients dont le profil était négatif en RP-PCR (5 patients en attente).

Tous les patients positifs en RP-PCR qui ont pu être analysés par la technique du Southern Blot ont présenté un allèle pathologique (la spécificité de la technique RP-PCR était donc de 100% en comparaison de la technique de référence). Aucun profil négatif en RP-PCR n'a présenté un allèle pathologique de grande taille par la technique du Southern Blot (sensibilité de 100%). Ces résultats étaient donc excellents mais sont à relativiser vu le faible nombre de patients positifs dans notre cohorte de patients. En effet, chez certains patients, la présence de variants rares situés au niveau de la fixation de l'amorce P1 de la RP-PCR (en amont des expansions) peut être à l'origine de résultats faussement négatifs par cette technique (Cleary, Pal et al. 2016). Les auteurs préconisaient alors la réalisation d'une

deuxième RP-PCR (avec l'amorce P1 en aval des expansions) ou l'analyse par Southern Blot des prélèvements dont la PCR classique mettait en évidence un seul allèle.

La taille des grandes expansions a pu être déterminée en comparant les distances de migration des allèles pathologiques à celles des marqueurs de poids moléculaire déposés lors de chaque essai : l'expansion détectée la plus petite était de 4.6 kilobases, soit 766 répétitions de l'hexanucléotide $(G_4C_2)_n$. L'expansion la plus grande mesurait 24 kilobases (4000 répétitions de l'hexanucléotide). Enfin, la valeur médiane des expansions était de 17.7 kilobases (2950 répétitions). Ces résultats sont donc au-delà du seuil habituellement retenu de 30 répétitions de l'hexanucléotide $(G_4C_2)_n$ et sont bien corrélés avec les données de la littérature où la taille des expansions est estimée entre plusieurs centaines et milliers de répétitions (Woollacott and Mead 2014, Van Mossevelde, van der Zee et al. 2017). Parmi les cas positifs, le Southern Blot a pu être réalisé pour 2 apparentées (une mère et sa fille) : elles présentaient respectivement un allèle pathologique de 16.3 kilobases (soit 2718 hexanucléotides) et de 17.4 kilobases (soit 2900 hexanucléotides). Malgré une incertitude dans la mesure de la taille des bandes par la technique du Soutern Blot, ce phénomène d'augmentation de la taille des allèles pathologiques au fil des générations avait déjà été décrit lors de l'analyse des familles atteintes de DLFT et porteuses d'expansions *C9ORF72* (Van Mossevelde, van der Zee et al. 2017), et pourrait participer au phénomène d'anticipation de la maladie, à savoir une déclaration des symptômes de plus en plus précoce au fil des générations (Gijselinck, Van Mossevelde et al. 2016). Ce mécanisme avait par ailleurs été décrit dans d'autres pathologies neurodégénératives associées à des expansions de nucléotides comme la maladie de Huntington (Ridley, Frith et al. 1988) ou les dystrophies myotoniques (Meola and Cardani 2015) par exemple.

1.2.3 Distribution des allèles sains sur le gène C9ORF72

Sur la cohorte de 78 patients, 14 patients (18.0 %) portaient une grande expansion $(G_4C_2)_n$ sur le gène *C9ORF72* et présentaient donc un seul allèle sain. Les 64 patients non porteurs d'une grande expansion présentaient 2 allèles sains : 49 patients (62.8 %) étaient hétérozygotes et 15 patients (19.2 %) étaient homozygotes. Le nombre total d'allèles sains était par conséquent de 142.

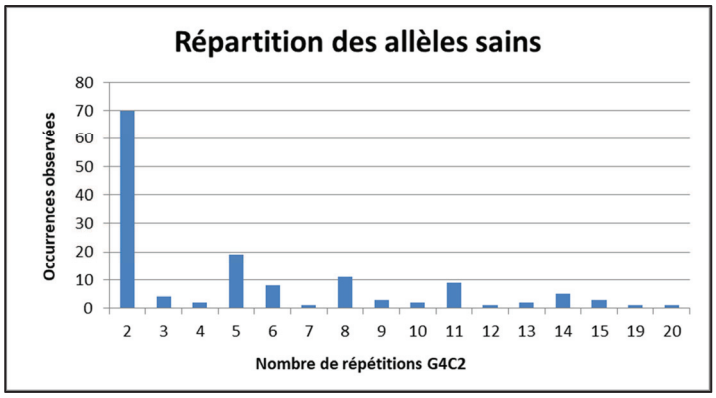


Figure 34 : Distribution des allèles sains pour le gène *C9ORF72*

Le principal allèle sain observé était l'allèle à 2 répétitions de l'hexanucléotide G_4C_2 (49 % de l'ensemble des allèles sains observés). Les autres allèles fréquemment observés étaient les allèles à 5 répétitions (13 %), 8 répétitions (8 %) et 11 répétitions (6 %). Cette répartition multimodale, avec une forte prévalence de l'allèle sain à 2 répétitions, est concordante avec les données de la littérature et est retrouvée pour les différentes ethnies étudiées (Renton, Majounie et al. 2011, Kohli, John-Williams et al. 2013).

1.2.4 Fréquence des variants pathogènes pour les gènes GRN et C9ORF72

Dans notre cohorte de 78 patients pour lesquels le diagnostic génétique de DLFT-TDP43 a été réalisé, 2 patientes (2.6 %) ont présenté un variant pathogène sur le gène *GRN* et 14 patients (17.9 %) présentaient une grande expansion pathologique sur le gène *C9ORF72*. La prévalence des cas positifs observée dans notre étude pour le gène *C9ORF72* est concordante avec celle obtenue dans la population française : une étude de Le Ber *et al.* décrivait en 2013 une proportion de 18.1 % de patients porteurs d'une grande expansion sur ce gène parmi une cohorte de 833 patients souffrant de DLFT (Le Ber, Camuzat et al. 2013). Dans cette même étude, la proportion de patients atteints d'une mutation sur le gène *GRN* était de 5.6 %. Une étude antérieure de 2008 sur une cohorte de 502 patients avait retrouvé une fréquence de 4.8 % (Le Ber, Camuzat et al. 2008). La fréquence des mutations du gène *GRN* observée dans notre cohorte (2.6 %) est donc inférieure à celles précédemment décrites. Cependant, cette différence peut être expliquée par un biais de sélection dans notre étude, où les tubes de sang pour la recherche génétique ont été prélevés sur des arguments cliniques, en parallèle des marqueurs du LCS et d'autres examens paracliniques comme l'imagerie. Sept patients

présentaient finalement des marqueurs du LCS compatibles avec une maladie d'Alzheimer biologique. On pourrait alors supposer que ces patients présentaient une variante comportementale de la maladie d'Alzheimer, dont la symptomatologie clinique est très proche de la variante comportementale des DLFT. L'inclusion de ces patients entraînait alors de fait une sous-estimation des fréquences des mutations *GRN* et *C9ORF72* dans notre cohorte.

2. Description de la cohorte de cas certains DLFT-TDP43

Les résultats précédemment obtenus dans le cadre du développement des outils de biologie moléculaire pour les variants sur les gènes *C9ORF72* et *GRN*, associés aux 2 sélections rétrospectives de patients porteurs d'une de ces mutations ou autopsiés avec présence d'agrégats TDP43, nous permettent de constituer une cohorte de 26 patients dont le diagnostic de DLFT-TDP43 est certain (génétique et/ou neuropathologique). La figure 35 récapitule les effectifs et la provenance de cette cohorte de cas certains DLFT-TDP43 :

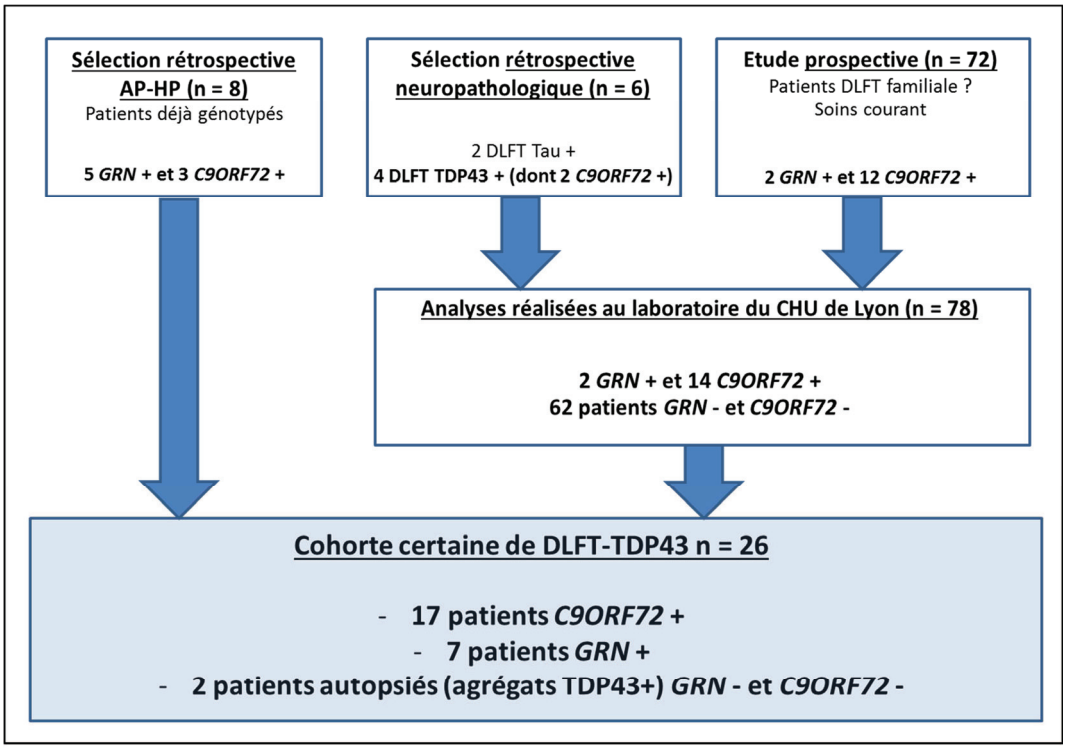


Figure 35 : Constitution de la cohorte de cas certains DLFT-TDP43

Le tableau XV décrit les caractéristiques démographiques, les phénotypes cliniques observés et la disponibilité des prélèvements au laboratoire pour cette cohorte de cas certains DLFT-TDP43.

N°	Identité	Sexe	Age	Phénotype	Génétique	Neuropathologie	LCS	Plasma
1	DARBGil3148	H	70	DFT-SLA	*C9ORF72*	TDP43 +	OUI	OUI
2	GOUTNic1158	F	60	DFT-SLA	*C9ORF72*	N.R	OUI	OUI
3	MAURLou2241	H	77	DFT	*C9ORF72*	N.R	OUI	N.D
4	BLANJea1043	F	75	DFT	*C9ORF72*	N.R	OUI	OUI
5	BLANFlo0762	F	54	DFT-SLA	*C9ORF72*	N.R	N.D	N.D
6	CHITAla0442	H	76	DFT	*C9ORF72*	N.R	OUI	OUI
7	DOUCHub0637	H	81	DFT	*C9ORF72*	N.R	OUI	OUI
8	GRILMar1234	F	84	DFT	*C9ORF72*	N.R	OUI	OUI
9	WEBEJea2743	H	75	DFT	*C9ORF72*	N.R	OUI	N.D
10	GRATGhi1170	F	48	DFT	*C9ORF72*	N.R	OUI	N.D
11	ROUDJac1947	H	71	DFT	*C9ORF72*	N.R	OUI	OUI
12	ROUSAlb2345	H	73	DFT	*C9ORF72* (AP-HP)	N.R	OUI	N.D
13	GRIEChr1554	H	64	DFT	*C9ORF72*	N.R	OUI	N.D
14	REDJAnn2348	F	70	DFT	*C9ORF72*	N.R	OUI	OUI
15	VALLJea1261	H	57	DFT	*C9ORF72* (AP-HP)	N.R	OUI	N.D
16	TREBCla0748	F	70	DFT-SLA	*C9ORF72* (AP-HP)	N.R	OUI	N.D
17	OBISFan1143	F	75	DFT-SLA	*C9ORF72*	TDP43 +	OUI	N.D
18	CARDMan1641	H	77	DFT	*GRN (*AP-HP)	N.R	OUI	N.D
19	HAMEXav3151	H	67	DFT	*GRN* (AP-HP)	N.R	OUI	N.D
20	MAURJac1647	F	77	DFT	*GRN* (AP-HP)	N.R	OUI	N.D
21	PIANBru2364	H	54	DFT	*GRN* (AP-HP)	N.R	OUI	N.D
22	FACHJos1448	F	70	DFT	*GRN* (AP-HP)	N.R	OUI	N.D
23	CHLAIsa2655	F	63	DFT	*GRN*	N.R	N.D	OUI
24	JANTMir0158	F	60	DFT	*GRN*	N.R	OUI	OUI
25	MORENic2254	F	64	DFT-SLA	ni *C9ORF72*, ni *GRN*	TDP43 +	OUI	N.D
26	GARYMar1948	F	70	DFT	ni *C9ORF72*, ni *GRN*	TDP43 +	OUI	N.D

Tableau XV : Description de la cohorte des cas certains DLFT-TDP43 : données démographiques, cliniques et disponibilité des prélèvements biologiques

DFT : variant comportemental ; DFT-SLA : variant comportemental et sclérose latérale amyotrophique ; AP-HP : diagnostic moléculaire réalisé précédemment par le laboratoire de Neurogénétique Moléculaire de la Pitié-Salpêtrière ; N.R : non réalisé ; N.D : non disponible

3. Le dosage des protéines progranuline et C9orf72 : un outil de screening performant ?

Les variants pathogènes observés sur le gène *GRN* sont principalement des mutations de type non-sens et des micro-insertions ou délétions à l'origine d'un décalage du cadre de lecture, dont le point commun est la formation prématurée d'un codon Stop. Ce mécanisme, appelé haplo-insuffisance, est à l'origine d'une diminution de la concentration en protéine progranuline mesurée dans différentes matrices biologiques. Le dosage de la progranuline est donc proposé comme biomarqueur pour un screening à large échelle des porteurs de mutations sur le gène *GRN*, qu'ils soient symptomatiques ou non (Finch, Baker et al. 2009, Ghidoni, Paterlini et al. 2012, Galimberti, Fumagalli et al. 2018). Ce mécanisme est cependant toujours débattu pour expliquer la pathogénie des grandes expansions sur le gène *C9ORF72* (Gendron and Petrucelli 2018). Nous nous sommes donc intéressés au dosage de ces deux protéines dans le plasma et/ou le liquide cérébrospinal, comme marqueurs de la présence de mutations sur les gènes *GRN* et *C9ORF72*.

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Prélèvements

Parmi les 72 patients suspects de DLFT familiale provenant de la cohorte précédemment décrite (voir partie 1.1.1), nous disposions de 51 prélèvements de plasma et de 36 prélèvements de LCS. Le plasma provenait des tubes EDTA réceptionnés dans le cadre de l'analyse génétique, préparé et conservé d'après le protocole de préparation des matrices biologiques issues du sang total présenté en annexe 3 de ce manuscrit. Si une analyse des marqueurs du LCS avait été prescrite, le prélèvement réalisé dans un tube en polypropylène Sarstedt® (référence 62 610 201) était centrifugé, aliquoté et conservé à -80°C jusqu'au moment des analyses pour les marqueurs de routine ou complémentaires dans le cadre de cette étude d'après les protocoles de prélèvement, d'envoi et de réception des échantillons habituellement préconisés par le laboratoire. Tous les prélèvements de plasma et de LCS obtenus grâce à la cohorte prospective n'ont pas forcément été utilisés pour l'étude des marqueurs protéiques progranuline et C9orf72.

- **Prélèvements sélectionnés pour le dosage de la progranuline dans le plasma**

Vingt-sept prélèvements plasmatiques provenant de la cohorte prospective ont été analysés : 2 patientes avec une mutation non-sens *GRN* (voir partie 1.2.1) ; 3 patients avec une grande expansion *C9ORF72* et 22 patients dont le diagnostic moléculaire pour les gènes *GRN* et *C9ORF72* était négatif.

- **Prélèvements sélectionnés pour le dosage de la progranuline dans le LCS**

Vingt-six prélèvements de LCS ont été analysés : les 5 patients porteurs d'une mutation sur le gène *GRN* préalablement diagnostiqués à l'AP-HP pour lesquels nous disposions de prélèvements de LCS, 8 prélèvements de patients porteurs d'une grande expansion *C9ORF72* et 14 prélèvements de patients souffrant d'une maladie d'Alzheimer probable (nous disposions dans la cohorte prospective de 7 prélèvements de LCS de patients compatibles avec une maladie d'Alzheimer biologique ; nous avons donc complété ce groupe de patients par 7 prélèvements avec un diagnostic clinique et biologique de maladie d'Alzheimer).

- **Prélèvements sélectionnés pour le dosage de la protéine C9orf72 dans le plasma**

Trente-trois prélèvements plasmatiques issus de la cohorte prospective ont été analysés : 7 patients étaient porteurs d'une grande expansions $(G_4C_2)_n$ sur le gène *C9ORF72* et les 26 patients restants étaient négatifs pour ce diagnostic moléculaire.

3.1.2 Dosage de la protéine progranuline

Les dosages de la progranuline ont été réalisés par technique ELISA avec le kit spécifique *Progranulin human* (Adipogen®) sur l'automate DS2 (Dynex Technologies®), selon les instructions du fournisseur. Brièvement, les échantillons de LCS et de plasma étaient dilués respectivement au 1/5ème et 1/200ème dans du tampon ELISA 1X selon les recommandations du kit. Huit standards (de 0 à 4 ng/mL) étaient préparés par des dilutions en cascade à partir

d'une solution mère de progranuline fournie dans le kit. Les standards, contrôles et patients (100 µL/puits) étaient déposés dans la plaque ELISA sur laquelle un anticorps polyclonal anti-progranuline était coaté. Après 1 heure d'incubation à 37°C, 3 cycles de lavage étaient effectués avec 300 µL/puits de tampon de lavage 1X. L'anticorps de détection était ensuite déposé (100 µL/puits). A la suite d'une nouvelle incubation d'1 heure à 37°C, la plaque était une nouvelle fois lavée (3 cycles de lavage). Cent microlitres de Streptavidine HRP étaient ajoutés dans chaque puits et la plaque était incubée pendant 1 heure à 37°C. Cinq cycles de lavage étaient effectués. Finalement, 100 µL de TMB étaient ajoutés dans chaque puits. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante et dans le noir, 100 µL de solution Stop étaient ajoutés. La lecture des absorbances était effectuée à 450 nm. Les concentrations des contrôles et des échantillons étaient déterminées en regard de la gamme d'étalonnage obtenue grâce aux 8 standards (étalonnage quadratique). Les données de répétabilité (variabilité intra-essai) et de fidélité intermédiaire (variabilité inter-essai) étaient proches de 10 %, donc conformes pour un dosage par technique ELISA.

3.1.3 Dosage de la protéine C9orf72

Les dosages ont été effectués manuellement à l'aide du kit de dosage ELISA *Human C9orf72* (Cusabio®) selon les instructions du fournisseur. Huit standards (de 0 à 2000 pg/mL) étaient préparés à partir d'une solution mère de standard contenue dans le kit par des dilutions en cascade. Les échantillons de standards et de patients (100 µL/puits) étaient déposés dans la plaque ELISA sur laquelle un anticorps anti-C9orf72 était coaté. Après 2 heures d'incubation à 37°C, les prélèvements étaient éliminés et 100 µL/puits d'anticorps biotinylé étaient déposés, sans aucun lavage. A la suite d'une nouvelle incubation d'1 heure à 37°C, la plaque était une lavée (3 cycles de lavage avec 200 µL de solution de lavage par puits pendant 2 minutes). Cent microlitres d'avidine-HRP étaient ajoutés dans chaque puits et la plaque était incubée pendant 1 heure à 37°C. Cinq cycles de lavage étaient encore effectués. Finalement, 90 µL de TMB étaient ajoutés dans chaque puits. Après 30 minutes d'incubation à 37°C et dans le noir, 50 µL de solution Stop étaient ajoutés. La lecture des absorbances était effectuée à 450 nm (longueur d'onde principale) et à 540 nm (longueur d'onde de correction). Les concentrations des échantillons étaient déterminées en regard de la gamme d'étalonnage obtenue grâce aux 8 standards (étalonnage avec un modèle logistique à 4 paramètres). Des essais préliminaires ont été réalisés pour tester les matrices plasma et LCS. Les échantillons

plasmatiques présentaient des densités optiques quantifiables ou au-delà du premier point d'étalonnage : il a donc été décidé de diluer tous les échantillons plasmatiques au 1/10ème pour la quantification de la protéine C9orf72. Les échantillons de LCS présentaient une absorbance identique au blanc de la réaction : ils ne pouvaient pas être utilisés dans cet essai. Les données de répétabilité pour le plasma (variabilité intra-essai) étaient inférieures à 10 %, donc conformes à nos exigences.

3.1.4 Traitement statistique des données

Les données des différents essais ELISA ont été analysées avec le logiciel statistique MedCalc® version 15.11.4. La médiane, la concentration minimale et la concentration maximale ont été déterminées pour les différentes populations constituées. Les tests de Mann-Whitney (2 populations) ou de Kruskal-Wallis (3 populations ou plus) ont été effectués afin de déterminer des différences significatives entre les différentes populations (au seuil de 5%). L'étude des performances diagnostiques a été réalisée grâce à la détermination des courbes ROC (*Receiving Operator Characteristic*) pour chacun des marqueurs. Les cut-offs ont alors été déterminés grâce à l'index de Youden : Y = Sensibilité + Spécificité - 1.

3.2 Résultats des dosages protéiques et discussion

3.2.1 La protéine progranuline : un bon marqueur diagnostique ?

La figure 36 décrit les performances diagnostiques obtenues pour la progranuline plasmatique :

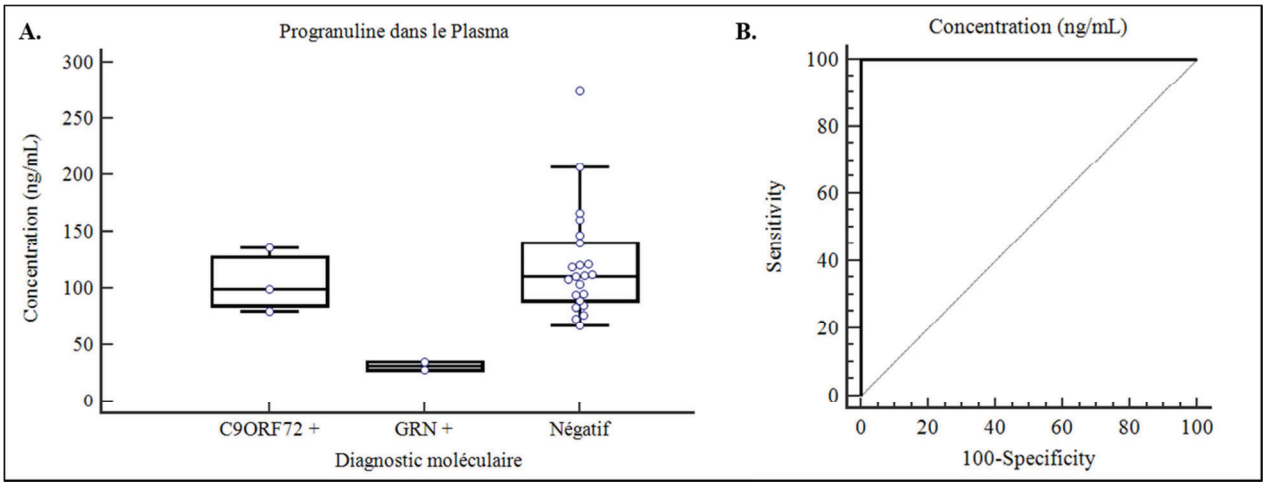


Figure 36 : Performances diagnostiques de la progranuline plasmatique

A. Distribution de la progranuline dans les cohortes *C9ORF72* +, *GRN* + et diagnostic moléculaire négatif ; B. courbe ROC pour la progranuline plasmatique

La figure 37 détaille les performances diagnostiques obtenues pour la progranuline dans le LCS :

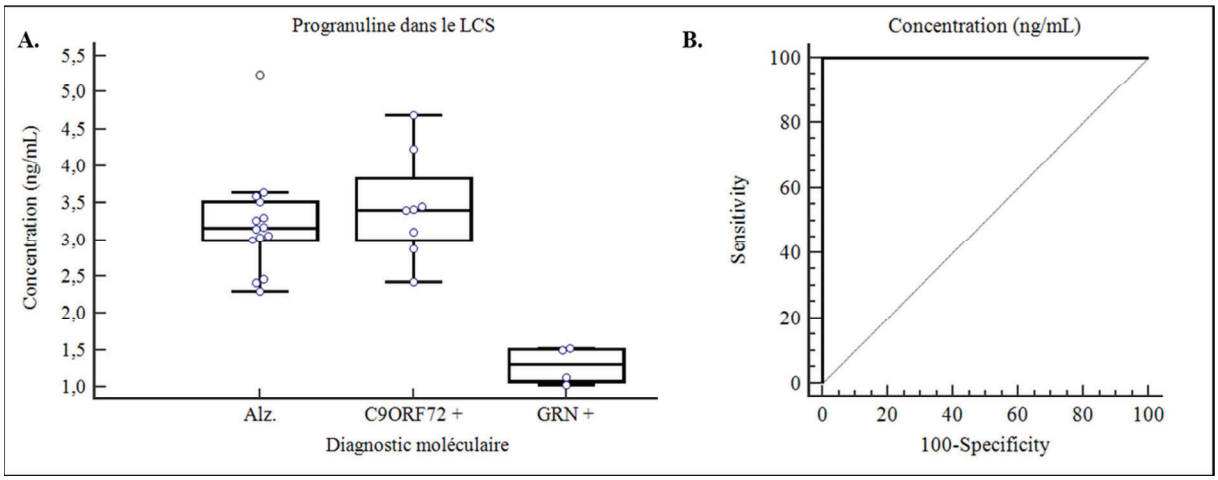


Figure 37 : Performances diagnostiques de la progranuline dans le LCS

A. Distribution de la progranuline dans les cohortes *C9ORF72* +, *GRN* + et Alzheimer probable ; B. courbe ROC pour la progranuline dans le LCS

Concentrations (ng/mL)	**Progranuline plasmatique**		**Progranuline dans le LCS**	
	GRN + (n = 2)	*GRN* - (n = 25)	*GRN* + (n = 5)	*GRN* - (n = 22)
Valeur minimale	28	67	1.0	2.3
Valeur médiane	**32**	**110**	**1.4**	**3.2**
Valeur maximale	35	274	1.5	5.3

Tableau XVI : Concentrations obtenues en progranuline dans le plasma et le LCS

Des différences significatives était observées entre les populations *GRN* + et les autres populations étudiées dans le plasma (p-value = 0.02) et dans le LCS (p-value = 0.0006). Les performances diagnostiques du dosage de la progranuline étaient excellentes dans le plasma et dans le LCS, avec des AUC à 1 pour les deux matrices. Une étude comportant de très grandes cohortes, à savoir 75 patients présentant une mutation sur le gène *GRN* et 944 contrôles ou patients déments non porteurs d'une mutation *GRN*, avait présenté une sensibilité et une spécificité de 95.8 % et 99.6 % respectivement pour la progranuline plasmatique. Le cut-off déterminé dans cette étude était de 62 ng/mL avec le même kit de dosage Adipogen®. Par ailleurs, cette valeur permettait de déterminer les porteurs d'une mutation *GRN*, qu'ils soient symptomatiques ou non (Ghidoni, Stoppani et al. 2012). Ce cut-off plasmatique est concordant avec nos données (malgré un très faible nombre de patients porteurs d'une mutation *GRN*), puisque la valeur minimale observée pour nos contrôles était de 67 ng/mL. La diminution des concentrations en protéine progranuline chez les patients porteurs de mutations était de 71 % dans le plasma et de 56 % dans le LCS par rapport aux populations contrôles (comparaison des valeurs médianes) : ces résultats sont une nouvelle fois en accord avec les données de la littérature (Ghidoni, Benussi et al. 2008, Meeter, Patzke et al. 2016). Enfin, les patients porteurs d'une grande expansion sur le gène *C9ORF72* présentaient des concentrations en progranuline identiques à celles des patients sans mutation génétique pour le plasma et à celles des patients avec un diagnostic d'Alzheimer pour le LCS. Ces résultats avaient également été décrits pour une cohorte comprenant 7 patients porteurs d'une expansion sur le gène *C9ORF72* en comparaison de 62 patients non porteurs de la mutation (Dols-Icardo, Suarez-Calvet et al. 2012).

3.2.2 La protéine C9orf72 : un bon marqueur diagnostique ?

La figure 38 présente les performances diagnostiques de la protéine C9orf72 dans le plasma :

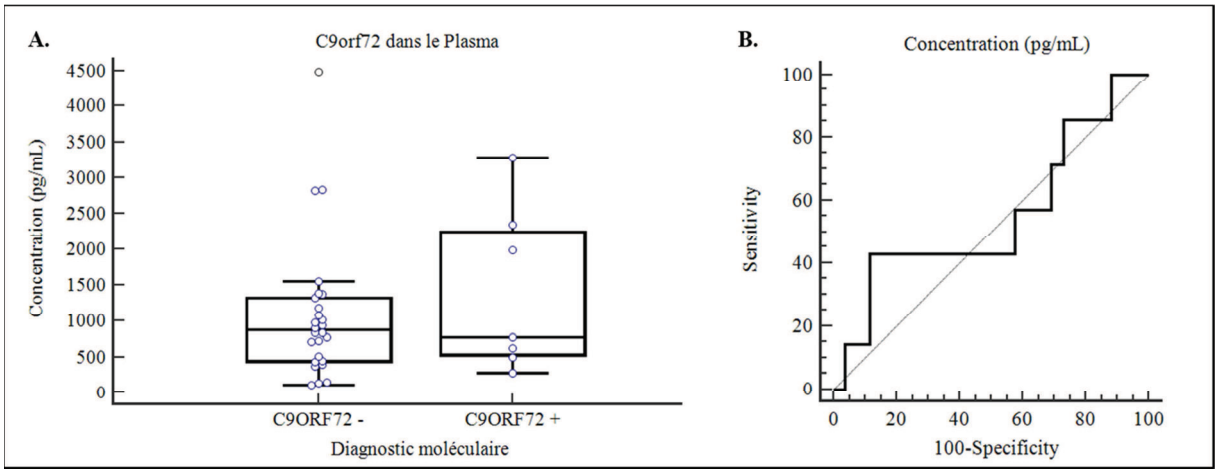


Figure 38 : Performances diagnostiques de la protéine C9orf72 plasmatique

A. Distribution de la protéine C9orf72 dans les cohortes *C9ORF72* + et *C9ORF72* - ; B. courbe ROC pour la protéine C9orf72 dans le plasma

Concentrations (pg/mL)	**Protéine C9orf72 plasmatique**	
	C9ORF72 + (n = 7)	*C9ORF72* - (n = 26)
Valeur minimale	283	119
Valeur médiane	**781**	**876**
Valeur maximale	3277	4490

Tableau XVII : Concentrations obtenues pour la protéine C9orf72 dans le plasma

Aucune différence statistique n'a pu être observée entre les cohortes de patients porteurs et non porteurs d'une grande expansion $(G_4C_2)_n$ sur le gène *C9ORF72* (p-value = 0.69). Ces résultats permettent tout d'abord d'apporter un élément contre l'hypothèse d'haplo-insuffisance comme étant le mécanisme pathogénique principal de la présence des expansions *C9ORF72*. Cependant, la protéine C9orf72 était mesurée dans cette étude dans un compartiment « périphérique ». Certaines études avaient mis en évidence une diminution des transcrits d'ARN *C9ORF72* dans le cortex frontal des patients atteints d'une grande expansion, sans pour autant confirmer cette diminution d'ARN sur le plan protéique (Belzil, Bauer et al. 2013, Waite, Baumer et al. 2014). L'étude parallèle du niveau d'expression des transcrits d'ARN et de la concentration en protéine C9orf72 dans des prélèvements cérébraux dont le diagnostic moléculaire est déterminé permettrait de renforcer ou tempérer nos hypothèses physiopathologiques. Par ailleurs, l'absence de différence dans les concentrations entre patients porteurs et non-porteurs d'une grande expansion sur le gène C9orf72 ne permet pas de proposer ce dosage protéique dans un cadre clinique avec ce kit ELISA comme un marqueur permettant d'orienter le diagnostic moléculaire des patients (AUC à 0.534).

Ce travail sur l'étude des concentrations de la protéine C9orf72 mesurée chez des patients porteurs ou non-porteurs d'une expansion $(G_4C_2)_n$ sur le gène *C9ORF72* a fait l'objet d'une publication internationale, présentée à la fin de ce document (Fourier, Formaglio et al. 2018).

Néanmoins, différents isoformes de la protéine C9orf72 existent (pour rappel, figure 25). Des essais de Western Blot automatisé (technologie Simple Western, détaillée dans la Partie III de ce travail) ont été réalisés sur ces mêmes échantillons plasmatiques avec l'anticorps de détection contenu dans le kit ELISA et avaient mis en évidence une bande à 54 kDa, pouvant correspondre à la forme longue de la protéine. L'isoforme de 24 kDa (forme courte de la protéine) n'avait pas été détectée. Deux raisons potentielles pourraient expliquer l'absence de cette protéine dans ces essais : la technique n'était pas assez sensible ou l'anticorps de détection ne permettait pas de mettre en évidence l'isoforme courte (épitope de l'anticorps en aval de la protéine). Il semblerait donc intéressant de pouvoir compléter cette étude quantitative par une détection spécifique de chaque isoforme de la protéine C9orf72 sur les échantillons plasmatiques pour confirmer nos résultats préliminaires.

PARTIE II : VARIATIONS QUANTITATIVES DES BIOMARQUEURS DU LCS DANS LA COHORTE DE CAS CERTAINS DE DLFT-TDP43

L'objectif principal de cette seconde partie du travail de thèse était de déterminer les concentrations de différents marqueurs du LCS au sein de notre cohorte de cas certains de DLFT-TDP43 (tableau XV) et de comparer ces résultats à d'autres cohortes de patients homogènes sur le plan clinique et/ou protéique.

Différents marqueurs protéiques du LCS ont été étudiés dans cette seconde partie du travail. Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux marqueurs biologiques de la maladie d'Alzheimer, à savoir la protéine Tau totale, sa forme phosphorylée en position 181 et le peptide amyloïde β 1-42 (McKhann, Knopman et al. 2011, Olsson, Lautner et al. 2016). Ces marqueurs sont prescrits dans le diagnostic étiologique et/ou différentiel des TNC de présentation atypique (Mouton-Liger, Wallon et al. 2014, Troussiere, Wallon et al. 2014).

Dans un second temps, nous avons étudié les concentrations des chaînes légères des neurofilaments (NFl) dans le LCS des patients. Les neurofilaments représentent le composant protéique du cytosquelette axonal le plus important sur le plan quantitatif. Les neurofilaments sont des hétéropolymères constitués d'une chaîne légère (*NfL*), d'une chaîne moyenne (*NfM*) et d'une chaîne lourde (*NfH*) et sont spécifiques du système nerveux central (Petzold 2005). Lors d'une dégénérescence axonale, qu'elle qu'en soit la cause, ces chaînes de neurofilaments se retrouvent en concentration augmentée dans le LCS et peuvent également être détectées dans le sang circulant (Zetterberg 2016). De bonnes performances analytiques sont obtenues pour les kits de dosages proposés (Oeckl, Jardel et al. 2016) et il existe de très bonnes corrélations de ce marqueur entre LCS et plasma/sérum dans des modèles animaux (Soylu-Kucharz, Sandelius et al. 2017) ou chez des patients (Novakova, Zetterberg et al. 2017). Ces raisons permettent d'expliquer notamment le nombre croissant d'études évaluant les performances diagnostiques et/ou pronostiques de ce marqueur.

Le dernier biomarqueur étudié était la protéine TDP43 totale. Depuis la découverte de la protéine TDP43 comme étant le principal constituant des inclusions ubiquitine-positives dans le cerveau des patients atteints de DLFT (Neumann, Sampathu et al. 2006), différentes équipes ont évalué si le dosage de cette protéine pouvait être un marqueur dans ces pathologies. Le LCS a notamment été étudié car cette matrice biologique, au contact du cerveau et de la moelle épinière, pourrait refléter des changements moléculaires intervenant

avant même une souffrance neuronale chez les patients à risque (Turner, Kiernan et al. 2009). Par ailleurs, il apparaîtrait concevable que les concentrations de protéine TDP43 dans le LCS soient corrélées à l'apparition d'inclusions de cette dernière dans le système nerveux central (Geser, Prvulovic et al. 2011).

1. Matériels et méthodes

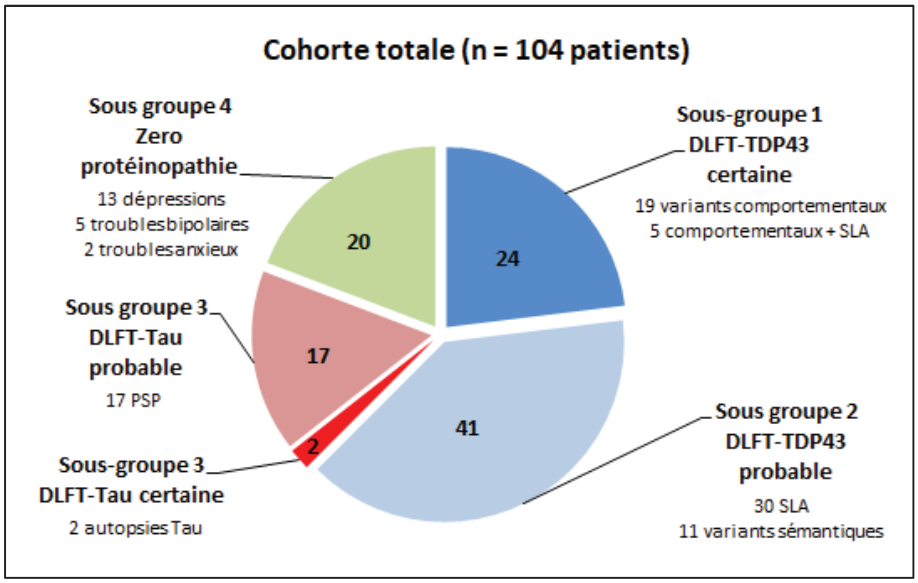
1.1 Constitution de la cohorte de patients étudiés

L'analyse des différents marqueurs biologiques précédemment cités dans le LCS a été réalisée sur une cohorte totale de 104 patients, divisée en 4 sous-groupes différant par le phénotype clinique observé. Pour l'ensemble des patients sélectionnés, un consentement d'utilisation des prélèvements restants à des fins de recherche était disponible. La démographie, les phénotypes cliniques et les résultats biologique sont présentés en annexe 4 de ce document pour l'ensemble de la cohorte.

Le premier sous-groupe était composé des 24 patients dont le diagnostic de DLFT-TDP43 était certain et pour lesquels des prélèvements de LCS étaient disponibles (exclusion des patients N° 5 et 23 du tableau XV). Ces patients présentaient soit un variant comportemental de DLFT (n = 19), soit un variant comportemental associé à une SLA (n = 5) (Rascovsky, Hodges et al. 2011). Le deuxième sous-groupe était composé de 41 patients dont la présence d'agrégats cérébraux de protéine TDP43 était probable. Cliniquement, 30 patients présentaient un phénotype clinique de SLA (Brooks 1994) et 11 patients présentaient un variant sémantique avec un profil biologique non compatible avec une maladie d'Alzheimer (Gorno-Tempini, Hillis et al. 2011). Ces deux phénotypes cliniques sont en effet fréquemment associés à une pathologie TDP43, avec une fréquence supérieure à 95% dans le cas des SLA notamment (Xu and Yang 2014, Landin-Romero, Tan et al. 2016). Le troisième sous-groupe était constituée de 19 patients avec présence certaine ou probable d'agrégats de protéine Tau et constituait donc une cohorte de patients atteints de TNC mais avec examen cérébral TDP43 négatif (de manière probable ou certaine). Au sein de cette cohorte, 2 patientes avaient un diagnostic certain de DLFT-Tau et présentaient cliniquement un variant comportemental pour

la première patiente et une PSP pour la deuxième. Les 17 patients restants présentaient un diagnostic probable de PSP (Litvan, Agid et al. 1996), avec pour conséquence la présence probable d'agrégats cérébraux de protéine Tau (Armstrong and Cairns 2013). Finalement, le quatrième sous-groupe était constitué de 20 patients présentant un diagnostic de pathologie psychiatrique et constituait donc une cohorte « non-TNC ». Treize patients présentaient une dépression majeure, cinq patients présentaient des troubles bipolaires et deux patients présentaient des troubles anxieux (American Psychiatric Association 2013).

Le premier sous-groupe de 24 patients DLFT-TD43 certaine a été composé de manière prospective (voir page 61). Les patients présentant un phénotype de variant sémantique, de PSP ou de pathologie psychiatrique ont été prélevés dans le cadre d'un diagnostic de soins courants. Pour ces patients, l'analyse des biomarqueurs du LCS de la maladie d'Alzheimer avait été réalisée en routine au laboratoire. Les échantillons pour ces patients ont été sélectionnés de manière rétrospective suite au diagnostic retenu à l'issue des réunions de concertation pluridisciplinaire. Finalement, les 30 patients atteints de SLA avaient été prélevés dans le cadre du soin courant. Les échantillons de LCS ont été conservés à des fins de recherche pour des analyses complémentaires avec accord du Comité d'Ethique des Hospices Civils de Lyon.



<u>Figure 39</u> : Cohorte de patients pour l'étude des biomarqueurs du LCS

1.2 Réalisation des dosages

Les dosages des marqueurs du LCS ont tous été réalisés par technique ELISA à l'aide de différents kits commercialisés selon les recommandations des fournisseurs, au laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand Est des Hospices Civils de Lyon. Tous les prélèvements analysés avaient été recueillis selon une procédure standardisée, aliquotés et conservés à -80°C avant analyse (Vanderstichele, Bibl et al. 2012). Les marqueurs Alzheimer ont été mesurés grâce aux kits de dosages Innotest® htau-Ag, Innotest® phospho-Tau (181P) et Innotest® β-amyloid 1-42 (Fujirebio®). Le dosage des chaînes légères des neurofilaments (*NfL*) a été réalisé à l'aide du kit NF-light (UmanDiagnostics®). Enfin, le dosage de la protéine TDP43 totale a été réalisé grâce au kit *Human TAR DNA-binding protein 43* (Cusabio®).

1.3 Analyses statistiques

Les données statistiques ont été analysées à l'aide du logiciel MedCalc®, version 15.11.4. La description statistique de chaque marqueur comprenait le nombre de patients étudiés, la médiane de la distribution du marqueur, les valeurs minimales et maximales, ainsi que les 25èmes et 75èmes percentiles pour chacun des sous-groupes. Les comparaisons des variables qualitatives dans l'ensemble des différents sous-groupes (sex-ratio) ont été réalisées à l'aide du test du Chi-deux. Les comparaisons des variables quantitatives (âge, résultats des marqueurs) ont été réalisées à l'aide du test de Kruskal-Wallis (avec un seuil de significativité choisi à $p = 0.01$), avec des tests *post-hoc* incluant une correction du seuil en cas de positivité (nouveau seuil $p = 0.01$). Les différences entre les sous-groupes étaient alors représentées à l'aide de graphiques de comparaisons multiples. Finalement, les différences entre 2 sous-groupes spécifiques ont été réalisées avec le test de Mann-Whitney (seuil de significativité $p = 0.05$). Les performances diagnostiques des marqueurs ont été étudiées à l'aide de courbes ROC (*Receiver Operating Characteristics*) et les sensibilités (Se) et spécificités (Sp) associées ont été déterminées grâce à l'index de Youden ($Y = Se + Sp - 1$).

2. Résultats et discussion

Les résultats des dosages quantitatifs sont détaillés pour l'ensemble des sous-groupes constitués dans l'annexe 4 de ce manuscrit. Il n'y avait aucune différence significative entre l'âge des patients (p = 0.03) ou entre les distributions hommes/femmes (p = 0.31) au sein des 4 cohortes.

2.1 Les marqueurs de la maladie d'Alzheimer isolés

Le tableau XVIII détaille les concentrations obtenues pour les marqueurs Tau totale (tTau), Tau phosphorylée en position 181 (pTau) et le peptide amyloïde β 1-42 (Aβ 1-42) :

	Patients psychiatriques	**DLFT-Tau**	**DLFT-TDP43 certain**	**DLFT-TDP43 probable**
Tau totale - tTau (ng/L)				
n =	20	19	24	41
Minimum	64	84	173	158
25ème percentile	150	169	261	216
Médiane	**204**	**229**	**340**	**259**
75ème percentile	249	318	449	323
Maximum	294	465	781	491
Test de Kruskal-Wallis	**Significatif (p = 0.000055)**			
Tau phosphorylée en position 181 - pTau (ng/L)				
n =	20	19	24	41
Minimum	20	14	29	26
25ème percentile	32	32	35	35
Médiane	**38**	**40**	**40**	**38**
75ème percentile	46	52	50	47
Maximum	49	71	67	65
Test de Kruskal-Wallis	**Non significatif (p = 0.534673)**			
Peptide amyloïde β 1-42 - Aβ 1-42 (ng/L)				
n =	20	19	24	11
Minimum	434	124	366	428
25ème percentile	788	569	748	860
Médiane	**1010**	**908**	**988**	**1119**
75ème percentile	1158	1156	1118	1236
Maximum	1357	2058	1412	1270
Test de Kruskal-Wallis	**Non significatif (p = 0.582115)**			

Tableau XVIII : Concentrations obtenues pour les marqueurs tTau, pTau et Aβ 1-42

La figure 40 présente la distribution du marqueur Tau totale au sein des 4 sous-groupes, ainsi que les différences statistiquement significatives mises en évidence entre ces derniers.

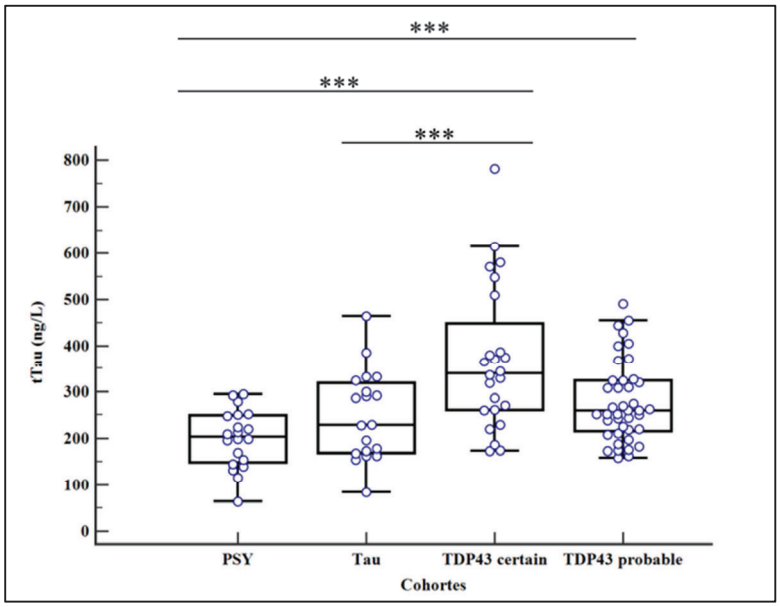


Figure 40 : Distribution de la protéine Tau totale (tTau) dans les 4 sous-groupes constitués (*** : $p < 0.01$)

La concentration de la protéine Tau totale observée dans les sous-groupes de patients avec un diagnostic de DLFT-TDP43 certain ou probable était significativement différente de la concentration observée dans la population psychiatrique. Par ailleurs, l'augmentation de la protéine Tau totale dans le sous-groupe DLFT-TDP43 certaine était supérieure à celle observée pour les prélèvements des patients DLFT-Tau.

Ces résultats sont comparés à ceux obtenus dans la littérature. Les études de Borroni *et al.* (Borroni, Benussi et al. 2015) et Goossens *et al.* (Goossens, Bjerke et al. 2018) ont décrit les résultats obtenus pour les marqueurs de la maladie d'Alzheimer dans des cohortes de patients DLFT, selon une constitution des cohortes similaire à celle que nous avons appliquée. Par ailleurs, ces 2 études ont utilisé des kits de dosages de ces marqueurs identiques aux nôtres, permettant une comparaison directe des résultats observés. L'étude de Borroni *et al.* a montré une augmentation significative de la protéine Tau totale dans une cohorte de patients DLFT-TDP43 avec un diagnostic moléculaire certain (concentration médiane de 363 ng/L) par rapport à une cohorte de patients DLFT-Tau (diagnostic certain ou probable) et à une cohorte de contrôles (médianes respectives à 243 et 222 ng/L). La protéine Tau phosphorylée

et le peptide amyloïde β 1-42 n'étaient pas significativement différents entre ces cohortes. L'étude de Goossens et al. incluait des patients avec un diagnostic certain de DLFT après examen neuropathologique. La concentration médiane en Tau dans la population TDP43 certaine était de 330 ng/L (donc comparable à notre concentration médiane) mais ne déterminait pas de différence par rapport à la population DLFT-Tau (médiane à 331 ng/L). Cette étude montrait par ailleurs une augmentation de la protéine Tau totale significativement supérieure dans la cohorte *GRN* + (n = 9) par rapport à la cohorte *C9ORF72* + (n = 19). Nous observons la même tendance pour nos patients diagnostiqués sur le plan moléculaire malgré une absence de significativité statistique (p = 0.07), probablement explicable par des effectifs plus faibles dans notre étude (6 patients *GRN* + et 16 patients *C9ORF72* +).

L'étude de Vijverberg *et al.* s'intéressait plus particulièrement aux biomarqueurs du LCS permettant de distinguer une population de patients DLFT probable ou certaine (n = 22) d'une population de patients atteints de pathologies psychiatriques (n = 25). Cette étude montrait également une augmentation significative de la protéine Tau totale dans la première population (p = 0.02), et une absence de différence significative entre les 2 populations avec les marqueurs pTau et Aβ 1-42 (respectivement p = 0.24 et p = 0.29) (Vijverberg, Dols et al. 2017). Dans une étude réalisée en 2016 sur une population de patients avec un diagnostic de pathologie psychiatrique (n = 69), Paquet *et al.* avaient mis en évidence une proportion de 69.6 % de patients psychiatriques présentant un bilan des marqueurs Alzheimer normal ou intermédiaire (Paquet, Magnin et al. 2016). Dans notre cohorte, 80% des patients avec un diagnostic psychiatrique (n = 20) présentaient un bilan normal ou intermédiaire avec une diminution isolée du peptide Aβ 1-42 < 700 ng/L).

2.2 Les marqueurs de la maladie d'Alzheimer en combinaison

Les performances diagnostiques des marqueurs Alzheimer ont également été analysées en les combinant 2 à 2, puis comparées aux données de la littérature. La première combinaison étudiée est le ratio tTau / Aβ 1-42 : ce ratio avait été particulièrement étudié dans le diagnostic différentiel entre maladie d'Alzheimer et DLFT (Irwin, Trojanowski et al. 2013). En effet, les bonnes performances diagnostiques de ce ratio résidaient dans l'observation fréquente d'une augmentation (modérée) de la protéine Tau associée à une diminution du peptide amyloïde β

1-42 dans la maladie d'Alzheimer (Blennow 2004). La seconde combinaison de marqueurs analysée était le ratio pTau / tTau. Le tableau XIX décrit les valeurs obtenues pour ces deux combinaisons au sein des 4 sous-groupes.

	Patients psychiatriques	DLFT-Tau	DLFT-TDP43 certain	DLFT-TDP43 probable
Ratio tTau / Aβ 1-42				
n =	20	19	24	11
Minimum	0.101	0.146	0.189	0.141
25ème percentile	0.149	0.196	0.278	0.187
Médiane	**0.195**	**0.287**	**0.361**	**0.221**
75ème percentile	0.257	0.367	0.482	0.289
Maximum	0.641	0.677	1.030	0.586
Test de Kruskal-Wallis	**Significatif (p = 0.000248)**			
Ratio pTau / tTau				
n =	20	19	24	41
Minimum	0.148	0.104	0.0451	0.0725
25ème percentile	0.167	0.153	0.0924	0.134
Médiane	**0.193**	**0.167**	**0.131**	**0.147**
75ème percentile	0.217	0.179	0.159	0.166
Maximum	0.313	0.221	0.185	0.218
Test de Kruskal-Wallis	**Significatif (p < 0.000001)**			

Tableau XIX : Résultats obtenus pour les combinaisons de marqueurs Alzheimer

L'utilisation des combinaisons de marqueurs tTau / Aβ 1-42 ainsi que pTau / tTau permettait de mettre en évidence des différences significatives entre sous-groupes.

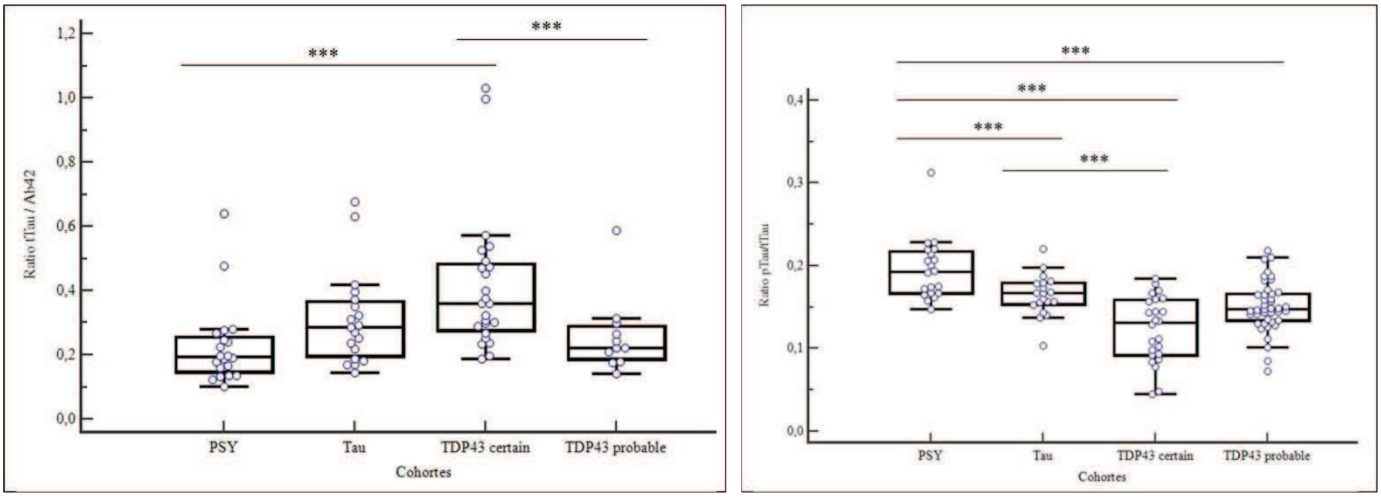


Figure 41 : Distribution du ratio tTau/ Aβ 1-42 (à gauche) et du ratio pTau / tTau (à droite) dans les 4 sous-groupes constitués (*** : p < 0.01)

Le ratio tTau / Aβ 1-42 discriminait le sous-groupe DLFT-TDP43 certaine du sous-groupe psychiatrique (non-TNC). Ce ratio ne discriminait pas le sous-groupe DLFT-TDP43 probable de la cohorte psychiatrique, contrairement au marqueur isolé Tau totale. De la même manière, les patients avec un diagnostic de DLFT-TDP43 certaine n'étaient plus discriminés de la cohorte DLFT-Tau (figure 41). De manière surprenante, il existait une différence statistiquement significative entre les sous-groupes de DLFT-TDP43 certaine et probable. Ce résultat peut être expliqué en partie par le fait que les dosages du peptide amyloïde Aβ 1-42 n'ont été réalisés que pour les patients présentant un variant sémantique dans la cohorte DLFT-TDP43 probable (n =11), constituant un biais dans l'étude de ce ratio. De plus, ces patients ont été sélectionnés dans notre cohorte car ils présentaient un bilan biologique négatif pour les marqueurs Alzheimer, autrement dit une concentration normale en peptide amyloïde Aβ 1-42 potentiellement à l'origine d'une diminution artéfactuelle du ratio tTau / Aβ 1-42. En 2002, dans l'étude de Riemenschneider *et al.*, le ratio tTau / Aβ 1-42 présentait une sensibilité de 90 % et une spécificité de 77 % pour discriminer 34 patients atteints de variant comportemental de 40 patients contrôles souffrant de lombalgie (Riemenschneider, Wagenpfeil et al. 2002). Dans notre étude, les performances diagnostiques de ce ratio discriminaient la population DLFT-TDP43 certaine des patients psychiatriques avec une sensibilité de 75 % et une spécificité de 90 %. Cette comparaison suppose néanmoins que les patients atteints de pathologie psychiatrique présentent des concentrations de marqueurs équivalentes à celles de la population contrôle de Riemenschneider *et al.* (lombalgie).

Le ratio pTau / tTau permettait une discrimination statistiquement significative du sous-groupe non-TNC (population psychiatrique) par rapport aux 3 sous-groupes de patients atteints de DLFT, tous phénotypes cliniques et/ou protéinopathies théoriques confondus. Par ailleurs, ce ratio permettait également de distinguer le sous-groupe de patients DLFT-TDP43 certaine de la cohorte DLFT-Tau (figure 41). Ces résultats avaient été mis en évidence dans l'étude de Hu *et al.* en 2013. Malgré une technologie différente de celle que nous avons employée pour le dosage des marqueurs, cette étude montrait une diminution du ratio pTau / tTau dans la cohorte DLFT-TDP43 (n = 33) supérieure à celle des cohortes DLFT-Tau (n = 20) et des contrôles sains (n = 13) (Hu, Watts et al. 2013). Dans l'étude de Borroni *et al.* décrite précédemment, un cut-off déterminé à 0.136, en utilisant les mêmes kits réactifs que dans notre étude, permettait de discriminer la cohorte DLFT-TDP43 de la cohorte DLFT-Tau avec une sensibilité et une spécificité de 63.6 % et 83.3 % respectivement (Borroni, Benussi

et al. 2015). Nos résultats sont similaires à ceux de cette étude : un cut-off déterminé à 0.134 permettait de discriminer le sous-groupe DLFT-TDP43 certaine du sous-groupe DLFT-Tau avec une sensibilité et une spécificité de 58.3 % et 94.7 % respectivement. L'étude de Goossens *et al.* montrait par ailleurs une diminution significativement supérieure du ratio pTau / tTau dans la cohorte *GRN* + en comparaison de la cohorte *C9ORF72* + (Goossens, Bjerke et al. 2018). Cette différence était aussi observée dans nos populations de patients avec un diagnostic moléculaire confirmé ($p = 0.03$). Finalement, l'étude de Vijverberg *et al.* proposait un seuil du ratio pTau / tTau à 0.15 pour discriminer les patients DLFT des patients psychiatriques avec une sensibilité et une spécificité de 91 % et 72 % respectivement (Vijverberg, Dols et al. 2017). Dans notre étude, la sensibilité et la spécificité du ratio pTau / tTau étaient respectivement de 67.9 % et de 90 % (avec un seuil déterminé à 0.161) pour discriminer l'ensemble des patients DLFT (TDP43 certaine, TDP43 probable et Tau) des patients psychiatriques.

Le mécanisme pathologique aboutissant à une réduction du ratio pTau / tTau chez les patients présentant une pathologie TDP43 est actuellement inconnu. Néanmoins, il pourrait être expliqué en partie par des lésions neuronales plus importantes chez ces patients, entraînant alors une augmentation de la concentration en protéine Tau totale (Borroni, Benussi et al. 2018). La mise en évidence d'une lyse neuronale majeure, entraînant une augmentation très forte de la protéine Tau totale, était déjà étudiée dans le diagnostic de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Cette pathologie n'étant pas associée à une hyperphosphorylation de la protéine Tau, un ratio pTau / tTau effondré était donc très en faveur de cette pathologie (Riemenschneider, Wagenpfeil et al. 2003). La diminution du ratio est cependant nettement supérieure à celle rencontrée dans notre étude : en 2014, Skillbäck *et al.* mettaient en évidence un ratio pTau / tTau médian de 0.009 (ratio tTau/pTau de 101) dans une cohorte de 93 patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob contre un ratio pTau / tTau médian de 0.137 (ratio Tau/pTau de 7.3) dans une cohorte de 9672 patients non atteints de la maladie (Skillback, Rosen et al. 2014).

2.3 Les neurofilaments

Le tableau XX et la figure 42 détaillent les concentrations des chaînes légères des neurofilaments (*NfL*) obtenues pour nos 4 sous-groupes de patients ainsi que les variations observées entre cohortes de patients.

	Patients psychiatriques	DLFT-Tau	DLFT-TDP43 certain	DLFT-TDP43 probable
Neurofilaments - NfL (pg/mL)				
n =	20	17	21	41
Minimum	291	1395	1174	998
25ème percentile	1021	2150	3888	3825
Médiane	**1223**	**3078**	**5642**	**6167**
75ème percentile	1589	4232	11632	15331
Maximum	2178	28625	25226	40455
Test de Kruskal-Wallis	**Significatif (p < 0.000001)**			

Tableau XX : Concentrations obtenues pour les neurofilaments (NfL)

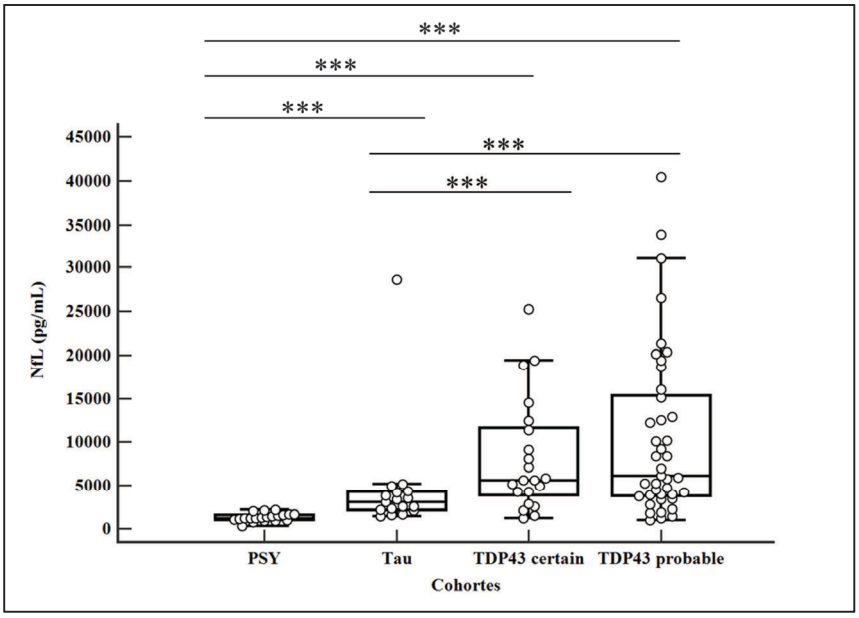


Figure 42 : Distribution des neurofilaments (NfL) dans les 4 sous-groupes constitués (*** : p < 0.01)

Les neurofilaments présentent des performances diagnostiques très intéressantes. En effet, ce marqueur était le premier à discriminer les patients DLFT-Tau des patients DLFT-TDP43, que le diagnostic soit certain ou probable. Pour rappel, la protéine Tau totale et le ratio pTau/tTau permettaient de discriminer seulement les patients DLFT-Tau des patients

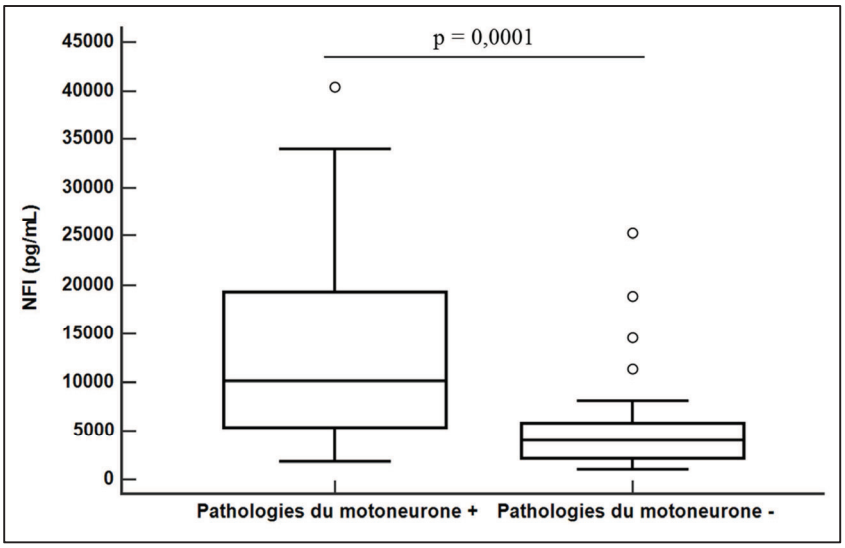
DLFT-TDP43 avec un diagnostic certain. L'étude de Goossens *et al.* décrivait également une augmentation des neurofilaments chez les patients atteints de DLFT (valeur médiane à 3967 pg/mL) par rapport aux patients atteints de maladie d'Alzheimer (médiane à 1597 pg/mL) ou par rapport aux contrôles (médiane à 1136 pg/mL). Cependant, les variations au sein de leur groupe DLFT était statistiquement différentes uniquement entre les patients DLFT-Tau et les patients DLFT *GRN* + (Goossens, Bjerke et al. 2018).

Les neurofilaments permettaient également une discrimination statistiquement significative de la population psychiatrique par rapport aux 3 cohortes de patients atteints de DLFT, tous phénotypes cliniques et/ou protéiques confondus, de manière similaire au ratio pTau / tTau. L'étude de Vijverberg *et al.* décrivait une valeur seuil à 1063 pg/mL pour discriminer les patients DLFT des patients psychiatriques avec une sensibilité et une spécificité de 79 % et 91 % respectivement (Vijverberg, Dols et al. 2017). Dans notre étude, la sensibilité et la spécificité des neurofilaments étaient respectivement de 83.5 % et de 100 % (avec un seuil déterminé à 2178 pg/mL) pour discriminer l'ensemble des patients DLFT (TDP43 certaine, TDP43 probable et Tau) des patients psychiatriques. L'efficacité des neurofilaments était d'ailleurs supérieure à celle du ratio pTau / tTau : la différence des aires sous la courbe était statistiquement différente entre les 2 marqueurs ($p = 0.0085$).

Dans un travail préliminaire présenté sous forme de communication affichée (et à la fin du manuscrit), nous avons pu présenter les performances diagnostiques de l'association des neurofilaments à la détermination des marqueurs de la maladie d'Alzheimer pour discriminer notre cohorte de patients psychiatriques de la cohorte de patients présentant une DLFT certaine (Fourier, Formaglio et al. 2018). Dans ce travail, nous avions comparé une approche globale, où le dosage des neurofilaments était réalisé et interprété pour tous les patients, à une approche séquentielle où le dosage des neurofilaments était réalisé après interprétation du bilan Alzheimer et de l'analyse de la protéine Tau totale. Ce travail mettait en évidence une amélioration des performances diagnostiques pour discriminer nos 2 cohortes lors de l'utilisation de l'approche séquentielle : réalisation des marqueurs Alzheimer puis dosage des neurofilaments. Par ailleurs, cette approche permettait également de sélectionner les patients pour lesquels le dosage des neurofilaments était requis, limitant alors le coût des analyses à réaliser.

Le dosage des neurofilaments ne présentait aucune différence significative dans notre étude entre les sous-groupes DLFT-TDP43 certaine et DLFT-TDP43 probable (p = 0.587). Néanmoins, il existait une certaine variabilité dans les résultats de ce dosage au sein de ces deux cohortes. Par ailleurs, plusieurs études se sont intéressées à la valeur diagnostique et pronostique des neurofilaments dans la SLA notamment (Lu, Macdonald-Wallis et al. 2015, Rossi, Volanti et al. 2018). Deux études ont particulièrement attiré notre attention. La première étude, de Gaiani *et al.*, mettait en évidence une augmentation des neurofilaments dans le LCS de patients atteints de SLA supérieure à celle des patients atteints de DLFT, sans précision sur la nature de cette cohorte (Gaiani, Martinelli et al. 2017). La seconde étude, réalisée par Pijnenburg *et al.*, faisait état d'une augmentation accrue des neurofilaments dans le LCS en cas d'association DLFT-TDP43 et SLA en comparaison de DLFT-TDP43 isolées (Pijnenburg, Verwey et al. 2015).

Pour évaluer l'impact des troubles moteurs sur la concentration en NFl avec les données dont nous disposions, nous avons donc remanié notre cohorte DLFT-TDP43 certaine (diagnostic moléculaire et/ou neuropathologique établi) et notre cohorte DLFT-TDP43 probable (comprenant des patients atteints de SLA ou de démence sémantique) en nous focalisant sur une approche plus clinique, à savoir la présence d'une pathologie du motoneurone associée ou non aux troubles cognitifs. Dans les 2 nouvelles cohortes constituées, on regroupait d'une part les patients avec pathologie du motoneurone plus ou moins associée à des troubles cognitifs (SLA et DLFT-SLA, n = 35) et d'autre part les patients présentant des troubles cognitifs sans atteinte motrice (DLFT pure ou variant sémantique, n = 27).



<u>Figure 43</u> : Distribution des NfL chez les patients DLFT-TDP43 présentant ou non une pathologie du motoneurone

Nous retrouvons donc également une différence significative entre patients DLFT-TDP43 présentant une pathologie du motoneurone de ceux présentant un « TNC pur » (p = 0.0001). Un seuil supérieur à 4721 pg/mL permettait de discriminer la première cohorte avec une sensibilité et une spécificité de 85.7 % et 66.7 % respectivement (AUC de 0.798). Ces résultats sont donc concordants avec l'étude de Pijnenburg *et al.* et témoignent des bonnes performances pronostiques de ce marqueur. En effet, les patients avec une SLA associée aux troubles cognitifs présentent des durées d'évolution reportées de la maladie plus faibles que ceux présentant des troubles cognitifs uniquement (Pijnenburg, Verwey et al. 2015).

2.4 La protéine TDP43 totale

Le tableau XXI décrit les concentrations en TDP43 totale obtenues dans le LCS pour les 4 sous-groupes de patients précédemment constitués.

	Patients psychiatriques	DLFT-Tau	DLFT-TDP43 certain	DLFT-TDP43 probable
TDP43 totale (ng/mL)				
n =	20	18	21	41
Minimum	2.7	3.5	2.9	2.6
25ème percentile	3.9	4.8	3.6	4.4
Médiane	**5.2**	**5.4**	**4.2**	**5.9**
75ème percentile	6.3	5.9	5.9	7.9
Maximum	12.4	6.7	9.0	20.8
Test de Kruskal-Wallis	**Non significatif (p = 0.043759)**			

Tableau XXI : Concentrations obtenues pour la protéine TDP43 totale

Au seuil retenu pour notre étude (p = 0.01), le test de Kruskal-Wallis ne montrait pas de différence significative entre les différentes cohortes. Ces résultats décevants ont été confirmés en regroupant les patients avec la présence certaine ou probable d'agrégats TDP43 (n = 62) et les patients ne présentant pas *a priori* d'agrégats TDP43, à savoir les DLFT-Tau et les patients psychiatriques (n = 38) : aucune différence n'était observée (figure 44).

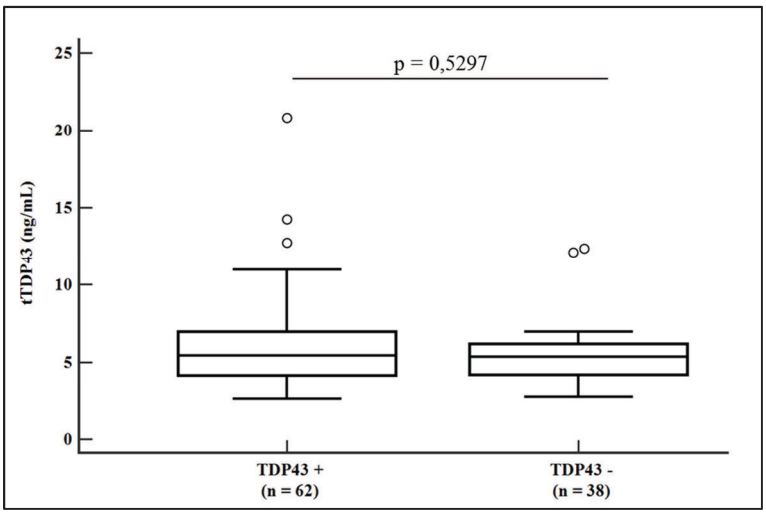
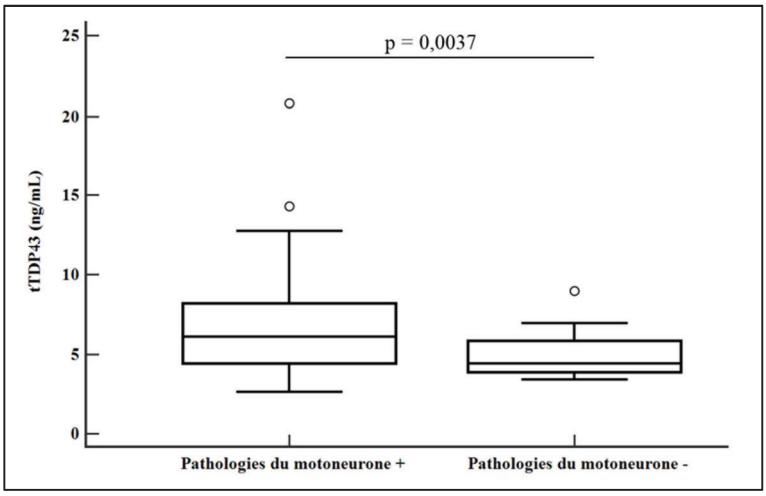


Figure 44 : Distribution de la protéine TDP43 totale dans des cohortes de patients avec présence ou absence d'agrégats cérébraux TDP43

Ces résultats pouvaient être expliqués par le fait que la cohorte DLFT-TDP43 certaine présentait la plus faible médiane (4.2 ng/mL) alors que la cohorte DLFT-TDP43 probable présentait la médiane la plus haute (5.9 ng/mL) : la médiane obtenue dans la nouvelle cohorte DLFT-TDP43 probable ou certaine était alors de 5.4 ng/mL. La médiane obtenue dans la cohorte DLFT-Tau et patients psychiatriques était également de 5.4 ng/mL. En 2016, Junttila

et al. avaient comparé les résultats de la protéine TDP43 totale dans le LCS entre une cohorte de 20 patients DLFT porteurs d'une expansion pathologique sur le gène *C9ORF72* (moyenne de 2.9 ng/mL) et une cohorte de 49 patients DLFT sans expansion *C9ORF72* (moyenne de 3.0 ng/mL) : aucune différence n'avait été observée entre ces 2 populations (p = 0.786) (Junttila, Kuvaja et al. 2016).

La protéine TDP43 a surtout été étudiée comme marqueur candidat du diagnostic de la SLA. En 2009, Kasai *et al.* avaient étudié les performances diagnostiques de la concentration de la protéine TDP43 totale pour discriminer une population de 30 patients SLA d'une population de 29 patients appariés en âge comprenant des contrôles sains et des patients souffrant de pathologies neurologiques non dégénératives. Les patients SLA présentaient une augmentation significative ($p < 0.05$) de la protéine TDP43 totale (Kasai, Tokuda et al. 2009). Nous avons alors étudié les performances de la protéine TDP43 totale pour discriminer les patients présentant une pathologie du motoneurone de ceux qui n'en présentaient pas. Nous avons donc reformé les deux cohortes constituées pour l'étude des neurofilaments, à savoir une cohorte de patients avec pathologie du motoneurone plus ou moins associée à des troubles cognitifs (SLA et DLFT-SLA, n = 35) et d'autre part une cohorte de patients présentant des troubles cognitifs sans atteinte motrice (DLFT pure ou variant sémantique, n = 27).



<u>Figure 45</u> : Distribution de la protéine TDP43 totale chez les patients DLFT-TDP43 présentant ou non une pathologie du motoneurone

Nous retrouvons une différence significative pour la concentration en protéine TDP43 totale entre patients présentant une pathologie du motoneurone et ceux présentant des troubles cognitifs seuls ($p = 0.0037$). Pour une valeur seuil fixée à 6.4 ng/mL, nous observons une sensibilité plutôt faible de 47.1 % associée à une très bonne spécificité de 92.9 % : ces performances sont très proches de celles de Noto *et al*. En effet, dans l'étude de Noto *et al.* publiée en 2011, une augmentation de la protéine TDP43 totale permettait de discriminer 27 patients SLA d'une cohorte de 50 patients avec des pathologies inflammatoires ou neurodégénératives avec une sensibilité et une spécificité respectives de 59.3 % et 96 % (Noto, Shibuya et al. 2011). De plus, une étude de Hosokawa *et al.* en 2014 déterminaient une sensibilité et une spécificité de 71.4 % et de 84.6 % respectivement pour distinguer une cohorte de 13 patients SLA d'une cohorte de 7 patients souffrant d'un syndrome de Guillain-Barré (Hosokawa, Arai et al. 2014). Nous ne pouvons pas comparer les valeurs brutes obtenues dans ces études car les kits ELISA utilisés étaient préparés selon des protocoles propres à chaque équipe. En utilisant un kit de dosage de la protéine TDP43 identique au nôtre, Junttila *et al.* retrouvaient une augmentation de la concentration en protéine TDP43 totale chez les patients SLA par rapport aux patients DLFT ($p = 0.001$), quel que soit le statut génétique pour la mutation *C9ORF72* (Junttila, Kuvaja et al. 2016).

Le dosage de la protéine TDP43 dans le LCS semble donc être potentiellement intéressant pour étayer un diagnostic de SLA. Par ailleurs, les performances diagnostiques de cette dernière sont équivalentes à celles des neurofilaments à partir de nos cohortes de patients : il n'existe pas de différence dans les AUC des 2 marqueurs. Cependant, ce dosage quantitatif ne permet pas d'identifier des patients atteints de DLFT-TDP43 en comparaison de patients présentant une DLFT-Tau ou une pathologie psychiatrique. Contrairement à notre hypothèse, la constitution de cohortes de patients basée sur un diagnostic « protéique » ne permet pas de mettre en évidence de bonnes performances diagnostiques pour la protéine TDP43 totale dans le LCS. Nos différents sous-groupes de patients nous semblent pourtant bien constitués, puisque nous avons pu obtenir des résultats comparables aux données de la littérature pour les autres marqueurs étudiés dans le LCS.

Les différences observées dans les performances diagnostiques de la protéine TDP43 entre SLA et DLFT pure pourraient être expliquées par la localisation des agrégats de protéine TDP43 : ces derniers sont préférentiellement localisés dans les motoneurones et le cortex

moteur pour la SLA (Brettschneider, Del Tredici et al. 2013), alors que le premier stade de propagation des agrégats de protéine TDP43 dans les DLFT est situé dans le néocortex pré-frontal (Brettschneider, Del Tredici et al. 2014). La localisation des agrégats TDP43 dans la SLA, potentiellement plus proche du lieu de prélèvement de LCS, pourrait donc expliquer cette augmentation de concentration. Une étude de Kuiperij *et al.* montrait que les concentrations de protéine TDP43 totale obtenues à partir d'une ponction ventriculaire étaient supérieures à celles d'un prélèvement au niveau lombaire. De plus, cette étude incluait des patients avec un diagnostic de DLFT TDP43 ou Tau certaines. Une association des protéines TDP43 et Tau prélevées dans une ponction ventriculaire permettaient de différencier ces deux populations avec une sensibilité de 93 % et une spécificité de 64 % (Kuiperij, Versleijen et al. 2017).

Une seconde explication des différences observées entre les études est l'absence de standardisation des kits ELISA utilisés pour le dosage de la protéine TDP43 totale. A l'exception de l'étude de Junttila *et al.* qui utilisait le même kit ELISA que dans notre étude, toutes les autres équipes ont utilisé des kits ELISA « maison », avec des combinaisons d'anticorps de capture et de détection variables. Une revue de la littérature réalisée par Goossens *et al.* en 2015 a détaillé les méthodologies utilisées pour le dosage de la protéine TDP43 et notamment les anticorps utilisés (Goossens, Vanmechelen et al. 2015). Parmi ces différents anticorps, certains semblent non totalement spécifiques de la protéine TDP43 totale (Feneberg, Gray et al. 2018). Cette dernière constatation nous oriente vers la nécessité de recourir à des technologies permettant la détermination des profils qualitatifs de la protéine TDP43. Ce travail a été initié et est présenté dans la partie III de ce travail de thèse.

PARTIE III : DETERMINATION DES PROFILS QUALITATIFS DE LA PROTEINE TDP-43 DANS DIFFERENTES MATRICES BIOLOGIQUES

La première partie de ce travail de thèse a consisté en une détermination de patients dont le diagnostic clinique et moléculaire de DLFT-TDP43 était certain. L'étude de différents marqueurs du LCS, réalisée dans la deuxième partie de ce travail, a mis en évidence des différences significatives entre cette population de patients en comparaison à d'autres cohortes homogènes sur le plan clinique et/ou protéique. Les résultats du dosage par technique ELISA de la protéine TDP43 se sont montrés plutôt décevants sur le plan diagnostique. Il s'est avéré que la matrice biologique d'intérêt ainsi que le choix des anticorps utilisés pouvaient constituer deux raisons associées à ses faibles performances diagnostiques.

L'objectif principal de cette dernière partie du travail expérimental était de pouvoir développer des méthodes d'analyse des profils qualitatifs de la protéine TDP43. Deux technologies ont été utilisées dans ce but : le Western Blot d'une part et la technologie Simple Western d'autre part, cette dernière méthode associant une détermination automatisée et simultanée des profils protéiques à la semi-quantification des protéines observées. Cette étude a débuté par le développement de la technique Simple Western à l'aide d'une protéine TDP43 recombinante et de protéine TDP43 endogène. Les 2 techniques Simple Western et Western Blot ont alors été comparées à partir d'échantillons cérébraux dont le diagnostic neuropathologique avait été préalablement réalisé. Finalement, les profils protéiques de la protéine TDP43 ont été analysés dans des matrices biologiques accessibles du vivant du patient : le LCS et les différentes fractions du sang circulant.

1. Matériels et méthodes

1.1 Sélection et préparation des matrices biologiques d'intérêt

1.1.1 Protéine TDP43 recombinante

La protéine TDP43 recombinante Ag1231 (ProteinTech®) est constituée des acides aminés 1 à 260 de la protéine TDP43 totale et inclut un groupement Gluthation-S-transférase (*GST tag*) en position N-terminale. Son poids moléculaire théorique est de 56 kDa. Différentes

concentrations en protéine TDP43 recombinante ont été analysées sur l'automate Peggy Sue en diluant la solution mère de protéine recombinante dans un diluant approprié.

1.1.2 Cultures cellulaires et TDP43 endogène

Les cellules *Human embryonic kidney* HEK 293T (Généthon) d'origine rénale et les cellules SH-SY5Y (Sigma Aldrich®) issues d'un neuroblastome étaient cultivées par le Docteur Pascal Leblanc (Equipe Interactions Neurone-Muscle, Institut Neuromyogène, CNRS UMR5310 - INSERM U1217, Université de Lyon). Les cellules HEK 293T étaient cultivées dans un milieu contenant du *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) Glutamax supplémenté avec 10 % de *Fetal Bovine Serum* (FBS) et en pénicilline/streptomycine (Invitrogen®). La culture des cellules SH-SY5Y était réalisée dans un milieu DMEM-F12 Glutamax supplémenté avec 10 % de FBS, une solution d'acides aminés non essentiels et en pénicilline/streptomycine (Invitrogen®). Les cellules étaient alors suspendues dans du *Phosphate Buffer Saline* (PBS) et centrifugées à +4°C. Les culots cellulaires étaient alors suspendus et lysés dans du tampon de lyse Laemmli (6% Tris HCl pH 6.8, 10% β-mercaptoéthanol, 4% SDS, glycérol et bleu de bromophénol). Après sonication à +4°C, les lysats cellulaires étaient congelés jusqu'à la réalisation des analyses.

1.1.3 Prélèvements cérébraux

Nous avons précédemment détaillé notre collaboration avec le laboratoire d'Anatomopathologie du Centre de Biologie Est des Hospices Civils de Lyon et le Centre de Ressources Biologiques de Lyon (Docteur David Meyronet et Docteur Nathalie Streichenberger). Dans le cadre de cette collaboration, nous avons pu obtenir des prélèvements congelés de cortex frontal pour 4 patients. Deux patients étaient atteints de DLFT et présentaient des agrégats TDP43. Les deux autres patients présentaient des agrégats de protéine Tau : un patient présentait un phénotype clinique de PSP et l'autre présentait un phénotype clinique de variant comportemental.

Une extraction séquentielle a été réalisée afin d'étudier les différentes espèces de protéine TDP43 présentes dans ces échantillons cérébraux, d'après un protocole

précédemment décrit par Sampathu *et al.* (Sampathu, Neumann et al. 2006). Le protocole complet et la composition exacte des tampons sont détaillés dans l'annexe 5 à la fin de ce travail. Des homogénats de cortex frontal à 5 mL/g (soit 20 %) ont été préparés dans du *Low Salt Buffer* (LS). L'extraction séquentielle consistait en une ultracentrifugation des homogénats. Les culots étaient repris dans des tampons de plus en plus astringents, à savoir les tampons Triton-X (TX), Triton-X + sucrose (TX+S), sarkosyl (SARK) et finalement sodium dodecyl sulfate (SDS) ou urée (Urée). Tous les surnageants étaient conservés et s'appelaient respectivement "LS", "TX", "TX + S", "SARK", "SDS" et "Urée". Les culots restants à la fin du protocole étaient respectivement appelés "SDSc" et "Urée c".

1.1.4 Prélèvements de LCS

L'analyse des profils qualitatifs de la protéine TDP43 a été réalisée sur certains prélèvements de LCS de la cohorte de cas certains TDP43 (tableau XV). Ces profils ont pu être comparés à ceux de LCS de patients TDP43 négatifs (patients PSP de la cohorte DLFT-Tau présentée dans le chapitre 2).

Différentes préparations d'échantillons ont été effectuées pour réaliser cette analyse qualitative :

- échantillon natif : l'échantillon était analysé sans préparation supplémentaire
- échantillon précipité à l'acétone : un volume variable de LCS (indiqué sur les figures correspondantes) était prélevé et dilué dans de l'acétone (rapport de dilution : 1 volume d'échantillon + 3 volumes d'acétone). Le mélange était conservé une nuit à - 20°C, vortexé puis centrifugé à 10000 g pendant 15 minutes. Le surnageant était éliminé et le culot protéique était repris par du tampon Laemmli (50 µL)
- échantillon concentré par ultrafiltration : 500 µL de LCS étaient déposés dans un concentrateur Vivaspin® (GE Healthcare) dont la membrane en polyéthersulfone permettait de retenir les protéines de masse supérieure à 5000 Da. Après une centrifugation à 10000 g pendant 15 minutes, l'échantillon concentré était récupéré dans la chambre haute du concentrateur
- échantillon déplété en albumine et immunoglobulines : 75 µL de LCS étaient déposés dans une colonne contenant une résine constituée de protéine A et de bleu de Cibacron

(*Pierce® Albumin/IgG removal kit*, Thermo Scientific®). Après une incubation de 10 minutes à température ambiante suivie d'une centrifugation à 10000 g pendant 1 minute, le filtrat était réappliqué sur la résine, ré-incubé pendant 10 minutes et re-centrifugé. Le filtrat de LCS était alors déplété en albumine et en immunoglobulines.

- solution d'albumine à 0.4 g/L : une solution mère de Vialebex® à 40 g/L (LFB Biomedicaments®) était diluée dans du NaCl (dilution au 1/100ème)
- solution d'immunoglobulines à 0.25 g/L : une solution mère de Privigen® à 100 g/L (CSL Behring®) était diluée dans du NaCl (dilution au 1/400ème)

Les différentes préparations étaient alors mélangées à du tampon Laemmli (dilution au ½) ou dans du master mix (dilution 4/5ème) puis dénaturées à 95°C pendant 5 minutes avant analyse par technique Western Blot et/ou Simple Western respectivement.

1.1.5 Prélèvements de sang total

L'étude des profils protéiques de la protéine TDP43 dans les différentes fractions du sang total a débuté à partir de l'analyse d'un patient témoin (prélèvement de 10 mL réalisé sur 2 tubes EDTA).

Les cellules mononucléées du sang ont été obtenues par réalisation d'une centrifugation en gradient de densité. Un tube de sang total a été dilué dans un tampon contenant 2 mmol/L d'EDTA dilué dans du PBS à pH 7.2. Après dépôt de 15 mL de Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich®) dans un eppendorf de 50 mL, le sang total dilué était délicatement déposé à la surface du Ficoll puis le tube était centrifugé à 400 g pendant 30 minutes. La couche supérieure était ensuite aspirée et éliminée. La couche de cellules mononuclées ou PBMC (lymphocytes, monocytes et plaquettes) était ensuite récupéré et placée dans un nouveau tube conique de 50 mL. Après ajout de tampon dans le tube, ce dernier était agité puis centrifugé à 300 g pendant 10 minutes. Après élimination du surnageant, le culot était repris par 50 mL de tampon, centrifugé à 200 g pendant 15 minutes. Le surnageant était éliminé. Finalement, le culot contenant les lymphocytes et monocytes était repris dans du tampon Laemmli, prêt à être analysé.

Le deuxième tube EDTA a été centrifugé à 200 g pendant 15 minutes pour obtenir un plasma riche en plaquettes. Ce dernier était centrifugé à 2000 g pendant 15 minutes : le plasma pauvre en plaquettes obtenu était conservé. Le culot, riche en plaquettes, était repris par 4 mL de tampon 1 à pH 7.35 contenant 50 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl et 2.7 mmol/L d'EDTA. Après une nouvelle centrifugation à 2000 g pendant 15 minutes, le culot lavé était repris par 4 mL de ce même tampon 1. Une numération plaquettaire était alors effectuée sur l'automate XN-2000 (Sysmex®). Après cette numération, le tube était à nouveau centrifugé à 2000 g pendant 15 minutes. Le culot plaquettaire était alors repris dans un volume variable de tampon 2 à pH 7.35 (tampon 1 sans EDTA et Triton X-100 ; ratio 40 : 1) en fonction des résultats de la numération plaquettaire pour obtenir une concentration en plaquettes fixée à 200 G/L. Le mélange était chauffé à 37°C pendant 15 minutes, puis congelé avant analyse (annexe 3).

Cette étude préliminaire a été poursuivie par l'analyse des échantillons plasmatiques et plaquettaires de certains patients pour lesquels un diagnostic de DLFT familiale était suspecté. Lors du diagnostic génétique réalisé pour rechercher les variants sur les gènes *C9ORF72* et *GRN*, un des 2 tubes EDTA reçus au laboratoire était centrifugé et les prélèvements de plasma et de plaquettes étaient préparés et conservés selon le protocole précédemment décrit (annexe 3).

1.2 Détermination des profils qualitatifs

1.2.1 Principe général de la technique Western Blot

Le Western Blot, initialement décrit par Towbin *et al.* en 1979, est une technique largement utilisée permettant l'analyse des protéines (Towbin, Staehelin et al. 1979). Cette méthode repose sur l'utilisation d'anticorps pour identifier des cibles protéiques fixées sur une membrane. La spécificité de la liaison antigène-anticorps permet une identification de la protéine d'intérêt, y compris dans des mélanges complexes. Le principe général de cette technique est détaillé ci-après (Mahmood and Yang 2012).

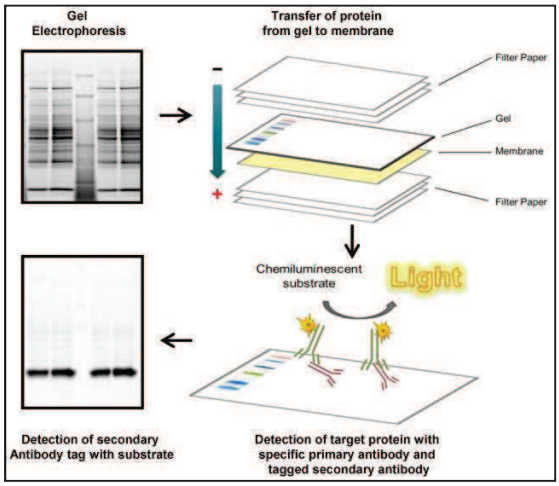
La préparation des échantillons dépend principalement de la nature de la matrice analysée et de la concentration en protéine cible attendue. Toutes les préparations sont alors diluées dans un tampon de migration. Il existe différentes compositions de ces derniers, mais tous contiennent des réactifs communs, initialement proposés par Laemmli (Laemmli 1970). La présence combinée d'agents chimiques comme le β-mercaptoéthanol et le sodium dodécyl sulfate (SDS), qui sont respectivement un réducteur (coupure des ponts disulfure) et un détergent anionique fort, permet de dénaturer les protéines. En parallèle, le SDS charge les protéines négativement, permettant leur séparation par électrophorèse. Les tampons de migration contiennent également du glycérol et du bleu de bromophénol, le premier permettant d'alourdir les préparations d'échantillons pour faciliter leur migration et le deuxième permet une visualisation de cette migration. Une fois mélangés au tampon de migration, les échantillons sont généralement chauffés afin d'assurer une dénaturation thermique, supplémentaire à la dénaturation chimique.

L'électrophorèse se déroule dans un gel d'agarose ou plus fréquemment de polyacrylamide (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis* ou PAGE), dont la concentration varie en fonction de la taille des protéines d'intérêt. Plus la taille des protéines d'intérêt est petite, plus le gel sera concentré et inversement. Après dépôt des échantillons dans les différents puits du gel, un tampon de migration permet d'assurer l'électrophorèse en présence d'un champ électrique : les protéines migrent alors vers l'anode (pôle positif) grâce au SDS et sont séparées selon leur poids moléculaire. Les gels ne permettent pas une bonne détection des protéines par immunodosage : ils sont fragiles et ne maintiennent pas correctement les anticorps de détection. Il est donc nécessaire de transférer les protéines après leur migration sur une membrane de nitrocellulose ou de polyvinylidène fluoride selon un protocole similaire à celui de l'électrophorèse : les protéines chargées négativement vont migrer vers l'anode et s'incorporer à la surface de la membrane. Il existe 2 types de transfert (humide ou semi sec), présentant chacun des avantages et des inconvénients. Une fois l'étape de transfert des protéines sur la membrane effectuée, la procédure d'immunodétection peut commencer.

La première étape de la détection consiste en un blocage de la membrane avec du lait ou de l'albumine, permettant de limiter les interactions non spécifiques entre l'anticorps et la membrane, diminuant alors le bruit de fond lors de la révélation. L'anticorps primaire, spécifique de la protéine d'intérêt, est donc incubé au contact de la membrane. La membrane

est ensuite rincée plusieurs fois pour éliminer l'excès d'anticorps primaire non lié, et incubée avec l'anticorps secondaire qui se fixe sur l'anticorps primaire utilisé (anticorps anti-espèce). Cet anticorps est généralement couplé à la biotine ou à une enzyme comme la phosphatase alcaline ou peroxydase de raifort (HRP). Finalement, l'ajout d'un substrat (dépendant de l'enzyme ou du composé couplé à l'anticorps secondaire) permettra de réaliser la détection finale de la méthode. Une des détections particulièrement utilisée est la détection *Enhanced Chemiluminescence* (réaction entre le luminol et la HRP liée à l'anticorps) car elle présente une très forte sensibilité analytique. Cependant, des détections colorimétriques, fluorescentes ou par autoradiographie peuvent également être réalisées.

Le Western Blot produit des résultats qualitatifs comme la présence ou non d'une protéine dans un échantillon biologique, la mise en évidence de modifications post-traductionnelles ou encore des variations de poids moléculaire des protéines. Cette technique peut également fournir des résultats semi-quantitatifs avec l'analyse densitométrique des bandes observées sur les films principalement grâce à des imageurs (Taylor, Berkelman et al. 2013). Néanmoins, une étude de 2005 décrivait une variabilité totale de 35 % dans les résultats obtenus avec cette technologie (Koller and Watzig 2005).



<u>Figure 46</u> : Diagramme schématique du Western Blot - Ghosh, Gilda *et al.* 2014

1.2.2 Protocoles Western Blot réalisés

Dans notre étude, la préparation des échantillons variait en fonction de la matrice biologique analysée. Lors de nos essais, nous avons dilué ou au contraire concentré certains échantillons. Des techniques de déplétion de certaines protéines potentiellement interférentes ont également été réalisées (voir section 1.1 Sélection et préparation des matrices biologiques d'intérêt). Les préparations étaient ensuite diluées au demi dans du tampon de migration Laemmli 2X. La composition finale du mélange échantillon / tampon Laemmli après dilution était : échantillon, 0.0625 M de Tris HCl pH 6.8, 5 % de β-mercaptoéthanol, 2 % de SDS, 10 % de glycérol et une très faible fraction de bleu de bromophénol. Les produits étaient alors dénaturés à 95°C pendant 5 min, puis 10 µL du mélange étaient déposés sur des gels en polyacrylamide à 12 % (préparation manuelle ou utilisation de gels NuPAGE 12% Bis-Tris, ThermoFisher®) On intégrait également des marqueurs de poids moléculaire sur chaque gel : un marqueur coloré (*Prestained SDS PAGE standards, low range*, Biorad®) et un marqueur pour la révélation en chimiluminescence (*MagicMark XP Western Protein Standard*, Life Technologies®).

Après l'électrophorèse (1h30 pour le gel préparé manuellement ou 50 minutes pour les gels NuPAGE), le transfert semi-sec était effectué sur une membrane Immobilon-P avec une porosité de 0.45 µm (Millipore®) pendant 35 minutes à 350 mA. La saturation des membranes était effectuée pendant 2 heures sous agitation grâce à du lait écrémé en poudre (5%) reconstitué dans du PBS. Les différents anticorps primaires utilisés, précédemment dilués dans du PBS-Tween 20 0.1 % (PBST), étaient incubés pendant une nuit à + 4°C. Sur le deuxième jour de la manipulation, 3 lavages de 5 minutes dans du PBST étaient réalisés. L'anticorps secondaire HRP était alors dilué dans du PBST en fonction de l'anticorps primaire choisi : l'anticorps anti-lapin *Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins HRP* (Dako®) et l'anticorps anti-souris *Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H + L)* (Jackson Immunoresearch®) étaient dilués au 1/2000ème et au 1/10000ème respectivement. L'incubation des anticorps secondaires durait 30 minutes sous agitation. Après 4 lavages de 5 minutes dans du PBST et 3 lavages de 5 minutes dans du PBS, les membranes étaient mises en contact avec le réactif de révélation *SuperSignal West Dura* (ThermoScientific®). La révélation se déroulait en chambre noire : la membrane était placée au contact d'un film d'exposition *Hyperfilm ECL* (GE Healthcare®) ou Biomax MR-1 (Kodak®) dans une cassette

hermétique selon des temps variables en fonction des échantillons et des anticorps étudiés. La révélation des films était achevée avec l'utilisation des révélateurs et fixateurs GBX (Kodak®).

1.2.3 Principe général de la technique Simple Western

La technologie Simple Western consiste en une automatisation et une miniaturisation de la technique du Western Blot. Différentes plateformes analytiques de la société ProteinSimple® permettent d'utiliser cette technologie. Nos essais étaient réalisés sur l'automate Peggy Sue, ce dernier proposant des immuno-essais permettant une séparation des protéines selon leur taille (technique détaillée dans ce chapitre) ou selon leur charge électrique. Le processus analytique global repose sur deux étapes consécutives : la première consiste en la préparation d'une plaque contenant les échantillons à analyser et les différents réactifs nécessaires à l'essai. La deuxième étape, entièrement automatisée, permet de réaliser l'analyse des protéines depuis l'électrophorèse jusqu'à la révélation par chimiluminescence. Un premier kit de réactifs « migration » contient les réactifs pour préparer l'échantillon, des *ladder* et mix fluorescents, les matrices de *stacking* et séparation ainsi que les tampons de migration. Le second kit de réactifs « détection » contient un anticorps secondaire couplé à la HRP prêt à l'emploi, du luminol et du peroxyde.

- **Préparation de la plaque**

Les échantillons sont préalablement préparés en fonction des différentes matrices biologiques à analyser (voir section 1.1 Sélection et préparation des matrices biologiques d'intérêt). Un *fluorescent master mix* contenant des marqueurs fluorescents et une *ladder* (échelle de poids moléculaires chimiluminescents) sont reconstitués selon les instructions du fournisseur. Le master mix est ajouté à chacun des échantillons selon un ratio 20 % / 80 %. Les échantillons et la *ladder* sont alors dénaturés à 95°C pendant 5 minutes. Les anticorps primaires spécifiques de la protéine d'intérêt sont dilués dans de l'*Antibody Diluent*. Une solution de révélation est également préparée en mélangeant de façon équimolaire du luminol et du peroxyde. Les anticorps secondaires et les deux matrices *stacking* et *separation* sont prêts à l'emploi. Les échantillons et les réactifs sont alors déposés dans une plaque de 384 puits selon

un plan de plaque proposé par le fournisseur (figure 47). La plaque est centrifugée pendant 5 minutes à 1000 g avant d'être placée sur l'automate (Nelson, Guynn et al. 2017).

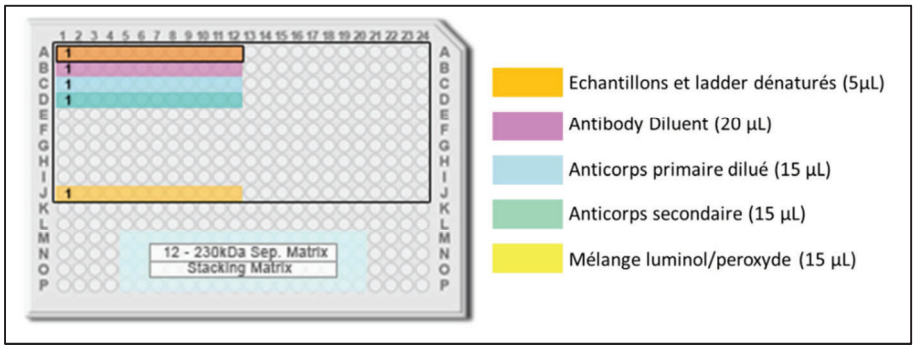


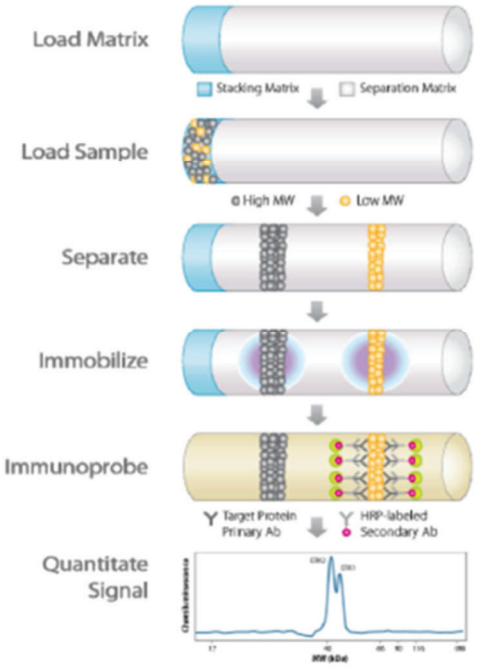
Figure 47 : Exemple de préparation d'une plaque

Cet exemple décrit la préparation d'une plaque pour un cycle d'analyse, à savoir l'étude d'une *ladder* et de 11 échantillons (déposés dans les puits A1 à A12 sur ce plan de plaque). La particularité de cette méthode réside dans le fait que l'analyse s'effectue par la suite dans des capillaires individuels à usage unique. Il est donc possible de varier les dépôts d'échantillons ou d'anticorps au sein d'un même cycle puisque toutes les analyses seront effectuées de manière indépendante. De plus, différents cycles (jusqu'à 8) peuvent être réalisés au sein d'un même essai automatisé, permettant de multiplier le nombre d'échantillons analysés ou au contraire le nombre d'anticorps utilisés pour un même échantillon (en utilisant seulement 5 µL d'échantillon préparé pour l'ensemble des cycles).

- **Analyse automatisée des échantillons**

La plaque est chargée dans l'automate Peggy Sue ainsi que les tampons *Wash*, *Upper Running* et *Lower Running*. L'essai débute alors par le remplissage de chacun des capillaires avec les matrices de stacking et séparation. Les échantillons sont alors aspirés dans les capillaires (un échantillon par capillaire), puis les protéines migrent en fonction de leur poids moléculaire grâce à l'application d'un courant électrique. Les protéines sont ensuite fixées à la surface des capillaires activées par illumination avec un rayonnement ultraviolet. L'immuno-essai débute avec l'incubation de l'anticorps primaire spécifique de la protéine, se poursuit avec des lavages et l'incubation de l'anticorps secondaire couplé à la HRP. Finalement, la révélation

est permise grâce à l'intégration du mélange luminol/peroxyde. Des mesures de luminescence sont alors réalisées selon des temps prédéterminés qui s'étendent de 4 à 512 secondes (Chen, Wakefield et al. 2015).



<u>Figure 48</u> : Principe de l'essai basé sur la taille des protéines - ProteinSimple®

Les résultats sont interprétés grâce au logiciel *Compass for Simple Western*®. Le logiciel permet de visualiser la migration du mix fluorescent inclus dans chaque échantillon pour garantir le bon déroulement de l'électrophorèse. Les analyses de fluorescence des protéines incluses dans ce mix sont réalisées pour « aligner » automatiquement la migration dans chaque capillaire au sein d'un même cycle. Une fois les migrations alignées, la taille des protéines présentes dans chaque capillaire est déterminée par rapport à celles présentes dans la *ladder* incluse dans chaque cycle (figure 49). En plus de leur taille, le logiciel fournit également des données quantitatives sur les protéines détectées, à savoir l'aire et la hauteur de chaque bande mise en évidence.

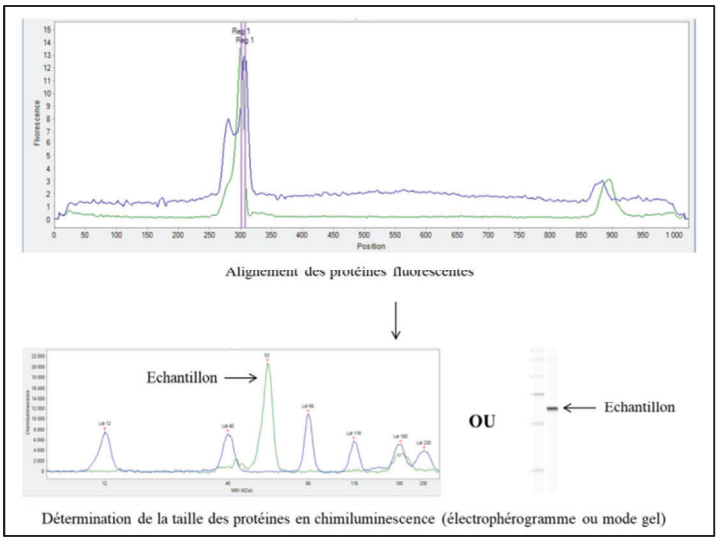


Figure 49 : Détermination de la taille des protéines

1.2.4 Protocoles Simple Western réalisés

Pour nos différents essais, nous avons utilisé les kits ProteinSimple® permettant de déterminer les tailles de protéines entre 12 et 230 kDa. Les anticorps primaires utilisés étaient systématiquement dilués au 1/50ème. Les anticorps secondaires couplés à la HRP, fournis dans le kit et prêts à l'emploi, étaient dirigés contre les espèces lapin ou souris en fonction de l'anticorps primaire choisi. Enfin, sauf mention contraire, les résultats analysés correspondaient au temps de révélation le plus court proposé par l'automate, à savoir 4 secondes d'exposition au mélange luminol/peroxyde. La version du logiciel *Compass for Simple Western* utilisée était la version 3.1.7.

1.2.5 Description des anticorps primaires utilisés pour notre étude

De nombreux anticorps commercialisés sont disponibles afin d'étudier la protéine TDP43. En 2015, l'étude de Goossens *et al.* recensait les anticorps qui avaient permis de mettre en évidence des agrégats de protéine TDP43 dans plusieurs études et/ou qui avaient été testés pour développer des dosages quantitatifs par méthode ELISA (Goossens, Vanmechelen et al. 2015). Les anticorps utilisés dans notre étude étaient déjà commercialisés ou en cours de développement par une société industrielle partenaire Analytik Jena Roboscreen GmbH® (tableau XXII).

Nom de l'anticorps	Société	Espèce	Clonalité	Epitope	Dilution WB
10782-2-AP	ProteinTech®	Lapin	Polyclonal	AA 203-209 et AA N-terminaux	1/2000ème
2E2D3	Abnova®	Souris	Monoclonal	AA 205-222	1/2000ème
2G10	AJ Roboscreen®	Souris	Monoclonal	AA 201-220	1/10000ème
12892-1-AP	ProteinTech®	Lapin	Polyclonal	AA 288-414	1/1000ème
22309-1-AP	ProteinTech®	Lapin	Polyclonal	pS409/410	1/1500ème

Tableau XXII : Description des anticorps primaires utilisés dans notre étude
AA : acides aminés ; WB : Western Blot

La figure 50 décrit la structure de la protéine TDP43 et permet de représenter les interactions potentielles entre la protéine et les différents anticorps testés.

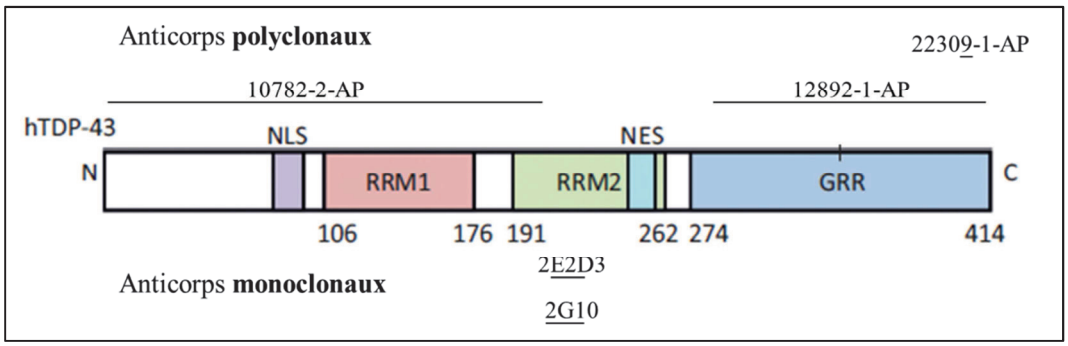


Figure 50 : Structure de la protéine TDP43 et interactions avec les anticorps étudiés, adaptée de Vanden Broeck, Callaerts *et al.* 2014

Les anticorps polyclonaux testés dans notre essai présentaient des épitopes très différents : un épitope situé sur la partie N-terminale de la protéine TDP43 pour l'anticorps 10782-2-AP et un épitope situé sur la partie C-terminale de la protéine pour l'anticorps 12892-1-1AP. L'anticorps 22309-1-AP, dont l'épitope est dirigé contre les sérines phosphorylées de la protéine TDP43 en position 409 et 410 a également été choisi car cette modification post-traductionnelle constitue une caractéristique commune des DLFT-TDP43 (Neumann, Kwong et al. 2009). Les anticorps monoclonaux présentaient des épitopes très proches et étaient dirigés contre une région centrale de la protéine TDP43.

2. Résultats

2.1 Développement de l'essai Simple Western TDP43

Nous avions précédemment pu appréhender la technologie Simple Western et l'utilisation de l'automate Peggy Sue dans une étude comparant les performances diagnostiques de cette technologie au Western Blot pour la mise en évidence de la protéine 14-3-3 dans le LCS pour le diagnostic biologique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale (présentée en fin de manuscrit) et a permis de proposer cette nouvelle technologie en routine diagnostique pour le dépistage de la protéine 14-3-3 au sein du laboratoire (Fourier, Dorey et al. 2018).

Le développement de l'essai Simple Western TDP43 a débuté de la même manière par l'analyse d'une protéine TDP43 recombinante avec 4 anticorps primaires différents : les 3 anticorps polyclonaux 10782-2-AP, 12892-1-AP et 22309-1-AP et un anticorps monoclonal 2E2D3.

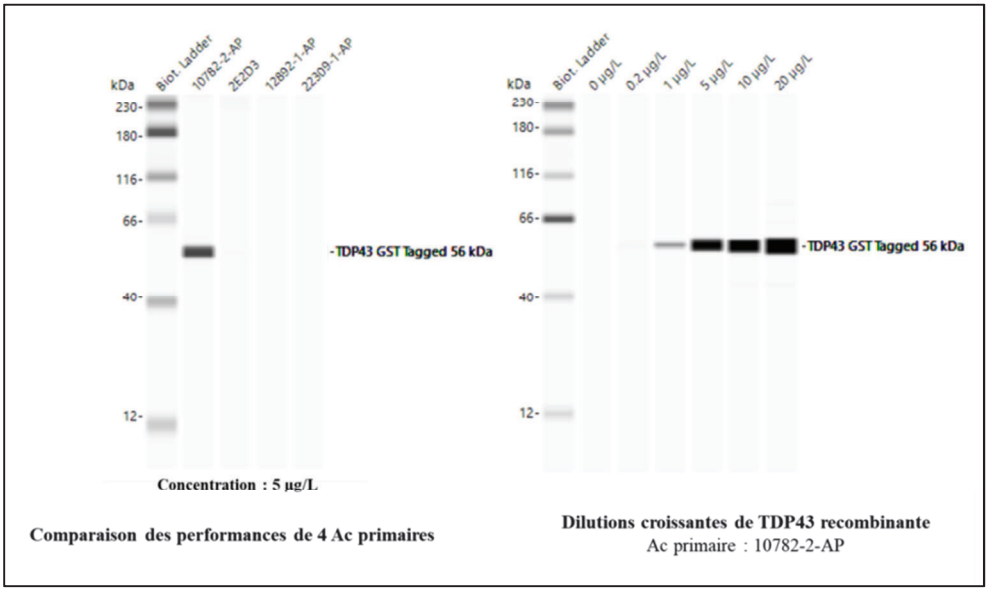


Figure 51 : Profils de la protéine TDP43 recombinante

La comparaison des signaux obtenus par chimiluminescence pour les 4 anticorps détectant la même concentration de protéine TDP43 recombinante (5 µg/L) mettait en évidence une bande de forte intensité à 56 kDa avec l'anticorps 10782-2-AP (figure 51). La taille observée pour la protéine recombinante concordait donc avec sa taille théorique. Un signal très faible à 56 kDa était quantifiable pour l'anticorps 2E2D3 (non visible sur cette figure). Ce dernier était environ 20 fois plus faible que le signal obtenu pour l'anticorps 10782-2-AP. L'anticorps 10782-2-AP était donc beaucoup plus sensible analytiquement que l'anticorps 2E2D3.

Aucun signal n'était détectable pour les anticorps 12892-1-AP et 22309-1-AP. Ces résultats étaient attendus. En effet, la protéine TDP43 recombinante était constituée uniquement des 260 premiers acides aminés de la protéine TDP43 humaine et ne contenait donc pas les acides aminés 288 à 414 (épitope de l'anticorps 12892-1-AP) et les sérines phosphorylées en position 409 et 410 (épitope de l'anticorps 22309-1-AP).

Les concentrations obtenues dans le LCS pour le dosage pondéral de la protéine TDP43 avec le kit ELISA s'étendaient de 2.6 à 20.8 µg/L (tableau XXI). Des concentrations croissantes de protéine TDP43 recombinante (de 0.2 µg/L à 20 µg/L) ont donc été analysées avec l'anticorps présentant la meilleure sensibilité analytique (10782-2-AP). La protéine recombinante était détectable dès la plus petite concentration testée. Les signaux obtenus (exprimés en aire et en hauteur) sont recensés dans le tableau XXIII :

Concentration (µg/L)	Aire	Hauteur
0	100	80
0.2	9047	979
1	48806	4597
5	241549	21022
10	393093	36743
20	644173	50701

<u>Tableau XXIII</u> : Signaux obtenus (aires et hauteurs) pour des concentrations croissantes de protéine TDP43 recombinante - Anticorps 10782-2-AP

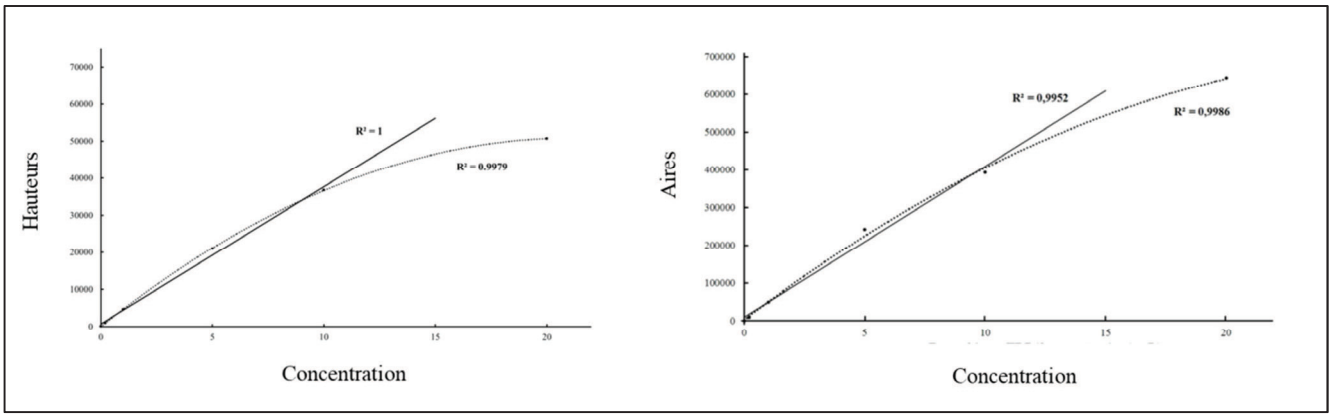


Figure 52 : Courbes de calibrations obtenues - Anticorps 10782-2-AP

Les signaux obtenus avec l'anticorps 10782-2-AP présentaient une linéarité de 0 à 10 µg/L de protéine TDP43 recombinante ($r^2 = 1$ pour les hauteurs et $r^2 = 0.995$ pour les aires). Les signaux obtenus pour la concentration à 20 µg/L faisaient évoquer une potentielle saturation de la détection. Nos résultats étaient confirmés par l'analyse d'une solution de protéine recombinante très fortement concentrée à 100 µg/L dont le profil était comparé à celui d'une solution concentrée à 5 µg/L (figure 53).

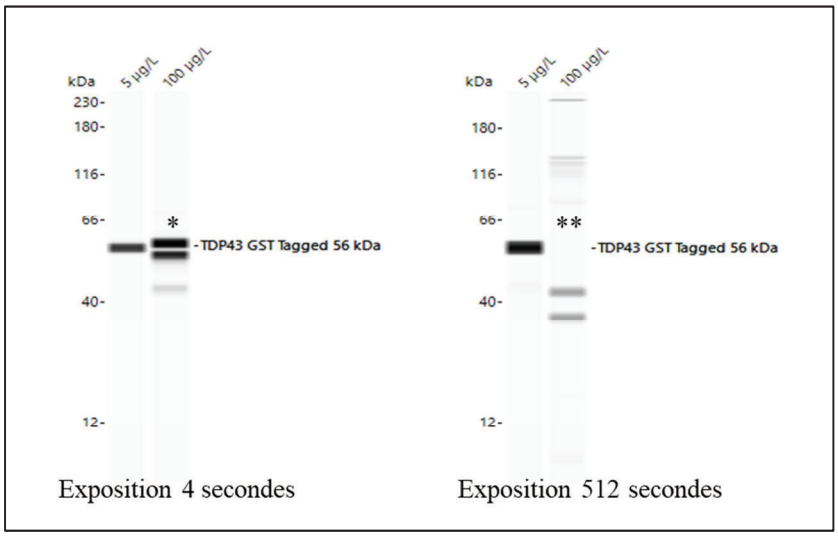
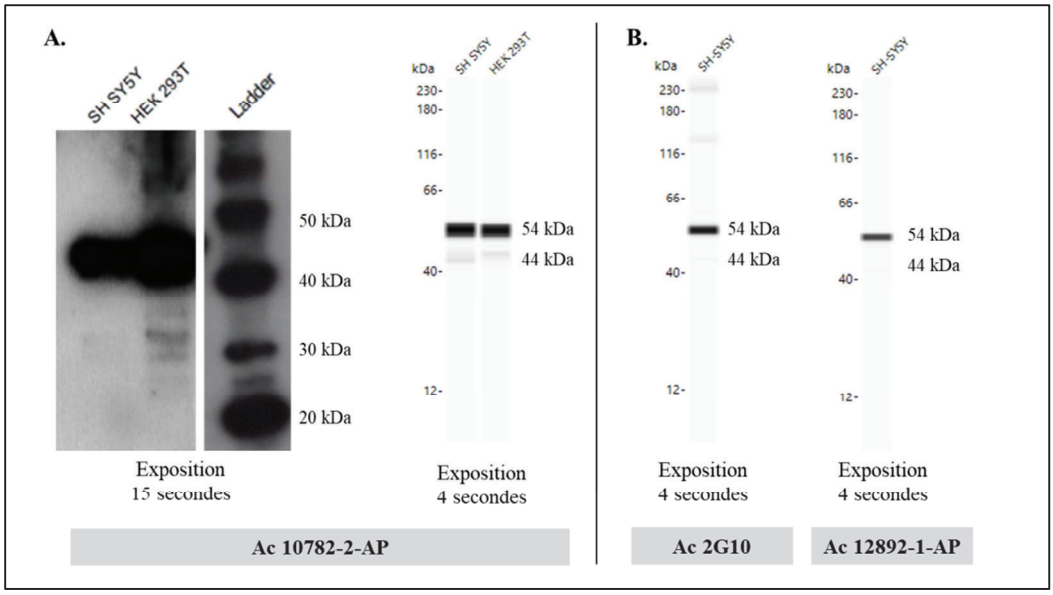


Figure 53 : Profils obtenus pour une solution à 100 µg/L avec la plus faible (4 secondes) et la plus forte exposition (512 secondes)

Le profil obtenu pour une solution de protéine recombinante à 100 µg/L mettait en évidence un dédoublement des pics (*) avec la durée d'exposition la plus faible en luminol et peroxyde (4 secondes) On observait par ailleurs l'apparition d'une bande de plus faible

intensité à 44 kDa. Avec la plus forte durée d'exposition (512 secondes), le signal à 56 kDa disparaissait totalement (**) et le signal à 44 kDa était dédoublé. Ce phénomène, précédemment décrit sous le nom de « burn-out » lors de l'utilisation de cette technologie (Nelson, Guynn et al. 2017) et également connu sous le nom de bandes « ghost » ou « hollow » en Western Blot, correspond à l'analyse d'une concentration en protéine d'intérêt trop forte, entraînant alors une déplétion totale en substrat (Alegria-Schaffer, Lodge et al. 2009).

Après ces premiers résultats, le développement de la méthode Simple Western a été poursuivi par l'analyse de protéine TDP43 endogène provenant des 2 lignées cellulaires HEK 293T et SH-SY5Y. Les dilutions les plus faibles des culots cellulaires (dilution au 1/5ème ou au 1/20ème) mettaient en évidence un phénomène de « burn-out » précédemment décrit. La figure 54 présente les résultats obtenus avec l'essai Simple Western sur une dilution au 1/50ème des solutions de protéine TDP43 endogène obtenues, en comparaison des résultats obtenus en Western Blot réalisé avec le même anticorps 10782-2-AP.



<u>Figure 54</u> : Profils protéiques de TDP43 endogène

En utilisant l'anticorps 10782-2-AP, le Western Blot mettait en évidence une bande de forte intensité à 45 kDa environ dans les 2 extraits cellulaires HEK 293T et SH-SY5Y dilués au 1/50ème. Des bandes de plus faible intensité (entre 30 et 40 kDa pouvaient également être

observées. Ces résultats étaient compatibles avec les données de la littérature où la bande principale observée avec le même anticorps était juste inférieure à 45 kDa (Freibaum, Chitta et al. 2010, Budini, Romano et al. 2015). D'autre part, on pouvait observer des signaux de plus forte intensité dans les cellules HEK 293T par rapport aux cellules SH-SY5Y à la même dilution (figure 54A).

L'analyse des mêmes extraits cellulaires dilués au 1/50ème pat la technologie Simple Western montrait des profils protéiques comparables, mais on pouvait observer un décalage dans la masse apparente des protéines observées. La bande de forte intensité était estimée à 54 kDa et une bande de plus faible intensité était estimée à 44 kDa. Des différences de résolution (différences de poids moléculaire entre technologie Simple Western et Western Blot) peuvent être observées et sont détaillées dans les spécifications du fournisseur, ces dernières variant jusqu'à 20 %. De plus, il existe également des variations entre poids moléculaire théorique et poids observé lors de l'utilisation de la technique SDS-PAGE, pouvant être expliquées notamment par la nature des acides aminés constitutifs de la protéine (Guan, Zhu et al. 2015).

Nos résultats observés avec l'essai Simple Western ont été confirmés en analysant la même dilution (1/50ème) de culture cellulaire SH-SY5Y avec 2 autres anticorps : l'anticorps 2G10 provenait d'une espèce animale différente et l'anticorps 12892-1-AP présentait un épitope sur la partie C-terminale de la protéine TDP43 (voir tableau XXIII). Les profils protéiques étaient équivalents avec les 3 anticorps anti-TDP43 : la bande principale était estimée à 54 kDa (figure 54B). Par ailleurs, des essais Simple Western réalisés par un laboratoire industriel retrouvaient eux aussi une bande principale de TDP43 à 54 kDa à partir d'une autre lignée cellulaire A431 (https://www.novusbio.com/products/tdp-43-tardbp-antibody-671834_mab7778).

2.2 La protéine TDP43 dans les échantillons cérébraux

2.2.1 Profils obtenus par la technique du Western Blot

La figure 55 détaille les profils obtenus pour l'ensemble des fractions séquentielles avec l'anticorps 10782-2-AP. Un patient présentant des inclusions de protéine TDP43 (à gauche) est comparé à un patient sans inclusions TDP43 (à droite).

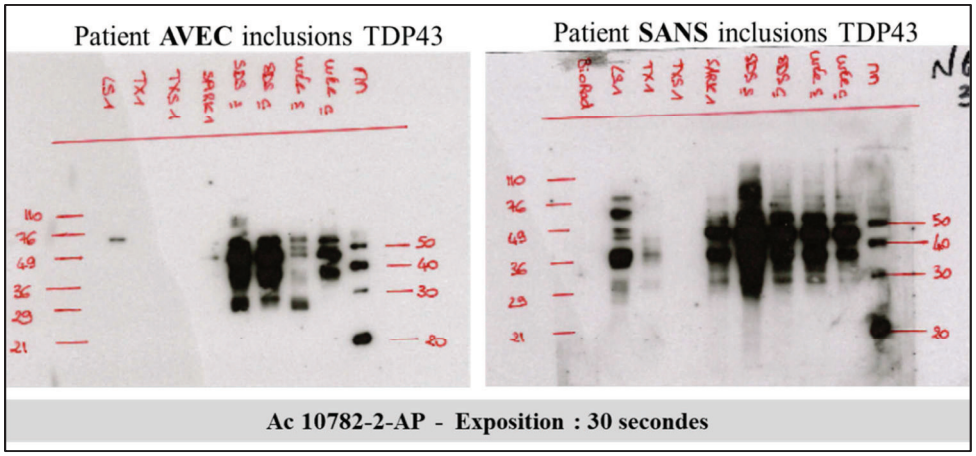


Figure 55 : Profils WB TDP43 avec l'anticorps 10782-2-AP (cortex frontal)

Des différences en termes d'intensité des signaux étaient observables entre les 2 patients : ces résultats pourraient être expliqués par des différences dans la quantité de protéines obtenues lors de l'extraction séquentielle. En effet, les homogénats initiaux étaient préparés à la même concentration (5 mL/g de cortex), les mêmes volumes de tampon ont été ajoutés et le même volume d'échantillon a été déposé dans chacun des puits. Par contre, les protéines totales n'ont pas été mesurées pour l'ensemble des échantillons.

Néanmoins, les profils étaient plutôt comparables pour les 2 patients analysés. Les fractions les plus riches en protéine TDP43 étaient les fractions SDS et urée (surnageants ou culots). Une bande de forte intensité était présente aux alentours de 45 kDa (de même taille que dans les extraits cellulaires SHSY5Y et HEK293T), encadrée par une bande en-dessous de 40 kDa et une bande juste au-dessus de 50 kDa. La fraction SARK (sarkosyl) retrouvait ce profil, mais avec des intensités plus faibles. Les autres fractions étaient beaucoup moins riches

en protéine TDP43, notamment les fractions TX (Triton X-100) et TX + S (Triton X-100 et sucrose).

Une bande aux alentours de 25 kDa dans les fractions SDS et urée étaient cependant observables chez le patient présentant des inclusions de protéine TDP43 et semblait plus intense que celle du patient sans inclusions de protéine TDP43. Dans les profils protéiques réalisés à partir du cortex frontal du second patient présentant des inclusions TDP43, cette même bande inférieure à 30 kDa était retrouvée avec une forte intensité pour le même temps d'exposition.

Peu d'études proposent des résultats de Western Blot sur tissu cérébral, rendant notre comparaison de profils difficile. Néanmoins, en 2006, Neumann *et al.* avaient réalisé ce protocole d'extraction séquentielle et avaient utilisé le même anticorps primaire (Neumann, Sampathu et al. 2006). Des profils caractéristiques des patients présentant des inclusions TDP43 avaient alors été mis en évidence : les fractions urée correspondantes retrouvaient des bandes pathologiques à environ 25 kDa, 45 kDa et un *smear*. En 2008, Steinacker *et al.* analysaient la fraction urée d'un cortex frontal d'un patient atteint de DLFT-U : un profil comparable à celui observé pour nos patients avait été décrit. Cependant, cette étude ne présentait pas de « contrôle négatif » (Steinacker, Hendrich et al. 2008). En 2014, Feneberg *et al.* retrouvaient une bande à 50 kDa de plus forte intensité dans le cortex frontal d'un patient atteint de SLA par rapport à un contrôle (Feneberg, Steinacker et al. 2014). En 2010, Soraru *et al.* utilisaient l'anticorps 2E2D3, un anticorps dirigé contre un autre épitope central de la protéine TDP43 et retrouvaient une bande supplémentaire à environ 45 kDa mais ne mettaient pas en évidence de bande à 25 kDa dans un échantillon cérébral de patient atteint de SLA (Soraru, Orsetti et al. 2010).

Ces fragments de 25 kDa ayant été décrits dans les études initiales, correspondent à des fragments C-terminaux de la protéine TDP43. Nous nous sommes alors interrogés sur capacité de l'anticorps 12892-1-AP, dont l'épitope se situe sur cette région C-terminale, à discriminer nos patients (figure 56).

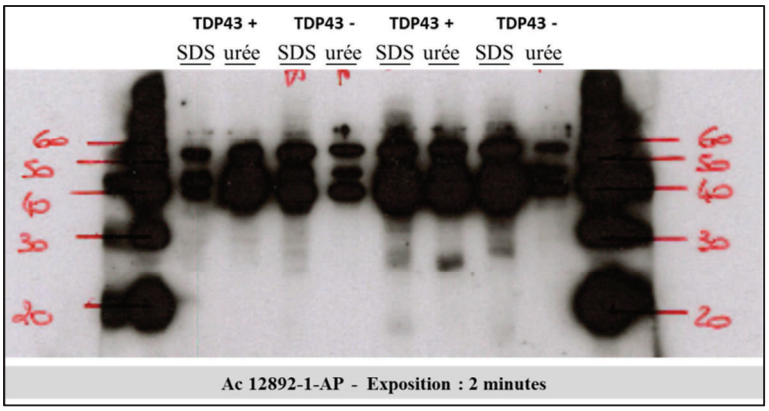


Figure 56 : Profils WB TDP43 avec l'anticorps 12892-1-AP (cortex frontal)

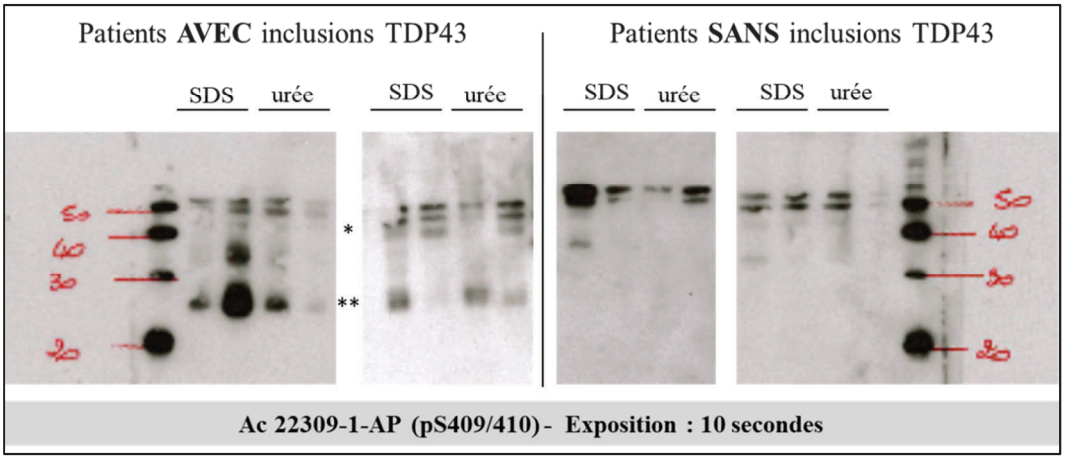
Les profils protéiques obtenus avec l'anticorps 12892-1-AP, dirigé contre la partie C-terminale de la protéine TDP43, mettaient en évidence les 3 bandes principales (40 kDa, 45 kDa et 50 kDa) déjà mis en évidence avec l'anticorps 10782-2-AP, dirigé contre la partie N-terminale de la protéine. On retrouvait également des bandes à moins de 30 kDa dans les fractions SDS et urée d'un patient présentant des inclusions TDP43. Cependant, ces bandes étaient également présentes dans les fractions SDS des patients sans inclusion TDP43, malgré une intensité plus faible. Cet anticorps ne semblait donc pas très discriminant.

Enfin, on pouvait comparer la sensibilité de l'anticorps 12892-1-AP à celle de l'anticorps 10782-2-AP. Les bandes observées dans les échantillons cérébraux étaient sensiblement identiques malgré des concentrations d'anticorps primaire (1/1000ème pour l'anticorps 12892-1-AP contre 1/2000ème pour l'anticorps 10782-2-AP) et des temps d'exposition très différents (2 minutes pour l'anticorps 12892-1-AP contre 30 secondes pour l'anticorps 10782-2-AP) : ces résultats confirment les résultats obtenus sur culture cellulaire où l'anticorps 12892-1-AP montrait une sensibilité plus faible que l'anticorps 10782-2-AP.

La protéine TDP43 possède 64 sites potentiels de phosphorylation, principalement localisés dans sa partie C-terminale (Kametani, Nonaka et al. 2009). Cette hyperphosphorylation serait à l'origine d'une diminution de la solubilité et d'un allongement de la demi-vie de la protéine dans l'espace cellulaire, favorisant son agrégation (Yamashita, Teramoto et al. 2016). De nombreuses études se sont donc portées sur l'intérêt de la protéine TDP43 phosphorylée pour diagnostiquer les patients atteints de DLFT ou SLA, notamment par des techniques d'immunohistochimie (Brettschneider, Del Tredici et al. 2013,

Brettschneider, Del Tredici et al. 2014, Tan, Kril et al. 2015, Guedes, Santin et al. 2017, Yousef, Robinson et al. 2017).

La figure 57 présente les résultats obtenus avec l'anticorps 22309-1-AP (pS409/410) sur les fractions SDS et urée de 4 échantillons de cortex frontal.



<u>Figure 57</u> : Profils WB TDP43 avec l'anticorps 22309-1-AP (cortex frontal)

Les profils protéiques obtenus avec l'anticorps 22309-1-AP, dirigé spécifiquement contre les sérines phosphorylées 409 et 410 de la protéine TDP43, mettaient en évidence 3 bandes au-delà de 40 kDa. La bande la plus basse, aux alentours de 45 kDa, semblait plus intense dans les échantillons de cortex frontal des patients porteurs d'inclusions TDP43 (*). Par ailleurs, une bande était observée à 25 kDa dans les fractions SDS et urée de cortex frontal présentant des inclusions TDP43 (**). Cette bande n'était pas observée dans les fractions SDS et urée des cortex sans inclusions TDP43.

Les études de Okamoto *et al.* et Hasegawa *et al.* avaient déjà retrouvé ce profil caractéristique dans les fractions urée des patients porteurs d'inclusions TDP43 en utilisant ce même anticorps anti-phosphorylation 409/410 (Okamoto, Fujita et al. 2015). Par ailleurs, la bande à 45 kDa et la bande de plus forte intensité à 25 kDa n'étaient plus présentes après traitement des échantillons de cortex par une phosphatase (Hasegawa, Arai et al. 2008). Ces résultats pourraient donc expliquer la faible immuno-réactivité précédemment observée pour l'anticorps 12892-1-AP si ce dernier reconnaît peu les fragments C-terminaux sous forme phosphorylée. Par ailleurs, ces deux études mettaient en évidence d'autres fragments de plus

petite taille, aux alentours de 20 kDa. L'intensité et la taille de ces fragments pouvaient par ailleurs être corrélées aux phénotypes cliniques et aux différentes morphologies des inclusions observées en immunohistochimie. Sur la figure 54, aucune bande aux alentours de 20 kDa n'était observée. Néanmoins, le temps d'exposition était très court (10 secondes seulement). Nous avons donc réalisé des expositions plus longues avec cette membrane : des bandes supplémentaires apparaissaient à partir de 2 minutes d'exposition. Malheureusement, une très grande partie de la membrane était entièrement noire (très forte réaction des bandes à 25 et 45 kDa), rendant l'interprétation impossible : ces résultats ne sont pas présentés dans ce mémoire.

Finalement, des anticorps anti-TDP43 en cours de développement au sein de la société AJ Roboscreen® ont pu être testés afin d'en proposer une caractérisation. Parmi eux, l'anticorps de souris 2G10 présentait un profil intéressant, présenté dans la figure 58.

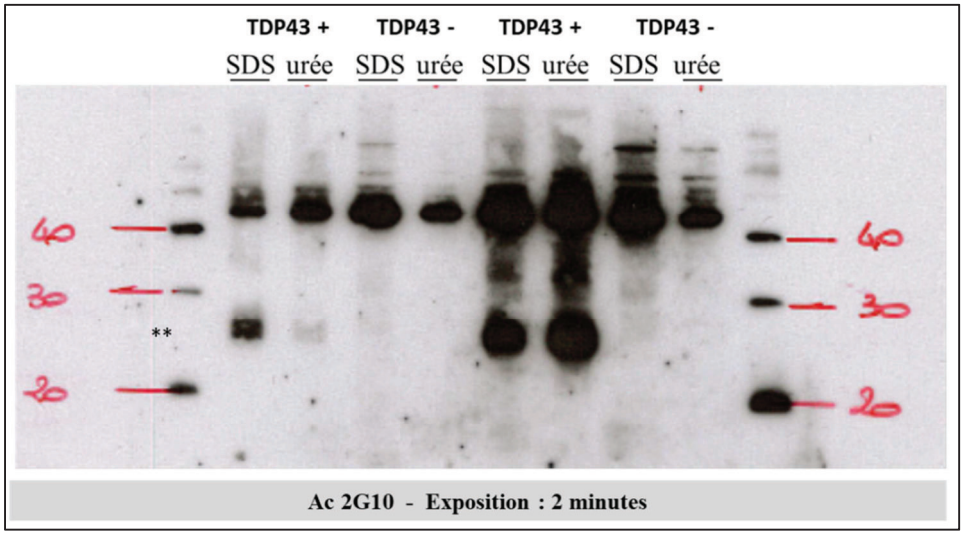


Figure 58 : Profils WB TDP43 avec l'anticorps 2G10 (cortex frontal)

Une bande à 45 kDa de forte intensité était observable pour tous les prélèvements de cortex. De manière intéressante, cet anticorps semblait mettre en évidence le fragment de 25 kDa précédemment observé avec l'anticorps dirigé contre les sérines phosphorylées en position 409 et 410 (**). Pour rappel, l'épitope de cet anticorps comprend les acides aminés 201 à 220 de la protéine TDP43 totale (tableau XXI). Or, le fragment de 25 kDa correspondrait aux acides aminés C-terminaux 184 à 414 de la protéine TDP43 (Che, Jiang et

al. 2011, Furukawa, Kaneko et al. 2011). Il semblerait donc probable que les anticorps dirigés contre des acides aminés après le 184ème acide aminé puissent mettre en évidence ce fragment de 25 kDa.

2.2.2 Profils obtenus par la technique du Simple Western

La figure 59 compare les résultats obtenus entre les 2 techniques pour les fractions SDS et urée d'un cortex frontal d'un patient présentant des inclusions TDP43 en utilisant l'anticorps 10782-2-AP :

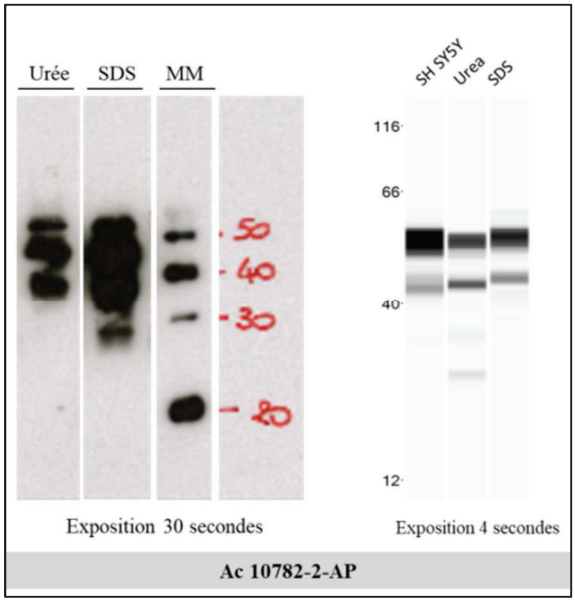
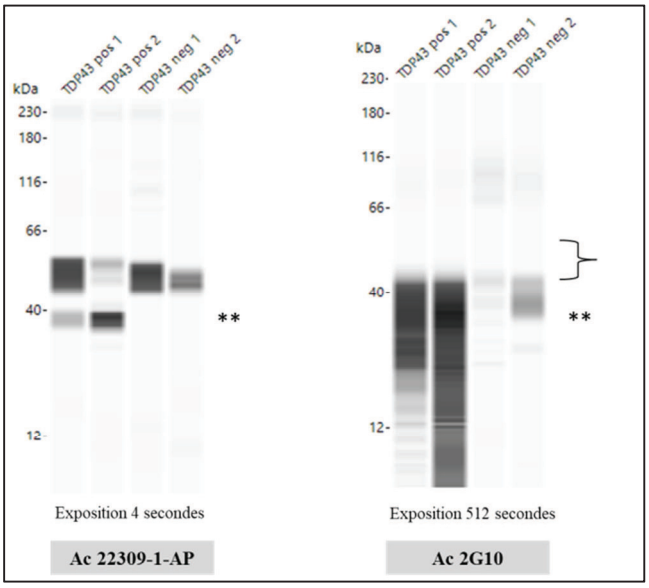


Figure 59 : Comparaison des profils protéiques entre Western Blot et Simple Western

L'analyse des fractions SDS et urée par la technologie Simple Western mettaient en évidence des bandes similaires à celles de la culture cellulaire SH-SY5Y précédemment analysée (44 et 54 kDa). La fraction urée mettait en évidence des bandes supplémentaires de 29 et 35 kDa qui n'étaient pas présentes dans la fraction SDS. Nous avions vu précédemment que la bande majoritaire observée dans les profils Western Blot était aussi comparable aux cultures cellulaires. Nous pouvions donc observer une similitude entre les profils protéiques obtenus par les 2 méthodes, à l'exception du décalage des masses apparentes précédemment décrit.

Nous nous sommes intéressés par la suite aux anticorps qui avaient présenté des différences avec la technique du Western Blot entre les prélèvements cérébraux de patients porteurs d'inclusions TDP43 et ceux sans inclusion, à savoir les anticorps 22309-1-AP (anticorps spécifique des phosphorylations en position 409/410) et l'anticorps 2G10. Les fractions urée des 4 patients pour lesquels nous disposions de cortex frontal ont été comparées avec ces 2 anticorps (figure 60).



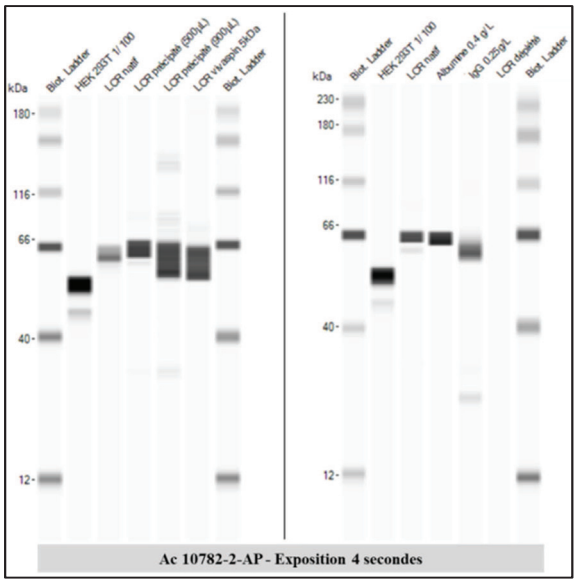
<u>Figure 60</u> : Profils SW TDP43 avec les anticorps 22309-1-AP et 2G10 (cortex frontal)

L'anticorps 22309-1-AP retrouvait les différences de profils précédemment décrites par la technique Western Blot (figure 52) avec un temps d'exposition de 4 secondes. Les bandes supplémentaires présentes chez les patients présentant des inclusions TDP43 (**) étaient estimées à 37 kDa : on retrouvait donc l'ordre de grandeur du décalage de masse apparente pour les formes tronquées de la protéine TDP43 également. Des différences de profils étaient également observables pour l'anticorps 2G10 (**). A la différence de l'anticorps 22309-1-AP, le temps d'exposition nécessaire pour mettre en évidence ces différences était de 512 secondes. En utilisant ce temps d'exposition, la bande à 54 kDa n'était plus présente (phénomène d'extinction de signal représenté sur la figure par l'accolade). Ces résultats étaient concordants une fois de plus avec ceux obtenus par la technique du Western Blot : en effet, le temps nécessaire à l'apparition des bandes à 25 kDa chez les patients TDP43 positifs était de 2 minutes avec l'anticorps 2G10 contre 10 secondes pour l'anticorps 22309-1-AP. Les analyses réalisées sur prélèvements cérébraux confirmaient

donc la différence de taille de la protéine TDP43 entre les 2 techniques. Par ailleurs, les profils spécifiques mis en évidence pour les anticorps 22309-1-AP et 2G10 observés par la technique du Western Blot étaient également retrouvés avec la technique Simple Western.

2.3 La protéine TDP43 dans le LCS

L'analyse des profils de la protéine TDP43 dans le LCS a été permise après le développement de la technique Simple Western puis sa validation sur échantillons cérébraux. Les résultats présentés se concentreront une nouvelle fois sur l'anticorps 10782-2-AP, considéré comme l'anticorps de référence et les 2 anticorps 22309-1-AP et 2G10 qui ont démontré un intérêt diagnostique en mettant en évidence des profils différents en fonction de la présence d'inclusions de protéine TDP43 ou non. La figure 61 détaille les résultats obtenus avec un échantillon de LCS de 2 patients porteurs d'une expansion sur le gène *C9ORF72* (patients 1 et 11 du tableau XV) avec différentes techniques de pré-traitement.



<u>Figure 61</u> : Profils SW TDP43 avec l'anticorps 10782-2-AP (LCS)
Différentes préparations de LCS (à gauche) et essais d'interférences avec l'albumine et les immunoglobulines (à droite)

Un échantillon de culture cellulaire HEK 293T, servant de contrôle positif, avait été analysé en parallèle des échantillons de LCS. Le premier échantillon de LCS déposé, soit le LCS natif, mettait en évidence une seule bande à 62 kDa. 500 µL et 900 µL de ce même LCS

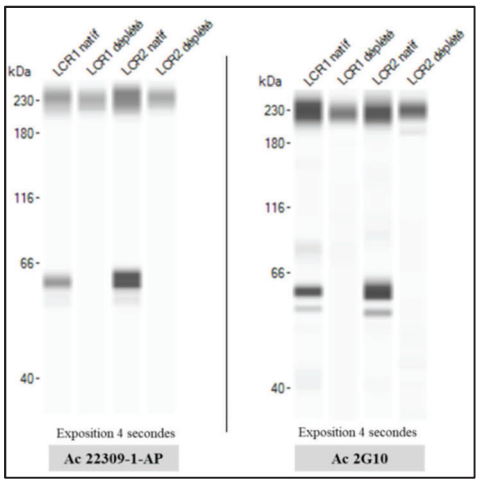
ont été précipité à l'acétone selon le protocole précédemment décrit et repris par 50 µL de tampon de reprise : les facteurs de concentration effectués étaient donc x 10 et x 18 respectivement. La précipitation à partir de 500 µl de LCS mettait en évidence la même bande à 62 kDa, mais de plus forte intensité. La précipitation à partir de 900 µL de LCS retrouvait également cette bande avec une intensité encore plus forte et faisait également apparaître d'autres bandes d'intensité modérée. Aucune d'entre elles ne correspondait au poids moléculaires observés dans la culture cellulaire. L'échantillon de LCS a également été concentré par ultrafiltration avec une Vivaspin 5 kDa : la seule bande observée était la bande précédemment décrite à 62 kDa. Ce résultat était précédemment décrit dans la littérature. En 2008, Steinacker *et al.* avaient étudié les profils Western Blot de la protéine TDP43 dans le LCS. Dans cette étude, l'anticorps 10782-2-AP avait déjà échoué à mettre en évidence une bande spécifique de la protéine TDP43 à 45 kDa, y compris avec des prises d'essai allant jusqu'à 200 µL. D'autres anticorps évalués mettaient cependant en évidence une bande à 45 kDa, au même niveau que leur contrôle positif : malheureusement ces anticorps fabriqués pour les besoins de leur étude étaient peu décrits (Steinacker, Hendrich et al. 2008). Une autre différence potentiellement majeure entre cette étude et la réalisation de nos essais consistait dans la préparation initiale du LCS.

Dans l'étude de Steinacker *et al.*, le protocole pré-analytique ne décrit qu'une congélation des prélèvements avant analyse. Or, dans notre étude, les prélèvements de LCS ont été systématiquement centrifugés avant congélation puis les analyses des différents marqueurs par technique ELISA ont été réalisées sur surnageant. Bien que le LCS soit une matrice biologique paucicellulaire à l'état physiologique, on peut considérer une concentration en globules blancs inférieure à 5 / µL comme normale. Ces différences de profils pourraient-elles également être expliquées par la différence de nature d'échantillon ?

Le profil obtenu dans un second LCS natif a été comparé à des solutions d'albumine et d'immunoglobulines, deux composants protéiques importants de cette matrice biologique. Le profil du LCS natif était superposable à ceux observés dans les solutions d'albumine et d'immunoglobulines. Par ailleurs, l'échantillon de LCS déplété en albumine et immunoglobulines ne présentait plus aucun signal, corroborant notre résultat précédent. Ainsi, le signal observé est non spécifique et correspond probablement à une détection de l'albumine et/ou des immunoglobulines.

Dans une étude de 2014, Feneberg *et al.* retrouvaient cette bande à 45 kDa avec le même anticorps (et potentiellement avec des échantillons de LCS non centrifugés également) à laquelle s'ajoutaient des bandes correspondant à de l'albumine et des immunoglobulines. Par ailleurs, cette étude concluait que la protéine TDP43 observée dans le LCS dérivait du sang et ne correspondait donc pas à la forme pathologique de la protéine, limitant alors ses performances diagnostique (Feneberg, Steinacker et al. 2014). En 2018, Majumder *et al.* réalisaient une méta-analyse des performances diagnostiques de la protéine TDP43 dans le LCS à l'aide des technologies Western Blot et ELISA. Aucune nouvelle étude portant sur la description des profils protéiques de TDP43 par Western Blot n'était recensée hormis ces deux études précédentes (Majumder, Gregory et al. 2018).

Nous avons également étudié les profils de la protéine TDP43 à l'aide des anticorps 22309-1-AP et 2G10. Pour rappel, ces 2 anticorps avaient été les seuls à proposer des profils discriminants à partir des échantillons cérébraux de patients. Deux patients étaient analysés : un patient porteur d'une expansion *C9ORF72* (patient 11 du tableau XV = LCS1) et un second patient sans variant génétique observé dans notre étude (LCS2). Une nouvelle fois, les échantillons natifs ont été analysés en comparaison de ces échantillons déplétés en albumine et immunoglobulines.



<u>Figure 62</u> : Profils SW TDP43 avec les anticorps 22309-1-AP et 2G10 (LCS)

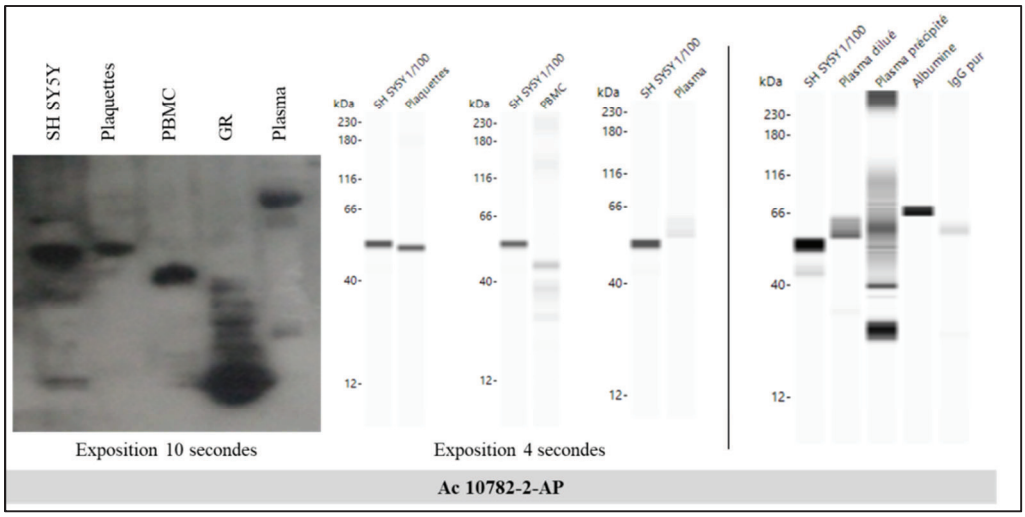
Ces deux anticorps montraient des résultats comparables à l'anticorps 10782-2-AP : les deux LCS natifs présentaient deux bandes aux alentours de 60 kDa. Ces dernières disparaissaient après déplétion en albumine et immunoglobulines.

Nous nous sommes alors demandé si les concentrations en albumine et immunoglobulines dans le LCS pouvaient être des facteurs confondants dans le dosage de la protéine TDP43 par technique ELISA. Pour les patients pour lesquels nous disposions de ces données supplémentaires, aucune corrélation n'était observée entre la concentration en albumine ou en immunoglobulines et la concentration en protéine TDP43 totale ($p = 0.89$ et $p = 0.63$ respectivement). Cependant, nous avons également pu montrer que les patients atteints de SLA présentaient une concentration en immunoglobulines dans le LCS supérieure à celle des patients non atteints de SLA ($p = 0.04$). La présence d'une augmentation des immunoglobulines dans le LCS pourrait donc expliquer partiellement l'augmentation de la protéine TDP43 dans le LCS.

2.4 La protéine TDP43 dans le sang total

Dans cette dernière étude, nous nous sommes focalisés sur les profils protéiques de la protéine TDP43 dans les différents compartiments du sang total. Les résultats peu concluants des profils protéiques dans le LCS pouvaient être expliqués par le fait que les anticorps utilisés ne semblent que partiellement spécifiques de la protéine TDP43 et interagissent avec l'albumine et les immunoglobulines, deux composants protéiques importants de cette matrice biologique. Par ailleurs, la protéine TDP43 étant intracellulaire, nous avons voulu déterminer quelles fractions du sang total pouvaient contenir cette protéine.

La figure 63 présente les profils de la protéine TDP43 dans les plaquettes, les PBMC, les globules rouges (GR) et le plasma obtenus chez un témoin, en comparaison du profil obtenu dans une culture cellulaire.

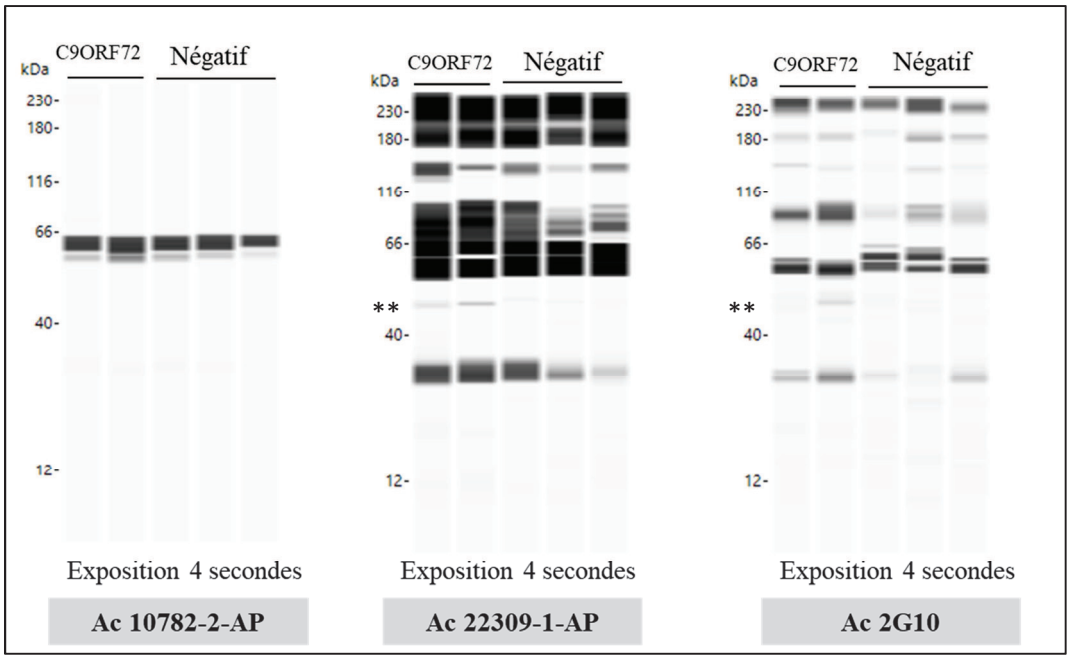


<u>Figure 63</u> : Profils TDP43 avec l'anticorps 10782-2-AP (sang total)

Les résultats obtenus étaient totalement concordants entre les deux techniques Western Blot et Simple Western. Le culot plaquettaire analysé mettait en évidence une seule bande dont le poids moléculaire était identique à celui observé dans les cultures cellulaires. Les PBMC (lymphocytes et monocytes) présentaient une bande de forte intensité, mais de poids moléculaire inférieur à la culture cellulaire SH-SY5Y. D'autres bandes de plus faible taille étaient également observées. L'étude des globules rouges par Western Blot mettait en évidence de nombreuses bandes, dont la principale présentait un poids moléculaire inférieur à 30 kDa. Finalement, le plasma présentait des bandes dont les 2 principales se situaient au-delà du poids moléculaire de la protéine TDP43 de la culture SH-SY5Y. Seul le culot plaquettaire présentait une bande comparable à la culture cellulaire SH-SY5Y.

La précipitation à l'acétone de l'échantillon de plasma selon le protocole précédemment décrit renforçait l'intensité de la bande à 62 kDa (smear) et faisait apparaître une bande de forte intensité à 28 kDa. Ces bandes étaient superposables à celles observées dans les solutions d'albumine et d'immunoglobulines. Ce nouvel essai confirmait donc nos résultats décrits lors de l'étude du LCS, l'albumine et les immunoglobulines étant très concentrées dans le plasma. A l'inverse, les profils observés dans les PBMC et *a fortiori* dans les culots plaquettaires ne montraient aucune bande en commun avec l'albumine ou les immunoglobulines. La détection de la protéine TDP43 intracellulaire semble donc être une stratégie très pertinente avec cet anticorps.

Cependant, le plasma étant l'une des matrices les plus fréquemment utilisées en biologie car très facilement accessible, nous avons voulu évaluer les anticorps qui semblaient discriminants sur les échantillons cérébraux. Du plasma de 5 patients dont le génotypage avait été réalisé précédemment (2 patients 1 et 11, porteurs d'une grande expansion *C9ORF72* et 3 patients sans mutation *C9ORF72* ou *GRN* observée) a été précipité à l'acétone pour obtenir une concentration en protéines totales identiques pour tous les échantillons.

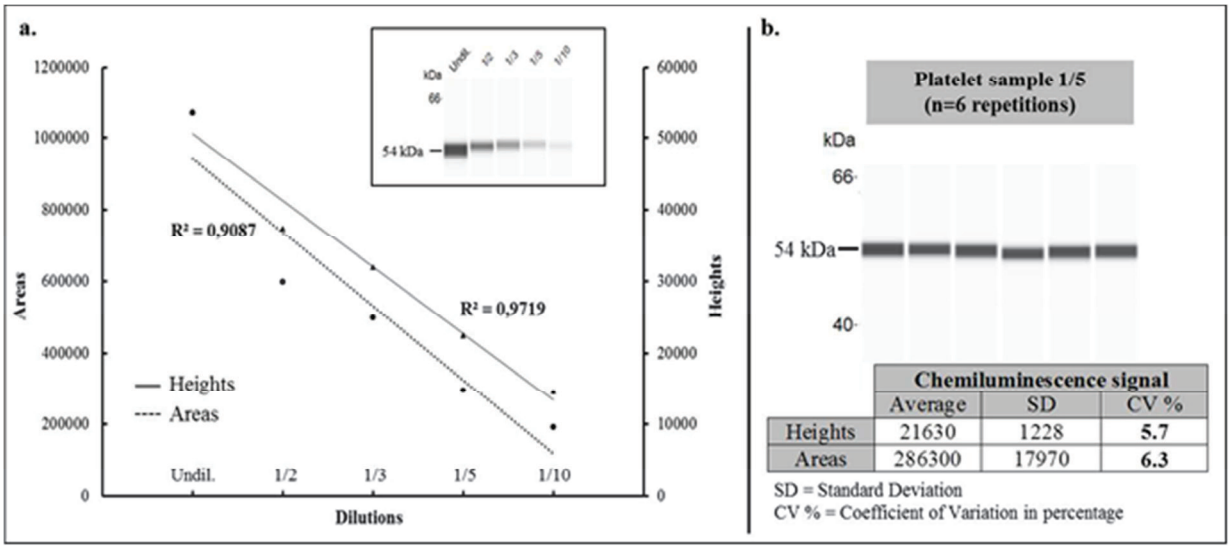


<u>Figure 64</u> : Profils SW TDP43 dans le plasma

Des bandes correspondant à l'albumine et aux immunoglobulines étaient observées pour tous les patients et avec tous les anticorps. L'anticorps 10782-2-AP ne mettait pas de bande spécifique en évidence. En revanche, les anticorps 22309-1-AP et 2G10 retrouvaient une bande similaire estimée à 49 kDa (**). Cette bande était plus intense chez les patients porteurs d'une expansion sur le gène *C9ORF72*. Ainsi, le plasma pourrait être une matrice plus intéressante pour l'étude des profils protéiques de TDP43 que le LCS. En 2009, Foulds *et al.* avaient proposé une étude de la protéine TDP43 totale et de la protéine TDP43 phosphorylée sur des échantillons plasmatiques de patients atteints de DLFT (Foulds, Davidson et al. 2009). Leur dosage ELISA « maison » révélait une augmentation de la protéine TDP43 plasmatique chez les patients présentant des inclusions TDP43. Par ailleurs, des plasmas déplétés en albumine et immunoglobulines avaient été analysés en Western Blot. Les profils en Western Blot présentaient des signaux plus intenses pour les plasmas dont les

densités optiques en ELISA étaient fortes et inversement. Cependant, les profils protéiques présentés ressemblaient beaucoup aux profils de l'albumine et des immunoglobulines présentés auparavant. Nous avons observé lors de notre étude que pour les plasmas particulièrement concentrés en albumine et immunoglobulines, une étape de déplétion n'était pas forcément toujours suffisante pour totalement supprimer le signal observé avec l'anticorps phosphorylé qui présente une forte affinité pour ces protéines. Enfin, en 2014, Suarez-Calvet *et al.* avaient observé une augmentation de la protéine TDP43 phosphorylée plasmatique chez les patients porteurs de mutations *C9ORF72* ou *GRN* en comparaison de patients DLFT sans mutation décrite ou chez des contrôles (Suarez-Calvet, Dols-Icardo et al. 2014).

Devant des premiers résultats encourageants, l'étude des profils protéiques de la protéine TDP43 dans les culots plaquettaires a fait l'objet d'une publication internationale présentée à la fin de ce manuscrit (Fourier, Escal et al. 2018). Cette étude présente la faisabilité technique et les avantages de l'analyse des culots plaquettaires par la technique Simple Western. En plus de présenter un profil qualitatif, nous étions en mesure de quantifier le signal de la bande présente dans les culots plaquettaires de 9 patients atteints de DLFT (aucun d'entre eux ne présentait de variant *C9ORF72* et *GRN*). Malgré une normalisation de la concentration en plaquettes dans chaque suspension (200 G/L), des différences très importantes de signaux étaient observables : le signal le plus fort était 30 fois plus fort que le signal le plus faible. Des essais de validation de cette méthode ont par ailleurs été réalisés. Une linéarité des signaux était observée suite à la réalisation de dilutions en cascade d'un échantillon. Par ailleurs, la variabilité au sein d'un essai (répétabilité) était de 5.7 %, donc bien largement inférieure aux variations observées entre les prélèvements. Ces différents éléments nous ont permis de valider le principe technique de l'analyse des échantillons plaquettaires par notre protocole Simple Western.



	Chemiluminescence signal		
	Average	SD	CV %
Heights	21630	1228	**5.7**
Areas	286300	17970	**6.3**

SD = Standard Deviation
CV % = Coefficient of Variation in percentage

<u>Figure 65</u> : Validation de méthode Simple Western sur échantillons plaquettaires
A. Essais de linéarité ; B. Répétabilité

Cette étude est bien entendue préliminaire. Il sera par la suite nécessaire d'étudier les facteurs pré-analytiques, physiologiques (âge, sexe des patients) ou pathologiques sur de plus larges cohortes de patients afin de déterminer si l'analyse de la protéine TDP43 dans les plaquettes peut se révéler être un biomarqueur candidat dans le diagnostic des DLFT. Par ailleurs, aucun patient ne présentait de variant génétique pathogène dans cette étude. L'analyse de culots plaquettaires de patients présentant les différents variants *C9ORF72* ou *GRN* sera particulièrement intéressante pour observer d'éventuelles variations quantitatives associées ou non à des profils protéiques spécifiques chez ces patients.

Discussion & Perspectives

Les dégénérescences lobaires frontotemporales (DLFT) représentent la troisième étiologie de trouble neurocognitif chez l'adulte de moins de 65 ans, avec une incidence estimée dans différents pays européens entre 4 et 30 pour 100 000 (Luukkainen, Bloigu et al. 2015). Les DLFT constituent un groupe de maladies très hétérogènes sur le plan clinique, histopathologique et génétique. Les DLFT restent encore méconnues et sous-diagnostiquées, d'autant que certains phénotypes cliniques peuvent répondre aux critères de maladie d'Alzheimer probable. Les troubles du comportement et de l'humeur peuvent également égarer le diagnostic vers des pathologies psychiatriques : on estime qu'environ 40 % des cas de DLFT ne sont actuellement pas diagnostiqués. L'enjeu de recherche biomédicale et de santé publique des DLFT est donc majeur.

Des critères diagnostiques ont été proposés pour améliorer le diagnostic des DLFT (Gorno-Tempini, Hillis et al. 2011, Rascovsky, Hodges et al. 2011) : une DLFT peut ainsi être classée en possible, probable ou certaine. Chez un patient présentant un phénotype clinique compatible, le diagnostic de DLFT sera certain lorsque des preuves histopathologiques et/ou un variant génétique pathogène connu seront mis en évidence. Ce dernier point est particulièrement important car une histoire familiale est décrite chez 40 à 50 % des patients atteints de dégénérescence lobaire frontotemporale (Pottier, Ravenscroft et al. 2016). En 2017, Gao *et al.* recensaient 14 gènes responsables de DLFT ou de DLFT-SLA (Gao, Almeida et al. 2017). Parmi ceux-ci, 2 gènes fréquemment impliqués sont associés à la présence d'agrégats cérébraux de protéine TDP43 : les gènes *GRN* et *C9ORF72* (Lee, Porta et al. 2017).

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier la pertinence de la protéine TDP43 comme biomarqueur candidat des DLFT. Dans quels compartiments cette protéine est-elle localisée ? Présente-t-elle des profils qualitatifs différents ou des concentrations variables entre des populations de patients les plus homogènes possibles sur le plan clinique et neuropathologique ?

Pour répondre à ces différentes questions, le premier versant de ce travail de thèse était consacré au développement d'outils de diagnostic moléculaire afin de constituer une cohorte de cas DLFT-TDP43 certains. Les méthodes développées ont permis la mise en évidence de

variants sur les gènes *GRN* et *C9ORF72*, ces deux gènes étant responsables de la très large majorité des DLFT-TDP43 familiales.

L'étude du gène *GRN* a reposé sur l'amplification de ses exons à l'aide de différentes PCR puis un séquençage des amplicons par technique Sanger. Lors de notre étude, 1 micro-délétion et 1 micro-insertion non encore décrites étaient à l'origine d'un décalage de lecture et de l'apparition d'un codon Stop prématuré, résultant en une protéine progranuline tronquée. Ces résultats étaient concordants avec le dosage de la protéine progranuline dans le plasma de ces deux patients qui était diminuée par rapport à des patients ne présentant pas de variants sur le gène *GRN*. Le dosage de la protéine progranuline dans le LCS mettait également en évidence une diminution de sa concentration chez des patients porteurs de variants sur le gène *GRN* par rapport à des patients non porteurs de variants (n = 5). Le dosage quantitatif de la protéine progranuline (dans le LCS ou le plasma) s'avère donc une stratégie très efficace pour effectuer le screening des variants non-sens (apparition d'un codon Stop) ou faux-sens entraînant un décalage du cadre de lecture sur le gène *GRN* (Ghidoni, Benussi et al. 2008). La plupart des mutations actuellement décrites appartiennent à cette catégorie. En poursuivant le diagnostic moléculaire sur le gène *GRN* pour des patients atteints de DLFT, nous serons probablement amenés à mettre en évidence des variants de signification indéterminée, par exemple un variant à l'origine d'un changement d'un acide aminé : ces variants seront-ils responsables d'une diminution de la protéine progranuline circulante ?

La mise en évidence et la caractérisation de grandes expansions $(G_4C_2)_n$ sur le gène *C9ORF72* a été permise grâce à l'analyse combinée des résultats de différentes méthodes de diagnostic moléculaire. En effet, la présence d'une expansion d'hexanucléotides était associée à la présence d'un profil évocateur (en dents de scie) par la technique de RP-PCR et d'une seule bande observable par la technique de PCR classique. Si le profil n'était pas évocateur en RP-PCR, on pouvait conclure à l'absence de grande expansion. Le patient était alors homozygote sain ou hétérozygote sain selon les résultats de la PCR (1 ou 2 bandes observées). Les prélèvements étaient également systématiquement analysés par la technique du Southern Blot, qui a montré une sensibilité et une spécificité de 100 % par rapport à la RP-PCR. Cette technique présentait plusieurs avantages. Tout d'abord, le Southern Blot est quasiment la seule technique validée permettant de déterminer la longueur des grandes expansions $(G_4C_2)_n$ sur le gène *C9ORF72* (Beck, Poulter et al. 2013, Nordin, Akimoto et al.

2015). De plus, cette technique permet de s'affranchir du risque de faux-négatifs potentiellement observés par RP-PCR. En effet, des micro-insertions / délétions ou des variations dans la séquence d'ADN au niveau du site de fixation des amorces de la RP-PCR peuvent être à l'origine d'une absence d'amplification (Suh, Grando et al. 2018).

Récemment, Ebbert *et al.* ont néanmoins réussi à séquencer des expansions $(G_4C_2)_n$ sur le gène *C9ORF72* à l'aide de technologies de séquençage de nouvelle génération après transfert de l'expansion dans un plasmide (Ebbert, Farrugia et al. 2018). Cette avancée technique permettrait d'évaluer la taille des expansions, mais surtout de déterminer si les répétitions sont homogènes ou sont interrompues par des séquences non (G_4C_2). De telles interruptions pourraient en effet interagir sur l'âge de début ou l'évolution de la maladie, comme cela a été décrit dans d'autres pathologies liées à des expansions de répétitions de nucléotides (Stolle, Frackelton et al. 2008, Kraus-Perrotta and Lagalwar 2016). Dans le cadre d'un appel d'offres obtenu début 2018, nous avons également entrepris récemment l'analyse des grandes expansions sur le gène *C9ORF72* par des technologies similaires de séquençage nouvelle génération. Une préparation par technologie CRISPR-Cpf1 (Zetsche, Gootenberg et al. 2015) permettrait de cliver la région spécifique d'ADN comprenant les expansions $(G_4C_2)_n$ et de pouvoir la séquencer sans avoir recours à une amplification. L'objectif du développement de cette technologie est double : en parallèle de l'étude de la nature des expansions, nous pourrions limiter voire supprimer le recours au Southern Blot, technique bien maîtrisée au laboratoire mais entièrement manuelle, longue et nécessitant le recours à de la radioactivité.

La détermination des concentrations plasmatiques de la protéine C9orf72 a également été réalisée dans le cadre de ce travail. L'une des hypothèses physiopathologiques à l'origine d'un phénotype clinique de DLFT pourrait être une éventuelle haplo-insuffisance causée par les grandes expansions sur le gène *C9ORF72* (Balendra and Isaacs 2018). Nous n'avons pas observé de différence significative pour les concentrations en protéine entre les patients porteurs d'une expansion *C9ORF72* et ceux sans expansion. Ces résultats sont peu en faveur d'une haplo-insuffisance, au moins dans le compartiment périphérique, mais mériteraient d'être complétés par l'analyse des différentes isoformes de la protéine C9orf72 dans le plasma et sur tissu cérébral (Waite, Baumer et al. 2014). Par ailleurs, l'absence de différence entre les 2 populations ne permet pas de proposer le dosage plasmatique de la protéine C9orf72 comme

marqueur de dépistage d'une expansion sur le gène *C9ORF72* (Fourier, Formaglio et al. 2018). A l'inverse, des protéines produites dans le cadre d'une traduction non conventionnelle des expansions $(G_4C_2)_n$ appelées C9RAN (*C9 repeat non-associated ATG*) ont été mises en évidence dans le LCS des patients porteurs d'une expansion *C9ORF72*, qu'ils soient symptomatiques ou non (Gendron, van Blitterswijk et al. 2015, Lehmer, Oeckl et al. 2017). Le déploiement de ce dosage pourrait permettre la pré-sélection de patients devant bénéficier du génotypage *C9ORF72*. Par ailleurs, les dosages de la progranuline et des C9RAN pourraient s'avérer très utiles pour évaluer ou proposer un suivi biologique de nouvelles thérapeutiques ciblées (Cenik, Sephton et al. 2011, Gendron, Chew et al. 2017).

Le développement de ces outils de biologie moléculaire nous a permis de constituer une cohorte de 26 cas certains de DLFT-TDP43 (voir tableau XV). Parmi ces 26 cas certains, nous disposions de prélèvements de LCS pour 24 d'entre eux. La deuxième partie de ce travail de thèse consistait en une analyse des résultats quantitatifs de différents marqueurs dans le LCS au sein de ce groupe de patients puis leur comparaison à des groupes homogènes sur le plan clinique et/ou protéinopathie théorique. Les 3 sous-groupes de comparaison étaient constituées de patients atteints de SLA ou de variant sémantique (diagnostic probable de DLFT-TDP43), de patients atteints de paralysie supranucléaire progressive (diagnostic probable de DLFT-Tau) et d'une population de patients présentant une pathologie psychiatrique primaire (absence théorique d'inclusions Tau et TDP43). Cette étude était réalisée sur une cohorte totale de 104 patients.

Les premiers marqueurs analysés étaient les biomarqueurs du LCS de la maladie d'Alzheimer. Ces marqueurs permettent de renforcer la confiance dans le diagnostic de maladie d'Alzheimer car ils mettent en évidence des preuves d'un processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer chez un patient dément (McKhann, Knopman et al. 2011). Les dosages validés des marqueurs du LCS, à savoir la protéine Tau totale, sa forme phosphorylée en position 181 et le peptide amyloïde Aβ 1-42, ne sont pas réalisés pour tous les patients présentant un tableau clinique de maladie d'Alzheimer, mais présentent surtout une plus-value diagnostique dans les pathologies mixtes, les présentations atypiques ou encore pour les patients dont le diagnostic clinique est ambigu (Niemantsverdriet, Valckx et al. 2017). Cette indication clinique prend notamment toute sa place dans le diagnostic différentiel d'une DLFT (notamment son variant comportemental) et d'une variante

comportemental de la maladie d'Alzheimer (Borroni, Benussi et al. 2018). Les marqueurs de la maladie d'Alzheimer ont donc été naturellement évalués dans ce contexte par de nombreuses équipes pour comparer des populations de patients atteints de maladie d'Alzheimer, de DFLT ou de contrôles (Riemenschneider, Wagenpfeil et al. 2002, Bibl, Gallus et al. 2012, Struyfs, Niemantsverdriet et al. 2015, Llorens, Schmitz et al. 2016). Dans notre étude, les meilleures performances diagnostiques obtenues pour chacun de ces 3 marqueurs analysés isolément étaient obtenues pour la protéine Tau totale (tableau XVIII). L'association des marqueurs Tau totale et Tau phosphorylée, sous forme du ratio pTau / tTau présentait de très bonnes performances diagnostiques. La population de cas certains TDP43 présentait les valeurs du ratio pTau/tTau les plus basses et ces valeurs étaient différentes de celles des cohortes DLFT-Tau et psychiatriques. De manière intéressante, on pouvait également observer que les patients de la cohorte psychiatrique présentaient les valeurs du ratio pTau/tTau les plus élevées et ce ratio était statistiquement différent de l'ensemble des autres cohortes étudiées. Ces résultats étaient concordants avec les données retrouvées dans la littérature (Borroni, Benussi et al. 2015, Vijverberg, Dols et al. 2017).

Le deuxième dosage effectué était celui des chaînes légères des neurofilaments NfL. Ce marqueur a été beaucoup analysé ces dernières années, grâce au développement de kits industriels de bonne qualité analytique (Oeckl, Jardel et al. 2016) et à des études possibles dans le LCS mais aussi dans le plasma de patients notamment (Novakova, Zetterberg et al. 2017). Les cohortes de cas DLFT-TDP43 certains et probables présentaient une augmentation des NFl supérieure aux cas DLFT-Tau. La cohorte de patients atteints de troubles psychiatriques présentait les concentrations en NfL les plus faibles (figure 42). Ces résultats étaient une nouvelle fois concordants avec les données de la littérature (Vijverberg, Dols et al. 2017, Goossens, Bjerke et al. 2018). Enfin, on observait également des différences dans les concentrations de NfL entre patients atteints de SLA (associée à une DLFT ou non) et patients souffrant de DLFT-TDP43 pure (figure 43).

Le métabolisme des neurofilaments inclut une phosphorylation sur des répétitions lysine-sérine-proline hautement conservées localisées dans le domaine C-terminal des chaînes moyennes et lourdes. Cette phosphorylation permettrait de réguler certains aspects de leur métabolisme et de leur transport (Dale and Garcia 2012). Les chaînes lourdes phosphorylées des neurofilaments (pNfH) ont également été mesurées dans les cohortes de patients atteints

de DLFT et/ou SLA (Poesen, De Schaepdryver et al. 2017). Les pNfH mesurés dans le LCS étaient augmentés chez les patients atteints de SLA par rapport à une population contrôle incluant des DLFT : les pNfH seraient donc plus spécifiques de la SLA que les NfL (qui sont augmentés dans le LCS des patients DLFT et SLA). L'intérêt pronostique des NfL (Gaiani, Martinelli et al. 2017) et des pNfH (McCombe, Pfluger et al. 2015) a également été analysé : une augmentation de ces marqueurs serait ainsi corrélée à une progression plus rapide de la maladie. L'intérêt des neurofilaments (qu'il s'agisse des chaînes légères ou des chaînes lourdes phosphorylées) a été démontré dans d'autres pathologies comme la sclérose en plaques (Disanto, Barro et al. 2017), la maladie de Huntington (Byrne, Rodrigues et al. 2017) ou dans les commotions cérébrales (Shahim, Zetterberg et al. 2017). La place exacte de ces marqueurs reste encore à déterminer dans la pratique quotidienne, mais il semble évident que l'analyse de ces marqueurs pourrait être proposée dans de multiples indications.

Nos résultats mettaient en évidence des concentrations de NfL dans le LCS les plus basses pour la cohorte de patients atteints de pathologies psychiatriques. Un travail préliminaire avait présenté les performances diagnostiques et la valeur seuil retenue pour discriminer la cohorte DLFT-TDP43 certaine de la cohorte de patients atteints de troubles psychiatriques (Fourier, Formaglio et al. 2018). Nous avons voulu poursuivre ce travail en déterminant la valeur seuil pour discriminer totalement les atteintes psychiatriques d'une plus grande cohorte de patients atteints de maladies neurodégénératives. Ce travail, actuellement en finalisation de rédaction, permettrait d'orienter les cliniciens dans le diagnostic différentiel entre pathologie psychiatrique et TNC.

La détermination de marqueurs quantitatifs du LCS a été finalisée par l'étude de la protéine TDP43 totale. Ce marqueur a montré de piètres performances diagnostiques pour discriminer nos 4 sous-groupes de patients (figure 43). La protéine TDP43 a montré un potentiel intérêt pour discriminer les patients atteints de pathologies du motoneurone des patients présentant une pathologie cognitive pure. Cependant, ces performances diagnostiques étaient inférieures à celles des neurofilaments dans cette indication. Ces résultats décevants pouvaient-ils être expliqués par la mauvaise spécificité des anticorps utilisés dans les kits de dosage de la protéine TDP43 (Feneberg, Gray et al. 2018) ? Nous nous sommes donc intéressés aux profils qualitatifs de la protéine TDP43 dans différentes matrices biologiques.

Le développement d'un essai reposant sur la technologie Simple Western a donc été réalisé, en comparaison du Western Blot considéré comme la méthode de référence. L'adaptation de la détermination des profils de la protéine TDP43 sur une technologie capillaire et automatisée présentait plusieurs avantages. Tout d'abord, cette technologie permettait de décupler le nombre d'échantillons et d'anticorps étudiés, tout en limitant les prises d'essai et la consommation des anticorps. Par ailleurs, toutes les conditions de l'essai étaient standardisées (de l'électrophorèse jusqu'à la détection par chimiluminescence), facilitant les comparaisons entre conditions analytiques. Une étude de la protéine TDP43 endogène provenant de 2 cultures cellulaires différentes mettait en évidence des profils protéiques comparables entre Simple Western et Western Blot, à l'exception d'un décalage des masses apparentes (figure 54). Ces résultats ont été confirmés en analysant ces protéines endogènes avec différents anticorps provenant d'espèces animales différentes ou présentant des épitopes différents.

La validation de l'essai Simple Western sur échantillons cérébraux bien caractérisés permettait de confirmer la concordance des résultats obtenus entre les 2 techniques. L'analyse des profils obtenus à l'aide de l'anticorps dirigé contre les sérines phosphorylées en position 409 et 410 (c'est-à-dire l'anticorps 22309-1-AP) mettait en évidence la forme totale de la protéine TDP43 associée à des formes tronquées de la protéine. Ces profils sont caractéristiques de ce que l'on observe dans les tissus cérébraux de patients porteurs d'inclusions de protéine TDP43 identifiées par immunohistochimie (Hasegawa, Arai et al. 2008, Okamoto, Fujita et al. 2015). Les bonnes performances de cet anticorps ont été par ailleurs décrites dans une étude inter-laboratoires portant sur l'analyse immunohistochimique de prélèvements cérébraux (Alafuzoff, Pikkarainen et al. 2015). De manière intéressante, un anticorps en cours de développement par la société AJ Roboscreen® (anticorps 2G10) mettait également en évidence des profils spécifiques pour les prélèvements de cortex frontal de patients présentant des inclusions de protéine TDP43 (figure 60).

L'essai Simple Western nouvellement validé a finalement été utilisé pour analyser les profils qualitatifs de la protéine TDP43 dans des matrices accessibles du vivant du patient. Les formes solubles (dans le LCS et le plasma) et les formes intracellulaires (dans les éléments figurés du sang) de la protéine TDP43 ont pu être comparées à l'aide des différents anticorps dirigés contre cette protéine. Les profils qualitatifs obtenus dans le LCS natif ne

mettaient pas en évidence de protéine TDP43 mais retrouvaient des bandes compatibles avec la présence d'albumine et d'immunoglobulines, deux protéines fortement concentrées dans ces deux matrices biologiques et probablement interférentes dans les signaux observés (figure 61). Malgré des procédés de concentration des échantillons (par précipitation ou par ultrafiltration), l'analyse du LCS ne permettait pas l'obtention d'un profil caractéristique de la protéine TDP43. Ce résultat était donc discordant par rapport à une étude de 2008 (Steinacker, Hendrich et al. 2008). Une raison suspectée pour expliquer cette différence étant la nature des prélèvements de LCS utilisés. Dans notre étude, les prélèvements de LCS étaient en effet préalablement centrifugés donc dépourvus d'éléments cellulaires. Ce manque de spécificité des anticorps a été retrouvé lors de l'étude des prélèvements plasmatiques : les profils obtenus mettaient principalement en évidence l'albumine et les immunoglobulines plasmatiques (figure 61). Néanmoins, l'analyse de cinq prélèvements plasmatiques - incluant 2 patients porteurs d'expansion *C9ORF72* - dont les concentrations en protéines totales étaient normalisées retrouvait une bande spécifique de très faible intensité avec les anticorps ayant précédemment démontré leur intérêt sur tissu cérébral (figure 64). Cette bande était plus intense chez les patients porteurs d'une expansion *C9ORF72*. Ces résultats mériteraient d'être approfondis en intégrant des cohortes plus grandes, bien établies sur le plan du diagnostic moléculaire. Par ailleurs, ces résultats illustrent l'importance de l'étude des profils qualitatifs dans les matrices biologiques, les anticorps actuellement disponibles se montrant trop peu spécifiques de la protéine TDP43. Le développement de nouveaux anticorps moins sensibles aux interférences avec l'albumine et les immunoglobulines semble indispensable. Leur spécificité pourrait ainsi être validée grâce à l'évaluation du profil de la protéine TDP43 dans le LCS ou le plasma grâce à la technique Simple Western. Seuls ces anticorps devraient ensuite être sélectionnés dans les kits de dosages quantitatifs de type ELISA pour réellement évaluer les performances diagnostiques de la protéine TDP43 comme potentiel marqueur étiologique des DLFT dans ces matrices périphériques.

Finalement, l'étude des profils de la protéine TDP43 des éléments figurés du sang s'est révélée capitale car elle permettait de s'affranchir du manque de spécificité des anticorps précédemment décrit. Les prélèvements plaquettaires présentaient un profil identique aux cultures cellulaires SH-SY5Y et HEK 293T et la masse moléculaire de la bande principale obtenue était similaire à celle obtenue pour les prélèvements cérébraux. Les performances semi-quantitatives de l'essai Simple Western, précédemment évaluées avec une solution de

protéine TDP43 recombinante (figure 52), ont été mises à profit pour comparer des échantillons plaquettaires de différents patients dont les numérations plaquettaires étaient préalablement normalisées. Des variations quantitatives ont été observées et étaient largement supérieures à la variabilité analytique de notre technique de dosage (figure 65). Cette matrice semble donc prometteuse pour évaluer des modifications quantitatives ou de profils de la protéine TDP43 intracellulaire (Fourier, Escal et al. 2018). Des études complémentaires sont maintenant nécessaires pour évaluer le potentiel intérêt diagnostique de la protéine TDP43 contenue dans ces prélèvements plaquettaires.

En conclusion, les seuls marqueurs biologiques des dégénérescences lobaires fronto-temporales actuellement validés à ce jour sont les marqueurs utilisés pour le diagnostic génétique de ces pathologies présentant une forte composante familiale. Dans ce travail, les outils de diagnostic moléculaire développés pour les variants sur les gènes *GRN* et *C9ORF72* se sont avérés performants pour constituer une cohorte de cas certains DLFT-TDP43. Il apparaît maintenant nécessaire de continuer à développer le diagnostic moléculaire pour les autres gènes à l'origine de cas familiaux de DLFT-TDP43 (*TARDBP* et *VCP* notamment), mais également pour les cas familiaux de DLFT-Tau (*MAPT*) et DLFT-FUS (*FUS*). Qu'en est-il des formes sporadiques ? L'analyse de biomarqueurs dans le LCS a permis de montrer de bonnes performances diagnostiques pour le ratio pTau/tTau et les neurofilaments. Cependant, ces marqueurs de dégénérescence neuronale (Tau totale) ou axonale (neurofilaments) ne sont pas spécifiques des DLFT et sont perturbés dans d'autres étiologies neurodégénératives. Le dosage de la protéine TDP43 semblerait donc être un meilleur marqueur étiologique des DLFT. Malheureusement, le dosage immunologique de cette protéine dans le LCS ou dans le plasma a montré des résultats limités pour le moment. Cette contre-performance pourrait probablement être expliquée par le manque de spécificité des anticorps actuellement disponibles sur le marché. Néanmoins, l'essai Simple Western développé dans ce travail avec l'anticorps 10782-2-AP a permis de détecter et de quantifier la protéine TDP43 intracellulaire présente dans les plaquettes. Une validation est maintenant nécessaire pour évaluer les performances de ce marqueur candidat dans le diagnostic étiologique des DLFT. Par ailleurs, l'utilisation de notre protocole utilisant cette plate-forme de screening à haut-débit permettrait l'évaluation de nouveaux anticorps plus spécifiques des formes solubles de la protéine TDP43.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alafuzoff, I., M. Pikkarainen, M. Neumann, T. Arzberger, S. Al-Sarraj, I. Bodi, N. Bogdanovic, O. Bugiani, I. Ferrer, E. Gelpi, S. Gentleman, G. Giaccone, M. B. Graeber, T. Hortobagyi, P. G. Ince, J. W. Ironside, N. Kavantzas, A. King, P. Korkolopoulou, G. G. Kovacs, D. Meyronet, C. Monoranu, T. Nilsson, P. Parchi, E. Patsouris, T. Revesz, W. Roggendorf, A. Rozemuller, D. Seilhean, N. Streichenberger, D. R. Thal, S. B. Wharton and H. Kretzschmar (2015). "Neuropathological assessments of the pathology in frontotemporal lobar degeneration with TDP43-positive inclusions: an inter-laboratory study by the BrainNet Europe consortium." J Neural Transm (Vienna) **122**(7): 957-972.

Albert, M. S., S. T. DeKosky, D. Dickson, B. Dubois, H. H. Feldman, N. C. Fox, A. Gamst, D. M. Holtzman, W. J. Jagust, R. C. Petersen, P. J. Snyder, M. C. Carrillo, B. Thies and C. H. Phelps (2011). "The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **7**(3): 270-279.

Alegria-Schaffer, A., A. Lodge and K. Vattem (2009). "Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection." Methods Enzymol **463**: 573-599.

Alzheimer's Disease International, A. (2015). World Alzheimer Report 2015. The global impact of dementia.

American Psychiatric Association, A. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Washington , DC.

Aoki, Y., R. Manzano, Y. Lee, R. Dafinca, M. Aoki, A. G. L. Douglas, M. A. Varela, C. Sathyaprakash, J. Scaber, P. Barbagallo, P. Vader, I. Mager, K. Ezzat, M. R. Turner, N. Ito, S. Gasco, N. Ohbayashi, S. El Andaloussi, S. Takeda, M. Fukuda, K. Talbot and M. J. A. Wood (2017). "C9orf72 and RAB7L1 regulate vesicle trafficking in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia." Brain **140**(4): 887-897.

Armstrong, R. A. and N. J. Cairns (2013). "Spatial patterns of the tau pathology in progressive supranuclear palsy." Neurol Sci **34**(3): 337-344.

Ash, P. E., K. F. Bieniek, T. F. Gendron, T. Caulfield, W. L. Lin, M. Dejesus-Hernandez, M. M. van Blitterswijk, K. Jansen-West, J. W. Paul, 3rd, R. Rademakers, K. B. Boylan, D. W. Dickson and L. Petrucelli (2013). "Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS." Neuron **77**(4): 639-646.

Ayala, Y. M., P. Zago, A. D'Ambrogio, Y. F. Xu, L. Petrucelli, E. Buratti and F. E. Baralle (2008). "Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43." J Cell Sci **121**(Pt 22): 3778-3785.

Bahia, V. S., L. T. Takada and V. Deramecourt (2013). "Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration: a review." Dement Neuropsychol **7**(1): 19-26.

Baker, M., I. R. Mackenzie, S. M. Pickering-Brown, J. Gass, R. Rademakers, C. Lindholm, J. Snowden, J. Adamson, A. D. Sadovnick, S. Rollinson, A. Cannon, E. Dwosh, D. Neary, S. Melquist, A. Richardson, D. Dickson, Z. Berger, J. Eriksen, T. Robinson, C. Zehr, C. A. Dickey, R. Crook, E. McGowan, D. Mann, B. Boeve, H. Feldman and M. Hutton (2006). "Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17." Nature **442**(7105): 916-919.

Balendra, R. and A. M. Isaacs (2018). "C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease." Nat Rev Neurol **14**(9): 544-558.

Barker, H. V., M. Niblock, Y. B. Lee, C. E. Shaw and J. M. Gallo (2017). "RNA Misprocessing in C9orf72-Linked Neurodegeneration." Front Cell Neurosci **11**: 195.

Barski, A., S. Cuddapah, K. Cui, T. Y. Roh, D. E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev and K. Zhao (2007). "High-resolution profiling of histone methylations in the human genome." Cell **129**(4): 823-837.

Bayer, T. A. (2015). "Proteinopathies, a core concept for understanding and ultimately treating degenerative disorders?" Eur Neuropsychopharmacol **25**(5): 713-724.

Beck, J., M. Poulter, D. Hensman, J. D. Rohrer, C. J. Mahoney, G. Adamson, T. Campbell, J. Uphill, A. Borg, P. Fratta, R. W. Orrell, A. Malaspina, J. Rowe, J. Brown, J. Hodges, K. Sidle, J. M. Polke, H. Houlden, J. M. Schott, N. C. Fox, M. N. Rossor, S. J. Tabrizi, A. M. Isaacs, J. Hardy, J. D. Warren, J. Collinge and S. Mead (2013). "Large C9orf72 hexanucleotide repeat expansions are seen in multiple neurodegenerative syndromes and are more frequent than expected in the UK population." Am J Hum Genet **92**(3): 345-353.

Beel, S., M. Moisse, M. Damme, L. De Muynck, W. Robberecht, L. Van Den Bosch, P. Saftig and P. Van Damme (2017). "Progranulin functions as a cathepsin D chaperone to stimulate axonal outgrowth in vivo." Hum Mol Genet **26**(15): 2850-2863.

Belzil, V. V., P. O. Bauer, M. Prudencio, T. F. Gendron, C. T. Stetler, I. K. Yan, L. Pregent, L. Daughrity, M. C. Baker, R. Rademakers, K. Boylan, T. C. Patel, D. W. Dickson and L. Petrucelli (2013). "Reduced C9orf72 gene expression in c9FTD/ALS is caused by histone trimethylation, an epigenetic event detectable in blood." Acta Neuropathol **126**(6): 895-905.

Bennion Callister, J. and S. M. Pickering-Brown (2014). "Pathogenesis/genetics of frontotemporal dementia and how it relates to ALS." Experimental Neurology **262**: 84-90.

Bibl, M., M. Gallus, V. Welge, H. Esselmann, S. Wolf, E. Ruther and J. Wiltfang (2012). "Cerebrospinal fluid amyloid-beta 2-42 is decreased in Alzheimer's, but not in frontotemporal dementia." J Neural Transm (Vienna) **119**(7): 805-813.

Bigio, E. H. (2013). "Making the diagnosis of frontotemporal lobar degeneration." Arch Pathol Lab Med **137**(3): 314-325.

Blennow, K. (2004). "Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease." NeuroRx **1**(2): 213-225.

Blennow, K., B. Dubois, A. M. Fagan, P. Lewczuk, M. J. de Leon and H. Hampel (2015). "Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **11**(1): 58-69.

Borroni, B., A. Benussi, S. Archetti, D. Galimberti, L. Parnetti, B. Nacmias, S. Sorbi, E. Scarpini and A. Padovani (2015). "Csf p-tau181/tau ratio as biomarker for TDP pathology in frontotemporal dementia." Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener **16**(1-2): 86-91.

Borroni, B., A. Benussi, E. Premi, A. Alberici, E. Marcello, F. Gardoni, M. Di Luca and A. Padovani (2018). "Biological, Neuroimaging, and Neurophysiological Markers in Frontotemporal Dementia: Three Faces of the Same Coin." J Alzheimers Dis **62**(3): 1113-1123.

Boutoleau-Bretonniere, C., T. Lebouvier and M. Vercelletto (2014). "[Frontal variant of frontotemporal dementia]." Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil **12**(1): 63-73.

Boutoleau-Bretonniere, C., M. Vercelletto and C. Thomas-Anterion (2013). "Behavioral troubles in bv-FTD: how to explore them ?." Rev Neuropsychol **5**(2): 119-128.

Brettschneider, J., K. Del Tredici, D. J. Irwin, M. Grossman, J. L. Robinson, J. B. Toledo, L. Fang, V. M. Van Deerlin, A. C. Ludolph, V. M. Lee, H. Braak and J. Q. Trojanowski (2014). "Sequential distribution of pTDP-43 pathology in behavioral variant frontotemporal dementia (bvFTD)." Acta Neuropathol **127**(3): 423-439.

Brettschneider, J., K. Del Tredici, J. B. Toledo, J. L. Robinson, D. J. Irwin, M. Grossman, E. Suh, V. M. Van Deerlin, E. M. Wood, Y. Baek, L. Kwong, E. B. Lee, L. Elman, L. McCluskey, L. Fang, S. Feldengut, A. C. Ludolph, V. M. Lee, H. Braak and J. Q. Trojanowski (2013). "Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis." Ann Neurol **74**(1): 20-38.

Brooks, B. R. (1994). "El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors." J Neurol Sci **124 Suppl**: 96-107.

Brunden, K. R., J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2009). "Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies." Nat Rev Drug Discov **8**(10): 783-793.

Budini, M., V. Romano, Z. Quadri, E. Buratti and F. E. Baralle (2015). "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**(1): 9-20.

Buee, L., T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, A. Delacourte and P. R. Hof (2000). "Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders." Brain Res Brain Res Rev **33**(1): 95-130.

Bukar Maina, M., Y. K. Al-Hilaly and L. C. Serpell (2016). "Nuclear Tau and Its Potential Role in Alzheimer's Disease." Biomolecules **6**(1): 9.

Buratti, E. (2018). "TDP-43 post-translational modifications in health and disease." Expert Opin Ther Targets **22**(3): 279-293.

Buratti, E. and F. E. Baralle (2008). "Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease." Front Biosci **13**: 867-878.

Buratti, E. and F. E. Baralle (2012). "TDP-43: gumming up neurons through protein-protein and protein-RNA interactions." Trends Biochem Sci **37**(6): 237-247.

Byrne, L. M., F. B. Rodrigues, K. Blennow, A. Durr, B. R. Leavitt, R. A. C. Roos, R. I. Scahill, S. J. Tabrizi, H. Zetterberg, D. Langbehn and E. J. Wild (2017). "Neurofilament light protein in blood as a potential biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a retrospective cohort analysis." Lancet Neurol **16**(8): 601-609.

Caso, F., M. L. Mandelli, M. Henry, B. Gesierich, B. M. Bettcher, J. Ogar, M. Filippi, G. Comi, G. Magnani, M. Sidhu, J. Q. Trojanowski, E. J. Huang, L. T. Grinberg, B. L. Miller, N. Dronkers, W. W. Seeley and M. L. Gorno-Tempini (2014). "In vivo signatures of nonfluent/agrammatic primary progressive aphasia caused by FTLD pathology." Neurology **82**(3): 239-247.

Cenik, B., C. F. Sephton, C. M. Dewey, X. Xian, S. Wei, K. Yu, W. Niu, G. Coppola, S. E. Coughlin, S. E. Lee, D. R. Dries, S. Almeida, D. H. Geschwind, F. B. Gao, B. L. Miller, R. V. Farese, Jr., B. A. Posner, G. Yu and J. Herz (2011). "Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) up-regulates progranulin

transcription: rational therapeutic approach to frontotemporal dementia." J Biol Chem **286**(18): 16101-16108.

Che, M. X., Y. J. Jiang, Y. Y. Xie, L. L. Jiang and H. Y. Hu (2011). "Aggregation of the 35-kDa fragment of TDP-43 causes formation of cytoplasmic inclusions and alteration of RNA processing." FASEB J **25**(7): 2344-2353.

Chen, J., Y. Kanai, N. J. Cowan and N. Hirokawa (1992). "Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons." Nature **360**(6405): 674-677.

Chen, J. Q., L. M. Wakefield and D. J. Goldstein (2015). "Capillary nano-immunoassays: advancing quantitative proteomics analysis, biomarker assessment, and molecular diagnostics." J Transl Med **13**: 182.

Chesser, A. S., S. M. Pritchard and G. V. Johnson (2013). "Tau clearance mechanisms and their possible role in the pathogenesis of Alzheimer disease." Front Neurol **4**: 122.

Chitramuthu, B. P., D. C. Baranowski, D. G. Kay, A. Bateman and H. P. Bennett (2010). "Progranulin modulates zebrafish motoneuron development in vivo and rescues truncation defects associated with knockdown of Survival motor neuron 1." Mol Neurodegener **5**: 41.

Cleary, E. M., S. Pal, T. Azam, D. J. Moore, R. Swingler, G. Gorrie, L. Stephenson, S. Colville, S. Chandran, M. Porteous and J. P. Warner (2016). "Improved PCR based methods for detecting C9orf72 hexanucleotide repeat expansions." Mol Cell Probes **30**(4): 218-224.

Clinton, L. K., M. Blurton-Jones, K. Myczek, J. Q. Trojanowski and F. M. LaFerla (2010). "Synergistic Interactions between Abeta, tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline." J Neurosci **30**(21): 7281-7289.

Cooper-Knock, J., M. J. Walsh, A. Higginbottom, J. Robin Highley, M. J. Dickman, D. Edbauer, P. G. Ince, S. B. Wharton, S. A. Wilson, J. Kirby, G. M. Hautbergue and P. J. Shaw (2014). "Sequestration of multiple RNA recognition motif-containing proteins by C9orf72 repeat expansions." Brain **137**(Pt 7): 2040-2051.

Coyle-Gilchrist, I. T., K. M. Dick, K. Patterson, P. Vazquez Rodriquez, E. Wehmann, A. Wilcox, C. J. Lansdall, K. E. Dawson, J. Wiggins, S. Mead, C. Brayne and J. B. Rowe (2016). "Prevalence, characteristics, and survival of frontotemporal lobar degeneration syndromes." Neurology **86**(18): 1736-1743.

Cruts, M., I. Gijselinck, J. van der Zee, S. Engelborghs, H. Wils, D. Pirici, R. Rademakers, R. Vandenberghe, B. Dermaut, J. J. Martin, C. van Duijn, K. Peeters, R. Sciot, P. Santens, T. De Pooter, M. Mattheijssens, M. Van den Broeck, I. Cuijt, K. Vennekens, P. P. De Deyn, S. Kumar-Singh and C. Van Broeckhoven (2006). "Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21." Nature **442**(7105): 920-924.

Cruts, M., J. Theuns and C. Van Broeckhoven (2012). "Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases." Hum Mutat **33**(9): 1340-1344.

Dahm, R. (2006). "Alzheimer's discovery." Curr Biol **16**(21): R906-910.

Dale, J. M. and M. L. Garcia (2012). "Neurofilament Phosphorylation during Development and Disease: Which Came First, the Phosphorylation or the Accumulation?" J Amino Acids **2012**: 382107.

de Mendonca, A., F. Ribeiro, M. Guerreiro and C. Garcia (2004). "Frontotemporal mild cognitive impairment." J Alzheimers Dis **6**(1): 1-9.

De Muynck, L. and P. Van Damme (2011). "Cellular effects of progranulin in health and disease." J Mol Neurosci **45**(3): 549-560.

DeJesus-Hernandez, M., I. R. Mackenzie, B. F. Boeve, A. L. Boxer, M. Baker, N. J. Rutherford, A. M. Nicholson, N. A. Finch, H. Flynn, J. Adamson, N. Kouri, A. Wojtas, P. Sengdy, G. Y. Hsiung, A. Karydas, W. W. Seeley, K. A. Josephs, G. Coppola, D. H. Geschwind, Z. K. Wszolek, H. Feldman, D. S. Knopman, R. C. Petersen, B. L. Miller, D. W. Dickson, K. B. Boylan, N. R. Graff-Radford and R. Rademakers (2011). "Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS." Neuron **72**(2): 245-256.

Dickson, D. W., N. Kouri, M. E. Murray and K. A. Josephs (2011). "Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-tau (FTLD-tau)." J Mol Neurosci **45**(3): 384-389.

Disanto, G., C. Barro, P. Benkert, Y. Naegelin, S. Schadelin, A. Giardiello, C. Zecca, K. Blennow, H. Zetterberg, D. Leppert, L. Kappos, C. Gobbi, J. Kuhle and G. Swiss Multiple Sclerosis Cohort Study (2017). "Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis." Ann Neurol **81**(6): 857-870.

Dixit, R., J. L. Ross, Y. E. Goldman and E. L. Holzbaur (2008). "Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau." Science **319**(5866): 1086-1089.

Dols-Icardo, O., M. Suarez-Calvet, I. Hernandez, G. Amer, S. Anton-Aguirre, D. Alcolea, J. Fortea, M. Boada, L. Tarraga, R. Blesa, A. Lleo and J. Clarimon (2012). "Expansion mutation in C9ORF72 does not influence plasma progranulin levels in frontotemporal dementia." Neurobiol Aging **33**(8): 1851 e1817-1859.

Dormann, D., A. Capell, A. M. Carlson, S. S. Shankaran, R. Rodde, M. Neumann, E. Kremmer, T. Matsuwaki, K. Yamanouchi, M. Nishihara and C. Haass (2009). "Proteolytic processing of TAR DNA binding protein-43 by caspases produces C-terminal fragments with disease defining properties independent of progranulin." J Neurochem **110**(3): 1082-1094.

Dormann, D. and C. Haass (2011). "TDP-43 and FUS: a nuclear affair." Trends Neurosci **34**(7): 339-348.

Dreyer, M. (2012). SVT Term (spécialités).

Ebbert, M. T. W., S. L. Farrugia, J. P. Sens, K. Jansen-West, T. F. Gendron, M. Prudencio, I. J. McLaughlin, B. Bowman, M. Seetin, M. DeJesus-Hernandez, J. Jackson, P. H. Brown, D. W. Dickson, M. van Blitterswijk, R. Rademakers, L. Petrucelli and J. D. Fryer (2018). "Long-read sequencing across the C9orf72 'GGGGCC' repeat expansion: implications for clinical use and genetic discovery efforts in human disease." Mol Neurodegener **13**(1): 46.

Engelhardt, E. and M. D. M. Gomes (2017). "Lewy and his inclusion bodies: Discovery and rejection." Dement Neuropsychol **11**(2): 198-201.

Felician, O., L. Koric and N. Rochefort (2009). "[Corticobasal degeneration: clinical and neuropsychological profile]." Psychol Neuropsychiatr Vieil **7**(2): 91-100.

Feneberg, E., E. Gray, O. Ansorge, K. Talbot and M. R. Turner (2018). "Towards a TDP-43-Based Biomarker for ALS and FTLD." Mol Neurobiol **55**(10): 7789-7801.

Feneberg, E., P. Steinacker, S. Lehnert, A. Schneider, P. Walther, D. R. Thal, M. Linsenmeier, A. C. Ludolph and M. Otto (2014). "Limited role of free TDP-43 as a diagnostic tool in neurodegenerative diseases." Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener **15**(5-6): 351-356.

Ferrari, R., D. Kapogiannis, E. D. Huey and P. Momeni (2011). "FTD and ALS: a tale of two diseases." Curr Alzheimer Res **8**(3): 273-294.

Filiano, A. J., L. H. Martens, A. H. Young, B. A. Warmus, P. Zhou, G. Diaz-Ramirez, J. Jiao, Z. Zhang, E. J. Huang, F. B. Gao, R. V. Farese, Jr. and E. D. Roberson (2013). "Dissociation of frontotemporal dementia-related deficits and neuroinflammation in progranulin haploinsufficient mice." J Neurosci **33**(12): 5352-5361.

Finch, N., M. Baker, R. Crook, K. Swanson, K. Kuntz, R. Surtees, G. Bisceglio, A. Rovelet-Lecrux, B. Boeve, R. C. Petersen, D. W. Dickson, S. G. Younkin, V. Deramecourt, J. Crook, N. R. Graff-Radford and R. Rademakers (2009). "Plasma progranulin levels predict progranulin mutation status in frontotemporal dementia patients and asymptomatic family members." Brain **132**(Pt 3): 583-591.

Forman, M. S., J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2004). "Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs." Nat Med **10**(10): 1055-1063.

Foulds, P. G., Y. Davidson, M. Mishra, D. J. Hobson, K. M. Humphreys, M. Taylor, N. Johnson, S. Weintraub, H. Akiyama, T. Arai, M. Hasegawa, E. H. Bigio, F. E. Benson, D. Allsop and D. M. Mann (2009). "Plasma phosphorylated-TDP-43 protein levels correlate with brain pathology in frontotemporal lobar degeneration." Acta Neuropathol **118**(5): 647-658.

Fourier, A., A. Dorey, A. Perret-Liaudet and I. Quadrio (2018). "Detection of CSF 14-3-3 Protein in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Patients Using a New Automated Capillary Western Assay." Mol Neurobiol **55**(4): 3537-3545.

Fourier, A., J. Escal, E. Bernard, I. Lachman, A. Perret-Liaudet, P. Leblanc and I. Quadrio (2018). "Development of an automated capillary nano-immunoassay-Simple Western assay-to quantify total TDP43 protein in human platelet samples." Anal Bioanal Chem.

Fourier, A., M. Formaglio, H. Mollion, A. Perret-Liaudet, M. Sauvée and I. Quadrio (2018). "Efficacité des biomarqueurs du LCR pour discriminer les troubles psychiatriques primaires des dégénérescences lobaires fronto-temporales (DLFT)." Revue Neurologique **174**: S9.

Fourier, A., M. Formaglio, M. Sauvee, A. Perret-Liaudet, P. Latour, M. Bost and I. Quadrio (2018). "C9orf72 Protein Plasmatic Concentrations Are Similar between C9ORF72 Expansion Carriers and Noncarriers in Frontotemporal Dementia." Dement Geriatr Cogn Disord **46**(3-4): 180-185.

Fratta, P., S. Mizielinska, A. J. Nicoll, M. Zloh, E. M. Fisher, G. Parkinson and A. M. Isaacs (2012). "C9orf72 hexanucleotide repeat associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia forms RNA G-quadruplexes." Sci Rep **2**: 1016.

Freibaum, B. D., R. K. Chitta, A. A. High and J. P. Taylor (2010). "Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery." J Proteome Res **9**(2): 1104-1120.

Freibaum, B. D. and J. P. Taylor (2017). "The Role of Dipeptide Repeats in C9ORF72-Related ALS-FTD." Front Mol Neurosci **10**: 35.

Fuentealba, R. A., M. Udan, S. Bell, I. Wegorzewska, J. Shao, M. I. Diamond, C. C. Weihl and R. H. Baloh (2010). "Interaction with polyglutamine aggregates reveals a Q/N-rich domain in TDP-43." J Biol Chem **285**(34): 26304-26314.

Furukawa, Y., K. Kaneko and N. Nukina (2011). "Molecular properties of TAR DNA binding protein-43 fragments are dependent upon its cleavage site." Biochim Biophys Acta **1812**(12): 1577-1583.

Gaiani, A., I. Martinelli, L. Bello, G. Querin, M. Puthenparampil, S. Ruggero, E. Toffanin, A. Cagnin, C. Briani, E. Pegoraro and G. Soraru (2017). "Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Neurofilament Light Chain Levels in Definite Subtypes of Disease." JAMA Neurol **74**(5): 525-532.

Galimberti, D., G. G. Fumagalli, C. Fenoglio, S. M. G. Cioffi, A. Arighi, M. Serpente, B. Borroni, A. Padovani, F. Tagliavini, M. Masellis, M. C. Tartaglia, J. van Swieten, L. Meeter, C. Graff, A. de Mendonca, M. Bocchetta, J. D. Rohrer, E. Scarpini and F. T. D. I. Genetic (2018). "Progranulin plasma levels predict the presence of GRN mutations in asymptomatic subjects and do not correlate with brain atrophy: results from the GENFI study." Neurobiol Aging **62**: 245 e249-245 e212.

Gao, F. B., S. Almeida and R. Lopez-Gonzalez (2017). "Dysregulated molecular pathways in amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia spectrum disorder." EMBO J **36**(20): 2931-2950.

Gendron, T. F., J. Chew, J. N. Stankowski, L. R. Hayes, Y. J. Zhang, M. Prudencio, Y. Carlomagno, L. M. Daughrity, K. Jansen-West, E. A. Perkerson, A. O'Raw, C. Cook, L. Pregent, V. Belzil, M. van Blitterswijk, L. J. Tabassian, C. W. Lee, M. Yue, J. Tong, Y. Song, M. Castanedes-Casey, L. Rousseau, V. Phillips, D. W. Dickson, R. Rademakers, J. D. Fryer, B. K. Rush, O. Pedraza, A. M. Caputo, P. Desaro, C. Palmucci, A. Robertson, M. G. Heckman, N. N. Diehl, E. Wiggs, M. Tierney, L. Braun, J. Farren, D. Lacomis, S. Ladha, C. N. Fournier, L. F. McCluskey, L. B. Elman, J. B. Toledo, J. D. McBride, C. Tiloca, C. Morelli, B. Poletti, F. Solca, A. Prelle, J. Wuu, J. Jockel-Balsarotti, F. Rigo, C. Ambrose, A. Datta, W. Yang, D. Raitcheva, G. Antognetti, A. McCampbell, J. C. Van Swieten, B. L. Miller, A. L. Boxer, R. H. Brown, R. Bowser, T. M. Miller, J. Q. Trojanowski, M. Grossman, J. D. Berry, W. T. Hu, A. Ratti, B. J. Traynor, M. D. Disney, M. Benatar, V. Silani, J. D. Glass, M. K. Floeter, J. D. Rothstein, K. B. Boylan and L. Petrucelli (2017). "Poly(GP) proteins are a useful pharmacodynamic marker for C9ORF72-associated amyotrophic lateral sclerosis." Sci Transl Med **9**(383).

Gendron, T. F. and L. Petrucelli (2018). "Disease Mechanisms of C9ORF72 Repeat Expansions." Cold Spring Harb Perspect Med **8**(4).

Gendron, T. F., M. van Blitterswijk, K. F. Bieniek, L. M. Daughrity, J. Jiang, B. K. Rush, O. Pedraza, J. A. Lucas, M. E. Murray, P. Desaro, A. Robertson, K. Overstreet, C. S. Thomas, J. E. Crook, M. Castanedes-Casey, L. Rousseau, K. A. Josephs, J. E. Parisi, D. S. Knopman, R. C. Petersen, B. F. Boeve, N. R. Graff-Radford, R. Rademakers, C. Lagier-Tourenne, D. Edbauer, D. W. Cleveland, D. W. Dickson, L. Petrucelli and K. B. Boylan (2015). "Cerebellar c9RAN proteins associate with clinical and neuropathological characteristics of C9ORF72 repeat expansion carriers." Acta Neuropathol **130**(4): 559-573.

Geser, F., D. Prvulovic, L. O'Dwyer, O. Hardiman, P. Bede, A. L. Bokde, J. Q. Trojanowski and H. Hampel (2011). "On the development of markers for pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia." Prog Neurobiol **95**(4): 649-662.

Ghetti, B., A. L. Oblak, B. F. Boeve, K. A. Johnson, B. C. Dickerson and M. Goedert (2015). "Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging." Neuropathol Appl Neurobiol **41**(1): 24-46.

Ghidoni, R., L. Benussi, M. Glionna, M. Franzoni and G. Binetti (2008). "Low plasma progranulin levels predict progranulin mutations in frontotemporal lobar degeneration." Neurology **71**(16): 1235-1239.

Ghidoni, R., A. Paterlini and L. Benussi (2012). "Circulating progranulin as a biomarker for neurodegenerative diseases." Am J Neurodegener Dis **1**(2): 180-190.

Ghidoni, R., E. Stoppani, G. Rossi, E. Piccoli, V. Albertini, A. Paterlini, M. Glionna, E. Pegoiani, L. F. Agnati, C. Fenoglio, E. Scarpini, D. Galimberti, M. Morbin, F. Tagliavini, G. Binetti and L. Benussi (2012). "Optimal plasma progranulin cutoff value for predicting null progranulin mutations in neurodegenerative diseases: a multicenter Italian study." Neurodegener Dis **9**(3): 121-127.

Ghosh, R., J. E. Gilda and A. V. Gomes (2014). "The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots." Expert Rev Proteomics **11**(5): 549-560.

Gijselinck, I., T. Van Langenhove, J. van der Zee, K. Sleegers, S. Philtjens, G. Kleinberger, J. Janssens, K. Bettens, C. Van Cauwenberghe, S. Pereson, S. Engelborghs, A. Sieben, P. De Jonghe, R. Vandenberghe, P. Santens, J. De Bleecker, G. Maes, V. Baumer, L. Dillen, G. Joris, I. Cuijt, E. Corsmit, E. Elinck, J. Van Dongen, S. Vermeulen, M. Van den Broeck, C. Vaerenberg, M. Mattheijssens, K. Peeters, W. Robberecht, P. Cras, J. J. Martin, P. P. De Deyn, M. Cruts and C. Van Broeckhoven (2012). "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**(1): 54-65.

Gijselinck, I., S. Van Mossevelde, J. van der Zee, A. Sieben, S. Engelborghs, J. De Bleecker, A. Ivanoiu, O. Deryck, D. Edbauer, M. Zhang, B. Heeman, V. Baumer, M. Van den Broeck, M. Mattheijssens, K. Peeters, E. Rogaeva, P. De Jonghe, P. Cras, J. J. Martin, P. P. de Deyn, M. Cruts and C. Van Broeckhoven (2016). "The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter." Mol Psychiatry **21**(8): 1112-1124.

Goedert, M., M. G. Spillantini, M. C. Potier, J. Ulrich and R. A. Crowther (1989). "Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain." EMBO J **8**(2): 393-399.

Gomez-Deza, J., Y. B. Lee, C. Troakes, M. Nolan, S. Al-Sarraj, J. M. Gallo and C. E. Shaw (2015). "Dipeptide repeat protein inclusions are rare in the spinal cord and almost absent from motor neurons in C9ORF72 mutant amyotrophic lateral sclerosis and are unlikely to cause their degeneration." Acta Neuropathol Commun **3**: 38.

Goossens, J., M. Bjerke, S. Van Mossevelde, T. Van den Bossche, J. Goeman, B. De Vil, A. Sieben, J. J. Martin, P. Cras, P. P. De Deyn, C. Van Broeckhoven, J. van der Zee and S. Engelborghs (2018). "Diagnostic value of cerebrospinal fluid tau, neurofilament, and progranulin in definite frontotemporal lobar degeneration." Alzheimers Res Ther **10**(1): 31.

Goossens, J., E. Vanmechelen, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, C. Van Broeckhoven, J. van der Zee and S. Engelborghs (2015). "TDP-43 as a possible biomarker for frontotemporal lobar degeneration: a systematic review of existing antibodies." Acta Neuropathol Commun **3**: 15.

Gorno-Tempini, M. L., A. E. Hillis, S. Weintraub, A. Kertesz, M. Mendez, S. F. Cappa, J. M. Ogar, J. D. Rohrer, S. Black, B. F. Boeve, F. Manes, N. F. Dronkers, R. Vandenberghe, K. Rascovsky, K. Patterson, B. L. Miller, D. S. Knopman, J. R. Hodges, M. M. Mesulam and M. Grossman (2011). "Classification of primary progressive aphasia and its variants." Neurology **76**(11): 1006-1014.

Grasset, L., C. Brayne, P. Joly, H. Jacqmin-Gadda, K. Peres, A. Foubert-Samier, J. F. Dartigues and C. Helmer (2016). "Trends in dementia incidence: Evolution over a 10-year period in France." Alzheimers Dement **12**(3): 272-280.

Green, K. M., A. E. Linsalata and P. K. Todd (2016). "RAN translation-What makes it run?" Brain Res **1647**: 30-42.

Grossman, M. (2012). "The non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia." Lancet Neurol **11**(6): 545-555.

Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski and L. I. Binder (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(13): 4913-4917.

Gu, J., W. Wang, S. Miao, F. Chen, F. Wu, W. Hu, K. Iqbal, C. X. Gong and F. Liu (2018). "Protein Phosphatase 1 dephosphorylates TDP-43 and suppresses its function in tau exon 10 inclusion." FEBS Lett **592**(3): 402-410.

Guan, Y., Q. Zhu, D. Huang, S. Zhao, L. Jan Lo and J. Peng (2015). "An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide." Sci Rep **5**: 13370.

Guedes, A. C. B., R. Santin, A. S. R. Costa, K. C. Reiter, A. Hilbig and L. L. Fernandez (2017). "Distinct Phospho-TDP-43 brain distribution in two cases of FTD, one associated with ALS." Dement Neuropsychol **11**(3): 249-254.

Hasegawa, M., T. Arai, T. Nonaka, F. Kametani, M. Yoshida, Y. Hashizume, T. G. Beach, E. Buratti, F. Baralle, M. Morita, I. Nakano, T. Oda, K. Tsuchiya and H. Akiyama (2008). "Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." Ann Neurol **64**(1): 60-70.

Hassan, A., J. L. Whitwell and K. A. Josephs (2011). "The corticobasal syndrome-Alzheimer's disease conundrum." Expert Rev Neurother **11**(11): 1569-1578.

Hebert, R. and C. Brayne (1995). "Epidemiology of vascular dementia." Neuroepidemiology **14**(5): 240-257.

Henry, M. L. and M. L. Gorno-Tempini (2010). "The logopenic variant of primary progressive aphasia." Curr Opin Neurol **23**(6): 633-637.

Hodges, J. R., R. R. Davies, J. H. Xuereb, B. Casey, M. Broe, T. H. Bak, J. J. Kril and G. M. Halliday (2004). "Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia." Ann Neurol **56**(3): 399-406.

Hong, M., V. Zhukareva, V. Vogelsberg-Ragaglia, Z. Wszolek, L. Reed, B. I. Miller, D. H. Geschwind, T. D. Bird, D. McKeel, A. Goate, J. C. Morris, K. C. Wilhelmsen, G. D. Schellenberg, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (1998). "Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17." Science **282**(5395): 1914-1917.

Hosokawa, M., T. Arai, M. Yamashita, H. Tsuji, T. Nonaka, M. Masuda-Suzukake, A. Tamaoka, M. Hasegawa and H. Akiyama (2014). "Differential diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis from Guillain-Barre syndrome by quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid." Int J Neurosci **124**(5): 344-349.

Hu, W. T., K. Watts, M. Grossman, J. Glass, J. J. Lah, C. Hales, M. Shelnutt, V. Van Deerlin, J. Q. Trojanowski and A. I. Levey (2013). "Reduced CSF p-Tau181 to Tau ratio is a biomarker for FTLD-TDP." Neurology **81**(22): 1945-1952.

Huang, C. C., J. K. Bose, P. Majumder, K. H. Lee, J. T. Huang, J. K. Huang and C. K. Shen (2014). "Metabolism and mis-metabolism of the neuropathological signature protein TDP-43." J Cell Sci **127**(Pt 14): 3024-3038.

Hug, N., D. Longman and J. F. Caceres (2016). "Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway." Nucleic Acids Res **44**(4): 1483-1495.

Hutton, M., C. L. Lendon, P. Rizzu, M. Baker, S. Froelich, H. Houlden, S. Pickering-Brown, S. Chakraverty, A. Isaacs, A. Grover, J. Hackett, J. Adamson, S. Lincoln, D. Dickson, P. Davies, R. C. Petersen, M. Stevens, E. de Graaff, E. Wauters, J. van Baren, M. Hillebrand, M. Joosse, J. M. Kwon, P. Nowotny, L. K. Che, J. Norton, J. C. Morris, L. A. Reed, J. Trojanowski, H. Basun, L. Lannfelt, M. Neystat, S. Fahn, F. Dark, T. Tannenberg, P. R. Dodd, N. Hayward, J. B. Kwok, P. R. Schofield, A. Andreadis, J. Snowden, D. Craufurd, D. Neary, F. Owen, B. A. Oostra, J. Hardy, A. Goate, J. van Swieten, D. Mann, T. Lynch and P. Heutink (1998). "Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17." Nature **393**(6686): 702-705.

Ikeda, K. and K. Tsuchiya (2004). "Motor neuron disease group accompanied by inclusions of unidentified protein signaled by ubiquitin." Neuropathology **24**(2): 117-124.

Iqbal, K., C. Alonso Adel, S. Chen, M. O. Chohan, E. El-Akkad, C. X. Gong, S. Khatoon, B. Li, F. Liu, A. Rahman, H. Tanimukai and I. Grundke-Iqbal (2005). "Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies." Biochim Biophys Acta **1739**(2-3): 198-210.

Irwin, D. J., N. J. Cairns, M. Grossman, C. T. McMillan, E. B. Lee, V. M. Van Deerlin, V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2015). "Frontotemporal lobar degeneration: defining phenotypic diversity through personalized medicine." Acta Neuropathol **129**(4): 469-491.

Irwin, D. J., J. Q. Trojanowski and M. Grossman (2013). "Cerebrospinal fluid biomarkers for differentiation of frontotemporal lobar degeneration from Alzheimer's disease." Front Aging Neurosci **5**: 6.

Jack, C. R., Jr., D. A. Bennett, K. Blennow, M. C. Carrillo, B. Dunn, S. B. Haeberlein, D. M. Holtzman, W. Jagust, F. Jessen, J. Karlawish, E. Liu, J. L. Molinuevo, T. Montine, C. Phelps, K. P. Rankin, C. C. Rowe, P. Scheltens, E. Siemers, H. M. Snyder, R. Sperling and Contributors (2018). "NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **14**(4): 535-562.

Josephs, K. A. (2007). "Frontotemporal lobar degeneration." Neurol Clin **25**(3): 683-696, vi.

Josephs, K. A., J. R. Hodges, J. S. Snowden, I. R. Mackenzie, M. Neumann, D. M. Mann and D. W. Dickson (2011). "Neuropathological background of phenotypical variability in frontotemporal dementia." Acta Neuropathol **122**(2): 137-153.

Jucker, M. and L. C. Walker (2013). "Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases." Nature **501**(7465): 45-51.

Junttila, A., M. Kuvaja, P. Hartikainen, M. Siloaho, S. Helisalmi, V. Moilanen, A. Kiviharju, L. Jansson, P. J. Tienari, A. M. Remes and S. K. Herukka (2016). "Cerebrospinal Fluid TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients with and without the C9ORF72 Hexanucleotide Expansion." Dement Geriatr Cogn Dis Extra **6**(1): 142-149.

Kabashi, E., P. N. Valdmanis, P. Dion, D. Spiegelman, B. J. McConkey, C. Vande Velde, J. P. Bouchard, L. Lacomblez, K. Pochigaeva, F. Salachas, P. F. Pradat, W. Camu, V. Meininger, N. Dupre and G. A. Rouleau (2008). "TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis." Nat Genet **40**(5): 572-574.

Kametani, F., T. Nonaka, T. Suzuki, T. Arai, N. Dohmae, H. Akiyama and M. Hasegawa (2009). "Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43." Biochem Biophys Res Commun **382**(2): 405-409.

Kanouchi, T., T. Ohkubo and T. Yokota (2012). "Can regional spreading of amyotrophic lateral sclerosis motor symptoms be explained by prion-like propagation?" J Neurol Neurosurg Psychiatry **83**(7): 739-745.

Kasai, T., T. Tokuda, N. Ishigami, H. Sasayama, P. Foulds, D. J. Mitchell, D. M. Mann, D. Allsop and M. Nakagawa (2009). "Increased TDP-43 protein in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis." Acta Neuropathol **117**(1): 55-62.

Kimura, T., D. J. Whitcomb, J. Jo, P. Regan, T. Piers, S. Heo, C. Brown, T. Hashikawa, M. Murayama, H. Seok, I. Sotiropoulos, E. Kim, G. L. Collingridge, A. Takashima and K. Cho (2014). "Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **369**(1633): 20130144.

Klein, C. and A. Westenberger (2012). "Genetics of Parkinson's disease." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(1): a008888.

Kohli, M. A., K. John-Williams, R. Rajbhandary, A. Naj, P. Whitehead, K. Hamilton, R. M. Carney, C. Wright, E. Crocco, H. E. Gwirtzman, R. Lang, G. Beecham, E. R. Martin, J. Gilbert, M. Benatar, G. W. Small, D. Mash, G. Byrd, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance and S. Zuchner (2013). "Repeat expansions in the C9ORF72 gene contribute to Alzheimer's disease in Caucasians." Neurobiol Aging **34**(5): 1519 e1515-1512.

Koller, A. and H. Watzig (2005). "Precision and variance components in quantitative gel electrophoresis." Electrophoresis **26**(12): 2470-2475.

Kovacs, G. G. (2014). Neuropathology of Neurodegenerative Diseases: A Practical Guide., Cambridge: Cambridge University Press.

Kovacs, G. G. (2016). "Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine." Int J Mol Sci **17**(2).

Kovacs, G. G., A. J. Rozemuller, J. C. van Swieten, E. Gelpi, K. Majtenyi, S. Al-Sarraj, C. Troakes, I. Bodi, A. King, T. Hortobagyi, M. M. Esiri, O. Ansorge, G. Giaccone, I. Ferrer, T. Arzberger, N. Bogdanovic, T. Nilsson, I. Leisser, I. Alafuzoff, J. W. Ironside, H. Kretzschmar and H. Budka (2013). "Neuropathology of the hippocampus in FTLD-Tau with Pick bodies: a study of the BrainNet Europe Consortium." Neuropathol Appl Neurobiol **39**(2): 166-178.

Kraus-Perrotta, C. and S. Lagalwar (2016). "Expansion, mosaicism and interruption: mechanisms of the CAG repeat mutation in spinocerebellar ataxia type 1." Cerebellum Ataxias **3**: 20.

Krolak-Salmon, P., B. Dubois, F. Sellal, J. P. Delabrousse-Mayoux, P. Vandel, H. Amieva, C. Jeandel, S. Andrieu and A. Perret-Liaudet (2018). "France Will No More Reimburse Available Symptomatic Drugs Against Alzheimer's Disease." J Alzheimers Dis **66**(2): 425-427.

Krolak-Salmon, P., L. Letrilliart, M. Ceccaldi, S. Andrieu, O. Guerin, B. Dubois, B. Brochet, P. Vandel, C. Jeandel, A. Leperre-Desplanques, M. Clanet and P. L. Druais (2018). "[Towards a national strategy on the diagnosis of neurocognitive disorders. A shared approach among the French National College of General Practitioners and specialists of neurocognitive disorders]." Presse Med **47**(1): 75-83.

Kuiperij, H. B., A. A. Versleijen, M. Beenes, N. A. Verwey, L. Benussi, A. Paterlini, G. Binetti, C. E. Teunissen, J. Raaphorst, H. J. Schelhaas, B. Kusters, Y. A. Pijnenburg, R. Ghidoni and M. M. Verbeek (2017). "Tau Rather than TDP-43 Proteins are Potential Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Frontotemporal Lobar Degeneration Subtypes: A Pilot Study." J Alzheimers Dis **55**(2): 585-595.

Kumar-Singh, S. (2011). "Progranulin and TDP-43: mechanistic links and future directions." J Mol Neurosci **45**(3): 561-573.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Landin-Romero, R., R. Tan, J. R. Hodges and F. Kumfor (2016). "An update on semantic dementia: genetics, imaging, and pathology." Alzheimers Res Ther **8**(1): 52.

Le Ber, I. (2013). "Genetics of frontotemporal lobar degeneration: an up-date and diagnosis algorithm." Rev Neurol (Paris) **169**(10): 811-819.

Le Ber, I., A. Camuzat, L. Guillot-Noel, D. Hannequin, L. Lacomblez, V. Golfier, M. Puel, O. Martinaud, V. Deramecourt, S. Rivaud-Pechoux, S. Millecamps, M. Vercelletto, P. Couratier, F. Sellal, F. Pasquier, F. Salachas, C. Thomas-Anterion, M. Didic, J. Pariente, D. Seilhean, M. Ruberg, I. Wargon, F. Blanc, W. Camu, B. F. Michel, E. Berger, M. Sauvee, C. Thauvin-Robinet, K. Mondon, E. Tournier-Lasserve, C. Goizet, M. Fleury, G. Viennet, P. Verpillat, V. Meininger, C. Duyckaerts, B. Dubois and A. Brice (2013). "C9ORF72 repeat expansions in the frontotemporal dementias spectrum of diseases: a flow-chart for genetic testing." J Alzheimers Dis **34**(2): 485-499.

Le Ber, I., A. Camuzat, D. Hannequin, F. Pasquier, E. Guedj, A. Rovelet-Lecrux, V. Hahn-Barma, J. van der Zee, F. Clot, S. Bakchine, M. Puel, M. Ghanim, L. Lacomblez, J. Mikol, V. Deramecourt, P. Lejeune, V. de la Sayette, S. Belliard, M. Vercelletto, C. Meyrignac, C. Van Broeckhoven, J. C. Lambert, P. Verpillat, D. Campion, M. O. Habert, B. Dubois, A. Brice and F. F.-M. French research network on (2008). "Phenotype variability in progranulin mutation carriers: a clinical, neuropsychological, imaging and genetic study." Brain **131**(Pt 3): 732-746.

Lee, E. B., S. Porta, G. Michael Baer, Y. Xu, E. Suh, L. K. Kwong, L. Elman, M. Grossman, V. M. Lee, D. J. Irwin, V. M. Van Deerlin and J. Q. Trojanowski (2017). "Expansion of the classification of FTLD-TDP: distinct pathology associated with rapidly progressive frontotemporal degeneration." Acta Neuropathol **134**(1): 65-78.

Lee, S. J., H. S. Lim, E. Masliah and H. J. Lee (2011). "Protein aggregate spreading in neurodegenerative diseases: problems and perspectives." Neurosci Res **70**(4): 339-348.

Lee, Y. B., P. Baskaran, J. Gomez-Deza, H. J. Chen, A. L. Nishimura, B. N. Smith, C. Troakes, Y. Adachi, A. Stepto, L. Petrucelli, J. M. Gallo, F. Hirth, B. Rogelj, S. Guthrie and C. E. Shaw (2017). "C9orf72 poly GA RAN-translated protein plays a key role in amyotrophic lateral sclerosis via aggregation and toxicity." Hum Mol Genet **26**(24): 4765-4777.

Lehmer, C., P. Oeckl, J. H. Weishaupt, A. E. Volk, J. Diehl-Schmid, M. L. Schroeter, M. Lauer, J. Kornhuber, J. Levin, K. Fassbender, B. Landwehrmeyer, D. German Consortium for Frontotemporal Lobar, M. H. Schludi, T. Arzberger, E. Kremmer, A. Flatley, R. Feederle, P. Steinacker, P. Weydt, A. C.

Ludolph, D. Edbauer and M. Otto (2017). "Poly-GP in cerebrospinal fluid links C9orf72-associated dipeptide repeat expression to the asymptomatic phase of ALS/FTD." EMBO Mol Med **9**(7): 859-868.

Levin, J., A. Kurz, T. Arzberger, A. Giese and G. U. Hoglinger (2016). "The Differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism." Dtsch Arztebl Int **113**(5): 61-69.

Levine, T. P., R. D. Daniels, A. T. Gatta, L. H. Wong and M. J. Hayes (2013). "The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs." Bioinformatics **29**(4): 499-503.

Levy, R. (2011). "[Progressive supranuclear palsy: what's new?]." Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil **9**(2): 191-201.

Liachko, N. F., A. D. Saxton, P. J. McMillan, T. J. Strovas, H. N. Currey, L. M. Taylor, J. M. Wheeler, A. L. Oblak, B. Ghetti, T. J. Montine, C. D. Keene, M. A. Raskind, T. D. Bird and B. C. Kraemer (2016). "The phosphatase calcineurin regulates pathological TDP-43 phosphorylation." Acta Neuropathol **132**(4): 545-561.

Litvan, I., Y. Agid, D. Calne, G. Campbell, B. Dubois, R. C. Duvoisin, C. G. Goetz, L. I. Golbe, J. Grafman, J. H. Growdon, M. Hallett, J. Jankovic, N. P. Quinn, E. Tolosa and D. S. Zee (1996). "Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop." Neurology **47**(1): 1-9.

Liu, Y. J., T. C. Ju, H. M. Chen, Y. S. Jang, L. M. Lee, H. L. Lai, H. C. Tai, J. M. Fang, Y. L. Lin, P. H. Tu and Y. Chern (2015). "Activation of AMP-activated protein kinase alpha1 mediates mislocalization of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis." Hum Mol Genet **24**(3): 787-801.

Llorens, F., M. Schmitz, A. Karch, M. Cramm, P. Lange, K. Gherib, D. Varges, C. Schmidt, I. Zerr and K. Stoeck (2016). "Comparative analysis of cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of neurodegenerative dementia." Alzheimers Dement **12**(5): 577-589.

LoPresti, P., S. Szuchet, S. C. Papasozomenos, R. P. Zinkowski and L. I. Binder (1995). "Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10369-10373.

Lu, C. H., C. Macdonald-Wallis, E. Gray, N. Pearce, A. Petzold, N. Norgren, G. Giovannoni, P. Fratta, K. Sidle, M. Fish, R. Orrell, R. Howard, K. Talbot, L. Greensmith, J. Kuhle, M. R. Turner and A. Malaspina (2015). "Neurofilament light chain: A prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis." Neurology **84**(22): 2247-2257.

Ludolph, A., V. Drory, O. Hardiman, I. Nakano, J. Ravits, W. Robberecht, J. Shefner and W. F. N. R. G. O. ALS/MND (2015). "A revision of the El Escorial criteria - 2015." Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener **16**(5-6): 291-292.

Luukkainen, L., R. Bloigu, V. Moilanen and A. M. Remes (2015). "Epidemiology of Frontotemporal Lobar Degeneration in Northern Finland." Dement Geriatr Cogn Dis Extra **5**(3): 435-441.

Mackenzie, I. R., A. Baborie, S. Pickering-Brown, D. Du Plessis, E. Jaros, R. H. Perry, D. Neary, J. S. Snowden and D. M. Mann (2006). "Heterogeneity of ubiquitin pathology in frontotemporal lobar degeneration: classification and relation to clinical phenotype." Acta Neuropathol **112**(5): 539-549.

Mackenzie, I. R., E. H. Bigio, P. G. Ince, F. Geser, M. Neumann, N. J. Cairns, L. K. Kwong, M. S. Forman, J. Ravits, H. Stewart, A. Eisen, L. McClusky, H. A. Kretzschmar, C. M. Monoranu, J. R. Highley, J. Kirby, T. Siddique, P. J. Shaw, V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2007). "Pathological TDP-43 distinguishes

sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations." Ann Neurol **61**(5): 427-434.

Mackenzie, I. R. and M. Neumann (2016). "Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies." J Neurochem **138 Suppl 1**: 54-70.

Mackenzie, I. R., M. Neumann, A. Baborie, D. M. Sampathu, D. Du Plessis, E. Jaros, R. H. Perry, J. Q. Trojanowski, D. M. Mann and V. M. Lee (2011). "A harmonized classification system for FTLD-TDP pathology." Acta Neuropathol **122**(1): 111-113.

Mahmood, T. and P. C. Yang (2012). "Western blot: technique, theory, and trouble shooting." N Am J Med Sci **4**(9): 429-434.

Majumder, V., J. M. Gregory, M. A. Barria, A. Green and S. Pal (2018). "TDP-43 as a potential biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis." BMC Neurol **18**(1): 90.

Marat, A. L., H. Dokainish and P. S. McPherson (2011). "DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases." J Biol Chem **286**(16): 13791-13800.

Martens, L. H., J. Zhang, S. J. Barmada, P. Zhou, S. Kamiya, B. Sun, S. W. Min, L. Gan, S. Finkbeiner, E. J. Huang and R. V. Farese, Jr. (2012). "Progranulin deficiency promotes neuroinflammation and neuron loss following toxin-induced injury." J Clin Invest **122**(11): 3955-3959.

McCombe, P. A., C. Pfluger, P. Singh, C. Y. Lim, C. Airey and R. D. Henderson (2015). "Serial measurements of phosphorylated neurofilament-heavy in the serum of subjects with amyotrophic lateral sclerosis." J Neurol Sci **353**(1-2): 122-129.

McKeith, I. G., B. F. Boeve, D. W. Dickson, G. Halliday, J. P. Taylor, D. Weintraub, D. Aarsland, J. Galvin, J. Attems, C. G. Ballard, A. Bayston, T. G. Beach, F. Blanc, N. Bohnen, L. Bonanni, J. Bras, P. Brundin, D. Burn, A. Chen-Plotkin, J. E. Duda, O. El-Agnaf, H. Feldman, T. J. Ferman, D. Ffytche, H. Fujishiro, D. Galasko, J. G. Goldman, S. N. Gomperts, N. R. Graff-Radford, L. S. Honig, A. Iranzo, K. Kantarci, D. Kaufer, W. Kukull, V. M. Y. Lee, J. B. Leverenz, S. Lewis, C. Lippa, A. Lunde, M. Masellis, E. Masliah, P. McLean, B. Mollenhauer, T. J. Montine, E. Moreno, E. Mori, M. Murray, J. T. O'Brien, S. Orimo, R. B. Postuma, S. Ramaswamy, O. A. Ross, D. P. Salmon, A. Singleton, A. Taylor, A. Thomas, P. Tiraboschi, J. B. Toledo, J. Q. Trojanowski, D. Tsuang, Z. Walker, M. Yamada and K. Kosaka (2017). "Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium." Neurology **89**(1): 88-100.

McKhann, G. M., D. S. Knopman, H. Chertkow, B. T. Hyman, C. R. Jack, Jr., C. H. Kawas, W. E. Klunk, W. J. Koroshetz, J. J. Manly, R. Mayeux, R. C. Mohs, J. C. Morris, M. N. Rossor, P. Scheltens, M. C. Carrillo, B. Thies, S. Weintraub and C. H. Phelps (2011). "The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **7**(3): 263-269.

McVeigh, C. and P. Passmore (2006). "Vascular dementia: prevention and treatment." Clin Interv Aging **1**(3): 229-235.

Meeter, L. H., H. Patzke, G. Loewen, E. G. Dopper, Y. A. Pijnenburg, R. van Minkelen and J. C. van Swieten (2016). "Progranulin Levels in Plasma and Cerebrospinal Fluid in Granulin Mutation Carriers." Dement Geriatr Cogn Dis Extra **6**(2): 330-340.

Mehta, S. G., M. Khare, R. Ramani, G. D. Watts, M. Simon, K. E. Osann, S. Donkervoort, E. Dec, A. Nalbandian, J. Platt, M. Pasquali, A. Wang, T. Mozaffar, C. D. Smith and V. E. Kimonis (2013).

"Genotype-phenotype studies of VCP-associated inclusion body myopathy with Paget disease of bone and/or frontotemporal dementia." Clin Genet **83**(5): 422-431.

Meola, G. and R. Cardani (2015). "Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms." Biochim Biophys Acta **1852**(4): 594-606.

Mesulam, M., A. Wicklund, N. Johnson, E. Rogalski, G. C. Leger, A. Rademaker, S. Weintraub and E. H. Bigio (2008). "Alzheimer and frontotemporal pathology in subsets of primary progressive aphasia." Ann Neurol **63**(6): 709-719.

Mesulam, M. M. (2001). "Primary progressive aphasia." Ann Neurol **49**(4): 425-432.

Meyer, J. S., M. Quach, J. Thornby, M. Chowdhury and J. Huang (2005). "MRI identifies MCI subtypes: vascular versus neurodegenerative." J Neurol Sci **229-230**: 121-129.

Mietelska-Porowska, A., U. Wasik, M. Goras, A. Filipek and G. Niewiadomska (2014). "Tau protein modifications and interactions: their role in function and dysfunction." Int J Mol Sci **15**(3): 4671-4713.

Morris, M., G. M. Knudsen, S. Maeda, J. C. Trinidad, A. Ioanoviciu, A. L. Burlingame and L. Mucke (2015). "Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice." Nat Neurosci **18**(8): 1183-1189.

Mouton-Liger, F., D. Wallon, A. C. Troussiere, R. Yatimi, J. Dumurgier, E. Magnin, V. de la Sayette, E. Duron, N. Philippi, E. Beaufils, A. Gabelle, B. Croisile, P. Robert, F. Pasquier, D. Hannequin, J. Hugon and C. Paquet (2014). "Impact of cerebro-spinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease in clinical practice: a multicentric study." J Neurol **261**(1): 144-151.

Munoz, D. G., D. W. Dickson, C. Bergeron, I. R. Mackenzie, A. Delacourte and V. Zhukareva (2003). "The neuropathology and biochemistry of frontotemporal dementia." Ann Neurol **54 Suppl 5**: S24-28.

Neary, D., J. S. Snowden, L. Gustafson, U. Passant, D. Stuss, S. Black, M. Freedman, A. Kertesz, P. H. Robert, M. Albert, K. Boone, B. L. Miller, J. Cummings and D. F. Benson (1998). "Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria." Neurology **51**(6): 1546-1554.

Nelson, G. M., J. M. Guynn and B. N. Chorley (2017). "Procedure and Key Optimization Strategies for an Automated Capillary Electrophoretic-based Immunoassay Method." J Vis Exp(127).

Neumann, M., L. K. Kwong, E. B. Lee, E. Kremmer, A. Flatley, Y. Xu, M. S. Forman, D. Troost, H. A. Kretzschmar, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2009). "Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies." Acta Neuropathol **117**(2): 137-149.

Neumann, M., D. M. Sampathu, L. K. Kwong, A. C. Truax, M. C. Micsenyi, T. T. Chou, J. Bruce, T. Schuck, M. Grossman, C. M. Clark, L. F. McCluskey, B. L. Miller, E. Masliah, I. R. Mackenzie, H. Feldman, W. Feiden, H. A. Kretzschmar, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2006). "Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." Science **314**(5796): 130-133.

Nguyen, A. D., T. A. Nguyen, L. H. Martens, L. L. Mitic and R. V. Farese, Jr. (2013). "Progranulin: at the interface of neurodegenerative and metabolic diseases." Trends Endocrinol Metab **24**(12): 597-606.

Nicholson, A. M., J. Gass, L. Petrucelli and R. Rademakers (2012). "Progranulin axis and recent developments in frontotemporal lobar degeneration." Alzheimers Res Ther **4**(1): 4.

Niemantsverdriet, E., S. Valckx, M. Bjerke and S. Engelborghs (2017). "Alzheimer's disease CSF biomarkers: clinical indications and rational use." Acta Neurol Belg **117**(3): 591-602.

Nishimoto, Y., D. Ito, T. Yagi, Y. Nihei, Y. Tsunoda and N. Suzuki (2010). "Characterization of alternative isoforms and inclusion body of the TAR DNA-binding protein-43." J Biol Chem **285**(1): 608-619.

Nordin, A., C. Akimoto, A. Wuolikainen, H. Alstermark, P. Jonsson, A. Birve, S. L. Marklund, K. S. Graffmo, K. Forsberg, T. Brannstrom and P. M. Andersen (2015). "Extensive size variability of the GGGGCC expansion in C9orf72 in both neuronal and non-neuronal tissues in 18 patients with ALS or FTD." Hum Mol Genet **24**(11): 3133-3142.

Noto, Y., K. Shibuya, Y. Sato, K. Kanai, S. Misawa, S. Sawai, M. Mori, T. Uchiyama, S. Isose, S. Nasu, Y. Sekiguchi, Y. Fujimaki, T. Kasai, T. Tokuda, M. Nakagawa and S. Kuwabara (2011). "Elevated CSF TDP-43 levels in amyotrophic lateral sclerosis: specificity, sensitivity, and a possible prognostic value." Amyotroph Lateral Scler **12**(2): 140-143.

Novakova, L., H. Zetterberg, P. Sundstrom, M. Axelsson, M. Khademi, M. Gunnarsson, C. Malmestrom, A. Svenningsson, T. Olsson, F. Piehl, K. Blennow and J. Lycke (2017). "Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein." Neurology **89**(22): 2230-2237.

Oeckl, P., C. Jardel, F. Salachas, F. Lamari, P. M. Andersen, R. Bowser, M. de Carvalho, J. Costa, P. van Damme, E. Gray, J. Grosskreutz, M. Hernandez-Barral, S. K. Herukka, A. Huss, A. Jeromin, J. Kirby, M. Kuzma-Kozakiewicz, M. Amador Mdel, J. S. Mora, C. Morelli, P. Muckova, S. Petri, K. Poesen, H. Rhode, A. K. Rikardsson, W. Robberecht, A. I. Rodriguez Mahillo, P. Shaw, V. Silani, P. Steinacker, M. R. Turner, E. Tuzun, B. Yetimler, A. C. Ludolph and M. Otto (2016). "Multicenter validation of CSF neurofilaments as diagnostic biomarkers for ALS." Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener **17**(5-6): 404-413.

Okamoto, K., Y. Fujita, E. Hoshino, Y. Tamura, T. Fukuda, M. Hasegawa and M. Takatama (2015). "An autopsy case of familial amyotrophic lateral sclerosis with a TARDBP Q343R mutation." Neuropathology **35**(5): 462-468.

Olsson, B., R. Lautner, U. Andreasson, A. Ohrfelt, E. Portelius, M. Bjerke, M. Holtta, C. Rosen, C. Olsson, G. Strobel, E. Wu, K. Dakin, M. Petzold, K. Blennow and H. Zetterberg (2016). "CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis." Lancet Neurol **15**(7): 673-684.

Onyike, C. U. and J. Diehl-Schmid (2013). "The epidemiology of frontotemporal dementia." Int Rev Psychiatry **25**(2): 130-137.

Ossenkoppele, R., Y. A. Pijnenburg, D. C. Perry, B. I. Cohn-Sheehy, N. M. Scheltens, J. W. Vogel, J. H. Kramer, A. E. van der Vlies, R. La Joie, H. J. Rosen, W. M. van der Flier, L. T. Grinberg, A. J. Rozemuller, E. J. Huang, B. N. van Berckel, B. L. Miller, F. Barkhof, W. J. Jagust, P. Scheltens, W. W. Seeley and G. D. Rabinovici (2015). "The behavioural/dysexecutive variant of Alzheimer's disease: clinical, neuroimaging and pathological features." Brain **138**(Pt 9): 2732-2749.

Paquet, C., E. Magnin, D. Wallon, A. C. Troussiere, J. Dumurgier, A. Jager, F. Bellivier, E. Bouaziz-Amar, F. Blanc, E. Beaufils, C. Miguet-Alfonsi, M. Quillard, S. Schraen, F. Pasquier, D. Hannequin, P. Robert, J. Hugon, F. Mouton-Liger, P. L. M. n. For e and collaborators (2016). "Utility of CSF biomarkers in psychiatric disorders: a national multicentre prospective study." Alzheimers Res Ther **8**: 27.

Petzold, A. (2005). "Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss." J Neurol Sci **233**(1-2): 183-198.

Piguet, O. and J. R. Hodges (2013). "Behavioural-variant frontotemporal dementia: an update." Dement Neuropsychol **7**(1): 10-18.

Pijnenburg, Y. A., N. A. Verwey, W. M. van der Flier, P. Scheltens and C. E. Teunissen (2015). "Discriminative and prognostic potential of cerebrospinal fluid phosphoTau/tau ratio and neurofilaments for frontotemporal dementia subtypes." Alzheimers Dement (Amst) **1**(4): 505-512.

Poesen, K., M. De Schaepdryver, B. Stubendorff, B. Gille, P. Muckova, S. Wendler, T. Prell, T. M. Ringer, H. Rhode, O. Stevens, K. G. Claeys, G. Couwelier, A. D'Hondt, N. Lamaire, P. Tilkin, D. Van Reijen, S. Gourmaud, N. Fedtke, B. Heiling, M. Rumpel, A. Rodiger, A. Gunkel, O. W. Witte, C. Paquet, R. Vandenberghe, J. Grosskreutz and P. Van Damme (2017). "Neurofilament markers for ALS correlate with extent of upper and lower motor neuron disease." Neurology **88**(24): 2302-2309.

Pottier, C., T. A. Ravenscroft, M. Sanchez-Contreras and R. Rademakers (2016). "Genetics of FTLD: overview and what else we can expect from genetic studies." J Neurochem **138 Suppl 1**: 32-53.

Przedborski, S., M. Vila and V. Jackson-Lewis (2003). "Neurodegeneration: what is it and where are we?" J Clin Invest **111**(1): 3-10.

Rascovsky, K., J. R. Hodges, D. Knopman, M. F. Mendez, J. H. Kramer, J. Neuhaus, J. C. van Swieten, H. Seelaar, E. G. Dopper, C. U. Onyike, A. E. Hillis, K. A. Josephs, B. F. Boeve, A. Kertesz, W. W. Seeley, K. P. Rankin, J. K. Johnson, M. L. Gorno-Tempini, H. Rosen, C. E. Prioleau-Latham, A. Lee, C. M. Kipps, P. Lillo, O. Piguet, J. D. Rohrer, M. N. Rossor, J. D. Warren, N. C. Fox, D. Galasko, D. P. Salmon, S. E. Black, M. Mesulam, S. Weintraub, B. C. Dickerson, J. Diehl-Schmid, F. Pasquier, V. Deramecourt, F. Lebert, Y. Pijnenburg, T. W. Chow, F. Manes, J. Grafman, S. F. Cappa, M. Freedman, M. Grossman and B. L. Miller (2011). "Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia." Brain **134**(Pt 9): 2456-2477.

Renton, A. E., E. Majounie, A. Waite, J. Simon-Sanchez, S. Rollinson, J. R. Gibbs, J. C. Schymick, H. Laaksovirta, J. C. van Swieten, L. Myllykangas, H. Kalimo, A. Paetau, Y. Abramzon, A. M. Remes, A. Kaganovich, S. W. Scholz, J. Duckworth, J. Ding, D. W. Harmer, D. G. Hernandez, J. O. Johnson, K. Mok, M. Ryten, D. Trabzuni, R. J. Guerreiro, R. W. Orrell, J. Neal, A. Murray, J. Pearson, I. E. Jansen, D. Sondervan, H. Seelaar, D. Blake, K. Young, N. Halliwell, J. B. Callister, G. Toulson, A. Richardson, A. Gerhard, J. Snowden, D. Mann, D. Neary, M. A. Nalls, T. Peuralinna, L. Jansson, V. M. Isoviita, A. L. Kaivorinne, M. Holtta-Vuori, E. Ikonen, R. Sulkava, M. Benatar, J. Wuu, A. Chio, G. Restagno, G. Borghero, M. Sabatelli, I. Consortium, D. Heckerman, E. Rogaeva, L. Zinman, J. D. Rothstein, M. Sendtner, C. Drepper, E. E. Eichler, C. Alkan, Z. Abdullaev, S. D. Pack, A. Dutra, E. Pak, J. Hardy, A. Singleton, N. M. Williams, P. Heutink, S. Pickering-Brown, H. R. Morris, P. J. Tienari and B. J. Traynor (2011). "A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD." Neuron **72**(2): 257-268.

Rhoads, S. N., Z. T. Monahan, D. S. Yee and F. P. Shewmaker (2018). "The Role of Post-Translational Modifications on Prion-Like Aggregation and Liquid-Phase Separation of FUS." Int J Mol Sci **19**(3).

Ridley, R. M., C. D. Frith, T. J. Crow and P. M. Conneally (1988). "Anticipation in Huntington's disease is inherited through the male line but may originate in the female." J Med Genet **25**(9): 589-595.

Riemenschneider, M., S. Wagenpfeil, J. Diehl, N. Lautenschlager, T. Theml, B. Heldmann, A. Drzezga, T. Jahn, H. Forstl and A. Kurz (2002). "Tau and Abeta42 protein in CSF of patients with frontotemporal degeneration." Neurology **58**(11): 1622-1628.

Riemenschneider, M., S. Wagenpfeil, H. Vanderstichele, M. Otto, J. Wiltfang, H. Kretzschmar, E. Vanmechelen, H. Forstl and A. Kurz (2003). "Phospho-tau/total tau ratio in cerebrospinal fluid discriminates Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias." Mol Psychiatry **8**(3): 343-347.

Ringholz, G. M., S. H. Appel, M. Bradshaw, N. A. Cooke, D. M. Mosnik and P. E. Schulz (2005). "Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS." Neurology **65**(4): 586-590.

Rossi, D., P. Volanti, L. Brambilla, T. Colletti, R. Spataro and V. La Bella (2018). "CSF neurofilament proteins as diagnostic and prognostic biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis." J Neurol **265**(3): 510-521.

Rossi, S., A. Serrano, V. Gerbino, A. Giorgi, L. Di Francesco, M. Nencini, F. Bozzo, M. E. Schinina, C. Bagni, G. Cestra, M. T. Carri, T. Achsel and M. Cozzolino (2015). "Nuclear accumulation of mRNAs underlies G4C2-repeat-induced translational repression in a cellular model of C9orf72 ALS." J Cell Sci **128**(9): 1787-1799.

Sachdev, P. S., D. Blacker, D. G. Blazer, M. Ganguli, D. V. Jeste, J. S. Paulsen and R. C. Petersen (2014). "Classifying neurocognitive disorders: the DSM-5 approach." Nat Rev Neurol **10**(11): 634-642.

Sampathu, D. M., M. Neumann, L. K. Kwong, T. T. Chou, M. Micsenyi, A. Truax, J. Bruce, M. Grossman, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2006). "Pathological heterogeneity of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions delineated by ubiquitin immunohistochemistry and novel monoclonal antibodies." Am J Pathol **169**(4): 1343-1352.

Schludi, M. H., L. Becker, L. Garrett, T. F. Gendron, Q. Zhou, F. Schreiber, B. Popper, L. Dimou, T. M. Strom, J. Winkelmann, A. von Thaden, K. Rentzsch, S. May, M. Michaelsen, B. M. Schwenk, J. Tan, B. Schoser, M. Dieterich, L. Petrucelli, S. M. Holter, W. Wurst, H. Fuchs, V. Gailus-Durner, M. H. de Angelis, T. Klopstock, T. Arzberger and D. Edbauer (2017). "Spinal poly-GA inclusions in a C9orf72 mouse model trigger motor deficits and inflammation without neuron loss." Acta Neuropathol **134**(2): 241-254.

Seelaar, H., K. Y. Klijnsma, I. de Koning, A. van der Lugt, W. Z. Chiu, A. Azmani, A. J. Rozemuller and J. C. van Swieten (2010). "Frequency of ubiquitin and FUS-positive, TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration." J Neurol **257**(5): 747-753.

Sephton, C. F., S. K. Good, S. Atkin, C. M. Dewey, P. Mayer, 3rd, J. Herz and G. Yu (2010). "TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development." J Biol Chem **285**(9): 6826-6834.

Sergeant, N., A. Delacourte and L. Buee (2005). "Tau protein as a differential biomarker of tauopathies." Biochim Biophys Acta **1739**(2-3): 179-197.

Shahim, P., H. Zetterberg, Y. Tegner and K. Blennow (2017). "Serum neurofilament light as a biomarker for mild traumatic brain injury in contact sports." Neurology **88**(19): 1788-1794.

Shi, Z., S. Liu, Y. Wang, S. Liu, T. Han, L. Cai, Y. Zhou, S. Gao and Y. Ji (2017). "Correlations between clinical characteristics and neuroimaging in Chinese patients with subtypes of frontotemporal lobe degeneration." Medicine (Baltimore) **96**(37): e7948.

Skillback, T., C. Rosen, F. Asztely, N. Mattsson, K. Blennow and H. Zetterberg (2014). "Diagnostic performance of cerebrospinal fluid total tau and phosphorylated tau in Creutzfeldt-Jakob disease: results from the Swedish Mortality Registry." JAMA Neurol **71**(4): 476-483.

Soraru, G., V. Orsetti, E. Buratti, F. Baralle, V. Cima, M. Volpe, C. D'Ascenzo, A. Palmieri, K. Koutsikos, E. Pegoraro and C. Angelini (2010). "TDP-43 in skeletal muscle of patients affected with amyotrophic lateral sclerosis." Amyotroph Lateral Scler **11**(1-2): 240-243.

Soylu-Kucharz, R., A. Sandelius, M. Sjogren, K. Blennow, E. J. Wild, H. Zetterberg and M. Bjorkqvist (2017). "Neurofilament light protein in CSF and blood is associated with neurodegeneration and disease severity in Huntington's disease R6/2 mice." Sci Rep **7**(1): 14114.

Steinacker, P., C. Berner, D. R. Thal, J. Attems, A. C. Ludolph and M. Otto (2014). "Protease-resistant SOD1 aggregates in amyotrophic lateral sclerosis demonstrated by paraffin-embedded tissue (PET) blot." Acta Neuropathol Commun **2**: 130.

Steinacker, P., C. Hendrich, A. D. Sperfeld, S. Jesse, C. A. von Arnim, S. Lehnert, A. Pabst, I. Uttner, H. Tumani, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, H. A. Kretzschmar, A. Ludolph, M. Neumann and M. Otto (2008). "TDP-43 in cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." Arch Neurol **65**(11): 1481-1487.

Stolle, C. A., E. C. Frackelton, J. McCallum, J. M. Farmer, A. Tsou, R. B. Wilson and D. R. Lynch (2008). "Novel, complex interruptions of the GAA repeat in small, expanded alleles of two affected siblings with late-onset Friedreich ataxia." Mov Disord **23**(9): 1303-1306.

Strong, M. J., K. Volkening, R. Hammond, W. Yang, W. Strong, C. Leystra-Lantz and C. Shoesmith (2007). "TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein." Mol Cell Neurosci **35**(2): 320-327.

Struyfs, H., E. Niemantsverdriet, J. Goossens, E. Fransen, J. J. Martin, P. P. De Deyn and S. Engelborghs (2015). "Cerebrospinal Fluid P-Tau181P: Biomarker for Improved Differential Dementia Diagnosis." Front Neurol **6**: 138.

Suarez-Calvet, M., O. Dols-Icardo, A. Llado, R. Sanchez-Valle, I. Hernandez, G. Amer, S. Anton-Aguirre, D. Alcolea, J. Fortea, I. Ferrer, J. van der Zee, L. Dillen, C. Van Broeckhoven, J. L. Molinuevo, R. Blesa, J. Clarimon and A. Lleo (2014). "Plasma phosphorylated TDP-43 levels are elevated in patients with frontotemporal dementia carrying a C9orf72 repeat expansion or a GRN mutation." J Neurol Neurosurg Psychiatry **85**(6): 684-691.

Suh, E., K. Grando and V. M. Van Deerlin (2018). "Validation of a Long-Read PCR Assay for Sensitive Detection and Sizing of C9orf72 Hexanucleotide Repeat Expansions." J Mol Diagn.

Sultan, A., F. Nesslany, M. Violet, S. Begard, A. Loyens, S. Talahari, Z. Mansuroglu, D. Marzin, N. Sergeant, S. Humez, M. Colin, E. Bonnefoy, L. Buee and M. C. Galas (2011). "Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection." J Biol Chem **286**(6): 4566-4575.

Talbott, E. O., A. M. Malek and D. Lacomis (2016). "The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis." Handb Clin Neurol **138**: 225-238.

Tan, R. H., J. J. Kril, M. Fatima, A. McGeachie, H. McCann, C. Shepherd, S. L. Forrest, A. Affleck, J. B. Kwok, J. R. Hodges, M. C. Kiernan and G. M. Halliday (2015). "TDP-43 proteinopathies: pathological identification of brain regions differentiating clinical phenotypes." Brain **138**(Pt 10): 3110-3122.

Tapia, L., A. Milnerwood, A. Guo, F. Mills, E. Yoshida, C. Vasuta, I. R. Mackenzie, L. Raymond, M. Cynader, W. Jia and S. X. Bamji (2011). "Progranulin deficiency decreases gross neural connectivity but enhances transmission at individual synapses." J Neurosci **31**(31): 11126-11132.

Taylor, L. M., P. J. McMillan, N. F. Liachko, T. J. Strovas, B. Ghetti, T. D. Bird, C. Dirk Keene and B. C. Kraemer (2018). "Pathological phosphorylation of tau and TDP-43 by TTBK1 and TTBK2 drives neurodegeneration." Mol Neurodegener **13**(1): 7.

Taylor, S. C., T. Berkelman, G. Yadav and M. Hammond (2013). "A defined methodology for reliable quantification of Western blot data." Mol Biotechnol **55**(3): 217-226.

Teichmann, M. (2010). "Primary progressive aphasia." Neurologie.com **2**(8): 211-214.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

Trabzuni, D., S. Wray, J. Vandrovcova, A. Ramasamy, R. Walker, C. Smith, C. Luk, J. R. Gibbs, A. Dillman, D. G. Hernandez, S. Arepalli, A. B. Singleton, M. R. Cookson, A. M. Pittman, R. de Silva, M. E. Weale, J. Hardy and M. Ryten (2012). "MAPT expression and splicing is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies." Hum Mol Genet **21**(18): 4094-4103.

Troussiere, A. C., D. Wallon, F. Mouton-Liger, R. Yatimi, P. Robert, J. Hugon, D. Hannequin, F. Pasquier and C. Paquet (2014). "Who needs cerebrospinal biomarkers? A national survey in clinical practice." J Alzheimers Dis **40**(4): 857-861.

Turner, M. R., M. C. Kiernan, P. N. Leigh and K. Talbot (2009). "Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis." Lancet Neurol **8**(1): 94-109.

Udan, M. and R. H. Baloh (2011). "Implications of the prion-related Q/N domains in TDP-43 and FUS." Prion **5**(1): 1-5.

Valentine, J. S., P. A. Doucette and S. Zittin Potter (2005). "Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis." Annu Rev Biochem **74**: 563-593.

Van Cauwenberghe, C., C. Van Broeckhoven and K. Sleegers (2016). "The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives." Genet Med **18**(5): 421-430.

Van Damme, P., A. Van Hoecke, D. Lambrechts, P. Vanacker, E. Bogaert, J. van Swieten, P. Carmeliet, L. Van Den Bosch and W. Robberecht (2008). "Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival." J Cell Biol **181**(1): 37-41.

Van Deerlin, V. M., J. B. Leverenz, L. M. Bekris, T. D. Bird, W. Yuan, L. B. Elman, D. Clay, E. M. Wood, A. S. Chen-Plotkin, M. Martinez-Lage, E. Steinbart, L. McCluskey, M. Grossman, M. Neumann, I. L. Wu, W. S. Yang, R. Kalb, D. R. Galasko, T. J. Montine, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, G. D. Schellenberg and C. E. Yu (2008). "TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis." Lancet Neurol **7**(5): 409-416.

van der Flier, W. M. and P. Scheltens (2005). "Epidemiology and risk factors of dementia." J Neurol Neurosurg Psychiatry **76 Suppl 5**: v2-7.

Van Mossevelde, S., J. van der Zee, M. Cruts and C. Van Broeckhoven (2017). "Relationship between C9orf72 repeat size and clinical phenotype." Curr Opin Genet Dev **44**: 117-124.

Vanden Broeck, L., P. Callaerts and B. Dermaut (2014). "TDP-43-mediated neurodegeneration: towards a loss-of-function hypothesis?" Trends Mol Med **20**(2): 66-71.

Vanderstichele, H., M. Bibl, S. Engelborghs, N. Le Bastard, P. Lewczuk, J. L. Molinuevo, L. Parnetti, A. Perret-Liaudet, L. M. Shaw, C. Teunissen, D. Wouters and K. Blennow (2012). "Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative." Alzheimers Dement **8**(1): 65-73.

Vijverberg, E. G., A. Dols, W. A. Krudop, M. Del Campo Milan, C. J. Kerssens, F. Gossink, N. D. Prins, M. L. Stek, P. Scheltens, C. E. Teunissen and Y. A. Pijnenburg (2017). "Cerebrospinal fluid biomarker examination as a tool to discriminate behavioral variant frontotemporal dementia from primary psychiatric disorders." Alzheimers Dement (Amst) **7**: 99-106.

Waite, A. J., D. Baumer, S. East, J. Neal, H. R. Morris, O. Ansorge and D. J. Blake (2014). "Reduced C9orf72 protein levels in frontal cortex of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal degeneration brain with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion." Neurobiol Aging **35**(7): 1779 e1775-1779 e1713.

Warner, J. P., L. H. Barron, D. Goudie, K. Kelly, D. Dow, D. R. Fitzpatrick and D. J. Brock (1996). "A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR." J Med Genet **33**(12): 1022-1026.

Weihl, C. C., A. Pestronk and V. E. Kimonis (2009). "Valosin-containing protein disease: inclusion body myopathy with Paget's disease of the bone and fronto-temporal dementia." Neuromuscul Disord **19**(5): 308-315.

Weytingh, M. D., P. M. Bossuyt and H. van Crevel (1995). "Reversible dementia: more than 10% or less than 1%? A quantitative review." J Neurol **242**(7): 466-471.

Wijesekera, L. C. and P. N. Leigh (2009). "Amyotrophic lateral sclerosis." Orphanet J Rare Dis **4**: 3.

Woollacott, I. O. and S. Mead (2014). "The C9ORF72 expansion mutation: gene structure, phenotypic and diagnostic issues." Acta Neuropathol **127**(3): 319-332.

Woolley, J. D., B. K. Khan, N. K. Murthy, B. L. Miller and K. P. Rankin (2011). "The diagnostic challenge of psychiatric symptoms in neurodegenerative disease: rates of and risk factors for prior psychiatric diagnosis in patients with early neurodegenerative disease." J Clin Psychiatry **72**(2): 126-133.

Xiao, S., T. Sanelli, H. Chiang, Y. Sun, A. Chakrabartty, J. Keith, E. Rogaeva, L. Zinman and J. Robertson (2015). "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**(1): 49-61.

Xu, Z. and C. Yang (2014). "TDP-43-The key to understanding amyotrophic lateral sclerosis." Rare Dis **2**(1): e944443.

Yamashita, T., T. Hideyama, K. Hachiga, S. Teramoto, J. Takano, N. Iwata, T. C. Saido and S. Kwak (2012). "A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology." Nat Commun **3**: 1307.

Yamashita, T., S. Teramoto and S. Kwak (2016). "Phosphorylated TDP-43 becomes resistant to cleavage by calpain: A regulatory role for phosphorylation in TDP-43 pathology of ALS/FTLD." Neurosci Res **107**: 63-69.

Yin, F., R. Banerjee, B. Thomas, P. Zhou, L. Qian, T. Jia, X. Ma, Y. Ma, C. Iadecola, M. F. Beal, C. Nathan and A. Ding (2010). "Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice." J Exp Med **207**(1): 117-128.

Yin, F., M. Dumont, R. Banerjee, Y. Ma, H. Li, M. T. Lin, M. F. Beal, C. Nathan, B. Thomas and A. Ding (2010). "Behavioral deficits and progressive neuropathology in progranulin-deficient mice: a mouse model of frontotemporal dementia." FASEB J **24**(12): 4639-4647.

Yousef, A., J. L. Robinson, D. J. Irwin, M. D. Byrne, L. K. Kwong, E. B. Lee, Y. Xu, S. X. Xie, L. Rennert, E. Suh, V. M. Van Deerlin, M. Grossman, V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2017). "Neuron loss and degeneration in the progression of TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration." Acta Neuropathol Commun **5**(1): 68.

Zetsche, B., J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, I. M. Slaymaker, K. S. Makarova, P. Essletzbichler, S. E. Volz, J. Joung, J. van der Oost, A. Regev, E. V. Koonin and F. Zhang (2015). "Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system." Cell **163**(3): 759-771.

Zetterberg, H. (2016). "Neurofilament Light: A Dynamic Cross-Disease Fluid Biomarker for Neurodegeneration." Neuron **91**(1): 1-3.

Zhang, Y. J., T. Caulfield, Y. F. Xu, T. F. Gendron, J. Hubbard, C. Stetler, H. Sasaguri, E. C. Whitelaw, S. Cai, W. C. Lee and L. Petrucelli (2013). "The dual functions of the extreme N-terminus of TDP-43 in regulating its biological activity and inclusion formation." Hum Mol Genet **22**(15): 3112-3122.

Zhang, Y. J., Y. F. Xu, C. Cook, T. F. Gendron, P. Roettges, C. D. Link, W. L. Lin, J. Tong, M. Castanedes-Casey, P. Ash, J. Gass, V. Rangachari, E. Buratti, F. Baralle, T. E. Golde, D. W. Dickson and L. Petrucelli (2009). "Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(18): 7607-7612.

Zhang, Y. J., Y. F. Xu, C. A. Dickey, E. Buratti, F. Baralle, R. Bailey, S. Pickering-Brown, D. Dickson and L. Petrucelli (2007). "Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43." J Neurosci **27**(39): 10530-10534.

Zhu, J., C. Nathan, W. Jin, D. Sim, G. S. Ashcroft, S. M. Wahl, L. Lacomis, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, C. D. Wright and A. Ding (2002). "Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair." Cell **111**(6): 867-878.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Consentement en vue d'un examen à finalité médicale des caractéristiques génétiques chez une personne (Hospices Civils de Lyon)

Annexe 2 : Consentement du patient pour l'utilisation des échantillons biologiques à une fin de recherche (Laboratoire de Neurochimie, Hospices Civils de Lyon)

Annexe 3 : Protocole de préparation des matrices biologiques issues du sang total

Annexe 4 : Résultats des dosages des biomarqueurs du LCS (cohorte de 104 patients)

Annexe 5 : Protocole d'extraction de la protéine TDP43 cérébrale

Annexe 1 : Consentement en vue d'un examen à finalité médicale des caractéristiques génétiques chez une personne (Hospices Civils de Lyon)

Hospices Civils de Lyon

CONSENTEMENT EN VUE D'UN EXAMEN A FINALITE MEDICALE DES CARACTERISTIQUES GENETIQUES CHEZ UNE PERSONNE

Consentement rédigé par les services de Génétique des HCL

Article 16-11 du Code civil et articles L 1131-1 et L 1131-3 DU Code de la Santé Publique, modifiés selon la Loi de Bioéthique n° 2004-800 du 6 août 2004. Décret n° 2013-527 du 20 juin 2013 relatif aux conditions de mise en œuvre de l'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques à finalité médicale.

Je/ nous soussigné(e/s).....

☐ personne majeure

☐ parent(s) ou tuteur(s)/curateur(s) de : Nom..... Prénom.....
Né(e) le.....

☐ Reconnais(sons) avoir été informé(e/s) par le Docteur .....
ou....., conseiller(e) en génétique (sous la responsabilité du Dr .....)

de la finalité, des limites et du degré de fiabilité du test génétique proposé ainsi que des conséquences familiales du résultat de cet examen.

☐ J'ai / nous avons également été informé(e/s) qu'en cas d'identification d'une anomalie génétique

☐ chez moi-même ☐ chez mon/notre enfant ☐ chez la personne susnommée,

je serai / nous serons tenus d'informer les membres de ma/notre famille qui ont un risque d'être porteurs de cette anomalie et de la transmettre à leur descendance et qui pourraient bénéficier d'une prévention et/ou d'une prise en charge. J'ai / nous avons été informé (e/s) des conséquences d'un éventuel refus de transmettre cette information. Cette information pourra, si je refuse / nous refusons de la transmettre moi / nous-même, être transmise par le médecin prescripteur dans les conditions fixées par la loi.

Cette analyse concerne le diagnostic de.....

Elle se fera par des praticiens agréés dans un laboratoire agréé à cet effet. **Les résultats de cette analyse me/nous seront transmis et expliqués par le médecin qui me l'a prescrite.**

J'autorise / nous autorisons la conservation d'ADN, de lymphocytes ou de fibroblastes dans une biothèque,

☐ à des fins médicales diagnostiques ☐ à des fins de recherche, de façon anonymisée

On m'a/nous a expliqué que ces analyses peuvent révéler d'autres affections que celles recherchées. Si je/nous le souhaite/souhaitons, ces informations me/nous seront transmises si elles comportent un bénéfice direct en l'état actuel de nos connaissances, c'est-à-dire si elles apportent une possibilité de prévention et/ou de traitement.

☐ Je/nous souhaite/souhaitons en être informé(e/s) ☐ je/nous ne souhaitons pas en être informés

☐ Je/nous accepte/acceptons que les résultats soient, de façon anonyme, transmis à des bases de données nationales et internationales.

Fait à..... Le.....Signature

ATTESTATION DE CONSULTATION DE GENETIQUE

Je soussigné(e), Docteur ..... ou....., conseiller(e) en génétique (sous la responsabilité du Dr .....)
Atteste avoir apporté à la / aux personne(s) sus-nommée(s) les informations nécessaires à la compréhension de la nature et de la finalité de l'analyse, conformément aux articles R. 145-15-4 et R. 145-15-5 du code de la Santé Publique et aux conséquences familiales éventuelles de cette étude, conformément au décret n° 2013-527 du 20 juin 2013.

Fait à..... Le.....Signature
et tampon du prescripteur

Nous vous rappelons que les données vous concernant peuvent faire l'objet d'un traitement informatique et sont protégées par les dispositions de la loi « informatique et libertés » (loi n°78-17 de janvier 1978, modifiée). Vous disposez à tout moment d'un droit d'accès et de rectification. Le médecin prescripteur doit conserver le résultat écrit, les doubles de la prescription et de l'attestation, et les comptes rendus d'analyses de biologie médicale commentés et signés (Art. R1131-5).

086821_Septembre 2015 (version 2015)

Annexe 2 : Consentement du patient pour l'utilisation des échantillons biologiques à une fin de recherche (Laboratoire de Neurochimie, Hospices Civils de Lyon)

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE
MULTI SITES DU CHU DE LYON
Centre de Biologie
et de Pathologie Est
59 bd Pinel
69677 BRON Cedex

Hospices Civils de Lyon

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
SERVICE DE NEUROBIOLOGIE

CONSENTEMENT DU PATIENT POUR L'UTILISATION DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES A UNE FIN DE RECHERCHE
CHANGEMENT DE FINALITE D'UN PRELEVEMENT BIOLOGIQUE

Madame, Monsieur,

A l'occasion des soins que votre état de santé nécessitera, il sera procédé à des prélèvements de sang, de cellules ou de liquides biologiques pour établir votre diagnostic et adapter votre traitement.

Après avoir réalisé les analyses nécessaires à votre prise en charge, le reliquat de votre prélèvement pourra être conservé et utilisé à des fins de recherche médicale ou scientifique, dans le respect de la confidentialité et de la réglementation en vigueur.

Vous pouvez, sans conséquence sur votre prise en charge, vous opposer à tout moment à cette utilisation.

Extrait de l'Article L1211-2 du Code de Santé Publique
Modifié par Loi n°2004-800 du 6 août 2004 - art. 7 JORF 7 août 2004

« Le prélèvement d'éléments du corps humain et la collecte de ses produits ne peuvent être pratiqués sans le consentement préalable du donneur. Ce consentement est révocable à tout moment. L'utilisation d'éléments et de produits du corps humain à une fin médicale ou scientifique autre que celle pour laquelle ils ont été prélevés ou collectés est possible, sauf opposition exprimée par la personne sur laquelle a été opéré ce prélèvement ou cette collecte, dûment informée au préalable de cette autre fin. »

Professionnel de santé ayant remis l'information :
NOM QUALITE

NOM et Prénom du patient (ou étiquette)

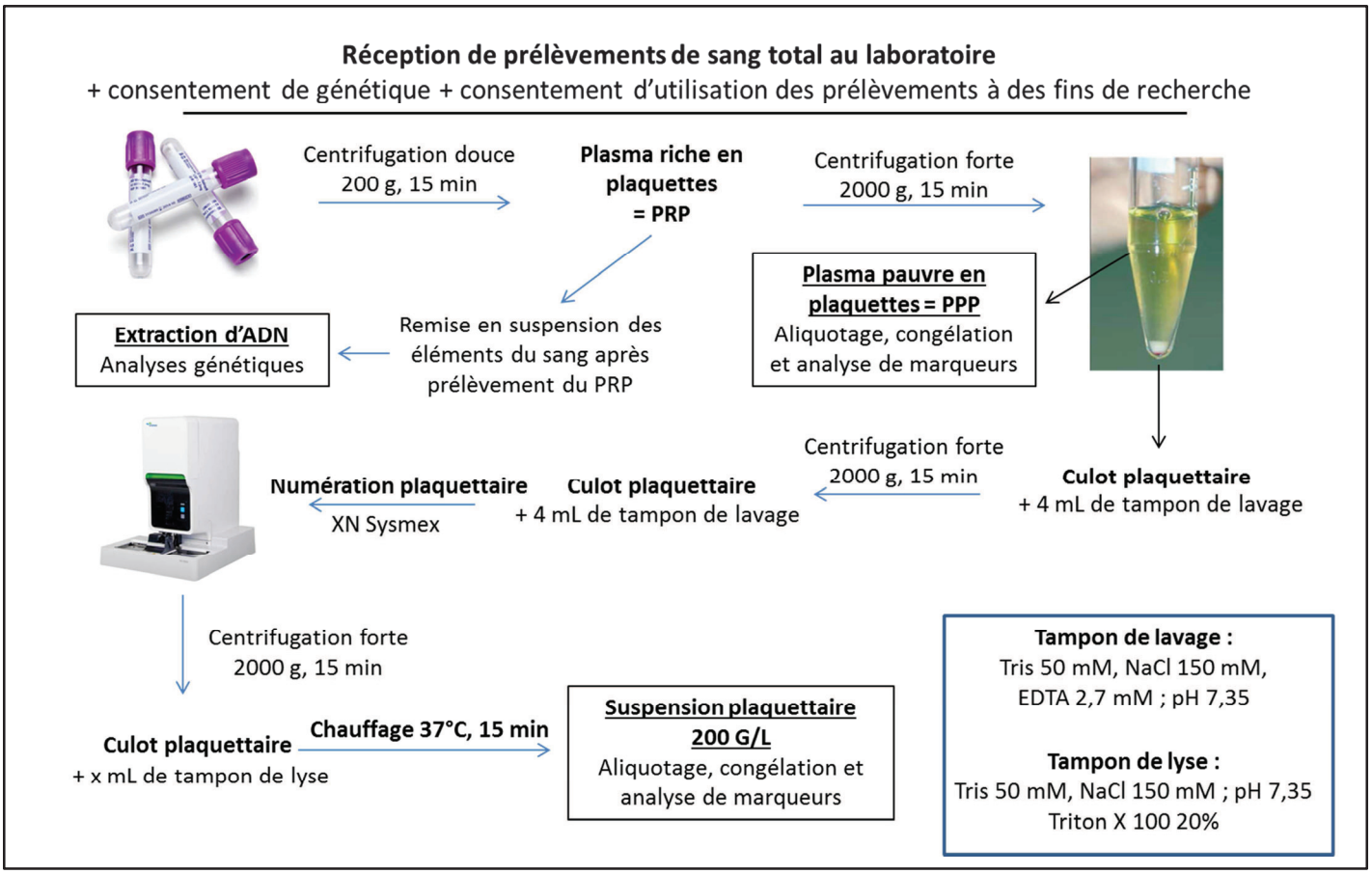
Date

J'accepte

Je m'oppose

Signature du patient / aidant principal:

Annexe 3 : Protocole de préparation des matrices biologiques issues du sang total



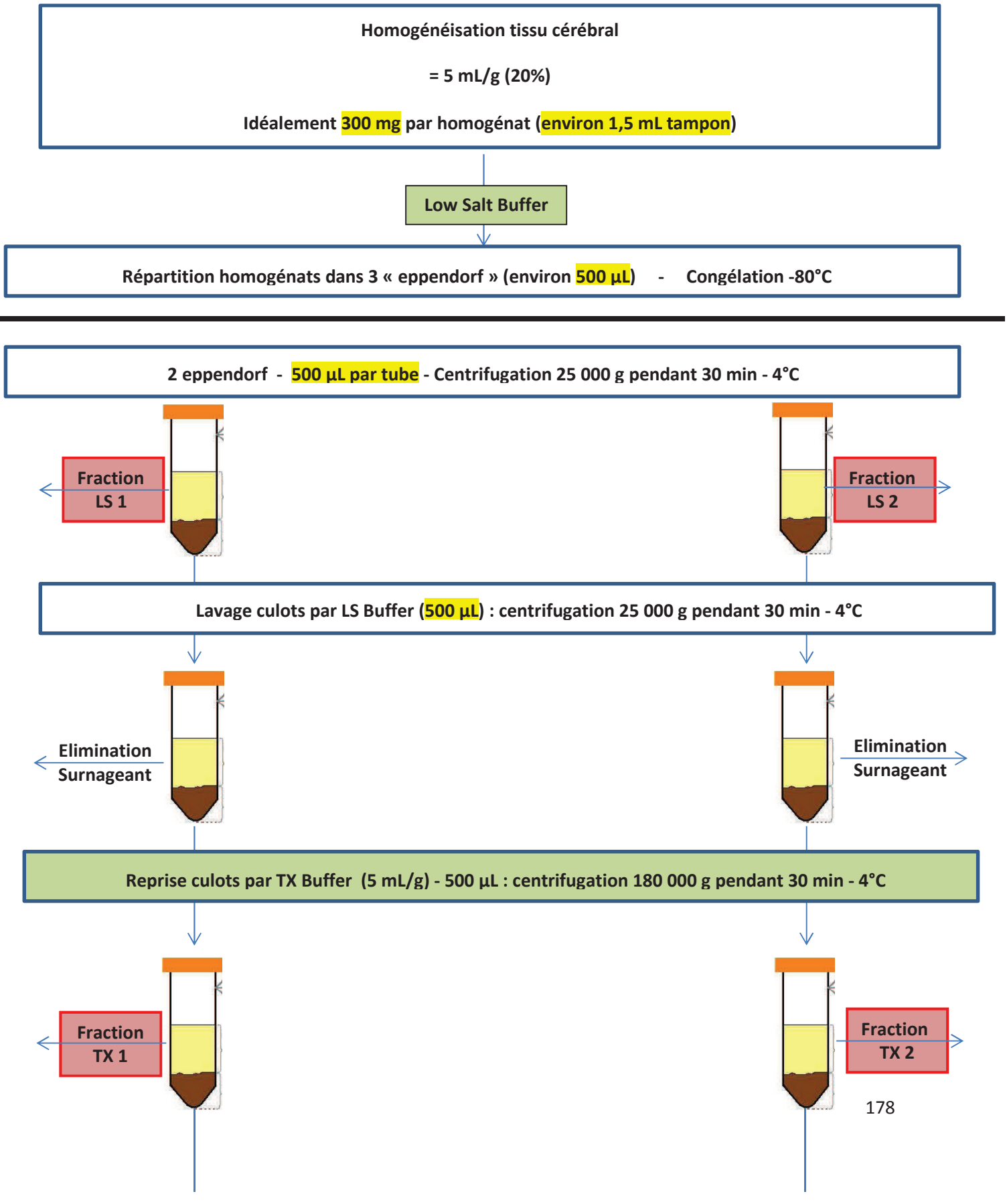
Annexe 4 : Résultats des dosages des biomarqueurs du LCS (cohorte de 104 patients)

N° patient	Code	Age	Sexe	Phénotype clinique	Génétique	Protéine agrégée	Pt (g/L) n = 102	tTau (ng/L) n = 104	pTau (ng/L) n = 104	Aβ 1-42 (ng/L) n = 74	pTau/tTau n = 104	NfL (ng/L) n = 99	tTDP43 (µg/L) n = 100
1	DARBGil3148	70	M	DFT-SLA	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.81	615	67	1251	0.108943089	12420	5.83
2	GOUTNic1158	60	F	DFT-SLA	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.62	270	39	1140	0.144444444	19429	4.48
3	MAURLou2241	77	M	DFT	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.5	549	51	1161	0.092896175	NR	NR
4	BLANJea1043	75	F	DFT	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.47	318	41	1100	0.128930818	5599	8.96
6	CHITAla0442	76	M	DFT	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.59	372	38	1031	0.102150538	2847	4.16
7	DOUCHub0637	81	M	DFT	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.26	365	62	366	0.169863014	1501	6.3
8	GRILMar1234	84	F	DFT	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.32	261	35	578	0.134099617	4234	3.91
9	WEBEJea2743	75	M	DFT	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.54	173	32	738	0.184971098	2102	6.32
10	GRATGhi1170	48	F	DFT	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.37	219	39	1119	0.178082192	1174	3.66
11	ROUDJac1947	71	M	DFT	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.36	174	29	920	0.166666667	2547	6.96
12	ROUSAlb2345	73	M	DFT	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.39	510	57	1412	0.111764706	5818	4.12
13	GRIEChr1554	64	M	DFT	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.61	229	33	912	0.144104803	4281	3.48
14	REDJAnn2348	70	F	DFT	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.31	329	44	1106	0.133738602	5642	5.77
15	TREBCla0748	70	F	DFT-SLA	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.36	381	35	950	0.091863517	4914	2.9
16	OBISFan1143	75	F	DFT-SLA	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.46	344	54	1117	0.156976744	5156	3.71
17	VALLJea1261	57	M	DFT	*C9ORF72*	TDP43 certain	0.63	260	44	976	0.045081967	NR	NR
18	CARDMan1641	77	M	DFT	*GRN*	TDP43 certain	0.37	187	30	622	0.160427807	NR	6.03
19	HAMEXav3151	67	M	DFT	*GRN*	TDP43 certain	0.57	781	38	758	0.048655557	25226	3.35
20	MAURJac1647	71	F	DFT	*GRN*	TDP43 certain	0.55	388	34	720	0.087628866	8075	4.79
21	PIANBru2364	54	M	DFT	*GRN*	TDP43 certain	0.42	581	45	1102	0.077452668	18850	3.33
22	FACHJos1448	70	F	DFT	*GRN*	TDP43 certain	0.61	376	37	999	0.098404255	11369	3.3
24	JANTMir0158	60	F	DFT	*GRN*	TDP43 certain	0.46	571	48	1215	0.084063047	14525	4.17
25	MORENic2254	64	F	DFT-SLA	Négative	TDP43 certain	0.3	286	41	883	0.143356643	9106	NR
26	GARYMar1948	70	F	DFT	Négative	TDP43 certain	0.42	335	54	586	0.16119403	7097	5.4
27	CHAOAni1080	34	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.44	182	30	NR	0.164835165	15111	8.95
28	BURQLud1471	43	M	SLA	NR	TDP43 probable	NR	319	45	NR	0.141065831	33954	8.161
29	FECHOsc1334	81	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.41	326	48	NR	0.147239264	30984	20.82
30	BOUDRob2965	50	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.31	176	37	NR	0.210227273	1816	5.77
31	LOYMon1644	71	F	SLA	NR	TDP43 probable	0.32	266	27	NR	0.101503759	20384	9.983
32	JUSTYve2547	69	F	SLA	NR	TDP43 probable	0.46	369	54	NR	0.146341463	12899	6.65
33	CATHPhi0256	60	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.65	491	55	NR	0.112016293	40455	12.771
34	KAZMJea1055	61	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.53	307	40	NR	0.13029316	20146	6.006
35	BAROJac1652	64	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.41	238	52	NR	0.218487395	2759	4.212
36	GERIChr2767	49	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.38	445	38	NR	0.085393258	26505	7.121
37	BERAAnn0346	70	F	SLA	NR	TDP43 probable	0.3	220	35	NR	0.159090909	8410	4.212
38	ALLAJoe2871	45	F	SLA	NR	TDP43 probable	0.27	188	28	NR	0.148936617	18656	14.28
39	BONSChr1262	54	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.58	244	47	NR	0.192622951	4483	6.65
40	LACRMar1953	63	F	SLA	NR	TDP43 probable	0.34	262	44	NR	0.167938931	5886	10.933
41	LESIMar0758	58	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.73	173	36	NR	0.208092486	5216	4.639
42	GUILGer2850	66	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.39	242	32	NR	0.132231405	19415	4.395

N° patient	Code	Age	Sexe	Phénotype clinique	Génétique	Protéine agrégée	Pt (g/L) n = 102	tTau (ng/L) n = 104	pTau (ng/L) n = 104	Aβ 1-42 (ng/L) n = 74	pTau/tTau n = 104	NfL (ng/L) n = 99	tTDP43 (µg/L) n = 100
43	OSSOChr2935	81	F	SLA	NR	TDP43 probable	0.85	406	65	NR	0.160098522	9201	4.776
44	MULOJos2657	59	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.48	401	54	NR	0.134663342	15991	7.184
45	MOTTMar0660	57	F	SLA	NR	TDP43 probable	0.28	269	38	NR	0.141263941	5220	2.564
46	MAGNDid2052	65	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.36	323	42	NR	0.13003096	6978	5.485
47	GREGMar0537	80	F	SLA	NR	TDP43 probable	0.24	260	38	NR	0.146153846	6167	4.28
48	TROUNic0350	67	F	SLA	NR	TDP43 probable	0.23	373	57	NR	0.152815013	21367	9.96
49	SAUZChr0950	67	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.36	324	47	NR	0.145061728	12539	8.261
50	OLIVCha3157	60	F	SLA	NR	TDP43 probable	1.13	455	33	NR	0.072527473	12183	7.853
51	PICHJea0942	74	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.33	208	39	NR	0.1875	3379	6.227
52	BENMMab2567	50	F	SLA	NR	TDP43 probable	0.23	175	26	NR	0.148571429	8359	5.911
53	YUNGAli1143	74	F	SLA	NR	TDP43 probable	0.35	210	36	NR	0.171428571	3712	5.37
54	COLIJac1249	68	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.41	428	55	NR	0.128504673	10206	7.853
55	SAPEOliv0182	36	M	SLA	NR	TDP43 probable	0.26	250	47	NR	0.188	5758	3.003
56	CHABCat2363	55	F	SLA	NR	TDP43 probable	0.34	197	31	NR	0.157360406	10101	7.216
57	JANIDom2254	63	F	DS	NR	TDP43 probable	0.26	225	41	1254	0.182222222	1883	4.522
58	FAURBri0462	55	F	DS	NR	TDP43 probable	0.33	274	40	1041	0.145985401	4220	5.771
59	ROUSLau2962	55	F	DS	NR	TDP43 probable	0.4	252	38	1142	0.150793651	3410	5.251
60	PESSAle0440	75	F	DS	NR	TDP43 probable	0.45	158	29	1119	0.183544304	2277	4.435
61	BERNCla2851	66	M	DS	NR	TDP43 probable	0.24	218	36	1237	0.165137615	1235	4.133
62	CHOMJea0734	81	M	DS	NR	TDP43 probable	0.31	307	38	1031	0.123778502	4721	3.469
63	DE JJos0861	54	M	DS	NR	TDP43 probable	0.62	251	36	428	0.143426295	998	4.043
64	MILLMic2835	80	F	DS	NR	TDP43 probable	0.39	251	36	803	0.143426295	4004	6.439
65	DAL Ann0854	60	F	DS	NR	TDP43 probable	0.4	309	39	1270	0.126213592	3991	5.932
66	GIREMic0344	70	F	DS	NR	TDP43 probable	0.46	259	35	1234	0.135135135	3863	3.572
67	RICHMic1541	72	M	DS	NR	TDP43 probable	0.48	163	27	737	0.165644172	1435	5.396
68	SPANNun0259	56	F	PSP	NR	Tau probable	0.31	162	32	1112	0.197530864	1624	3.94
69	LOPEDom0548	64	M	PSP	NR	Tau probable	0.26	168	30	985	0.178571429	2170	5.74
70	CHAREli1846	67	F	PSP	NR	Tau probable	0.21	155	26	908	0.167741935	2573	5.1
71	LENOJam1438	79	M	PSP	NR	Tau probable	0.38	178	32	987	0.179775281	3078	4.77
72	DU PAnn2944	68	F	PSP	NR	Tau probable	0.34	386	60	2058	0.155440415	4952	5.4
73	MICHArm0835	77	F	PSP	NR	Tau probable	0.34	299	50	1363	0.16722408	4335	4.22
74	PETIMar2530	83	M	PSP	NR	Tau probable	0.28	290	40	1220	0.137931034	28625	6.66
75	FAYABri0744	68	F	PSP	NR	Tau probable	0.46	292	53	1163	0.181506849	2319	6.59
76	MORAGer2246	69	F	PSP	NR	Tau probable	0.28	229	43	844	0.187772926	1395	5.48
77	LEBLMad2330	84	F	PSP	NR	Tau probable	0.45	163	36	567	0.220858896	2090	6.16
78	GADOAkl0156	61	M	PSP	NR	Tau probable	0.38	331	52	1133	0.157099698	1594	NR
79	DA SAlp2344	68	M	PSP	NR	Tau probable	0.27	465	71	1497	0.152688172	3828	5.93
80	LAGUMar2146	67	F	PSP	NR	Tau probable	0.21	173	18	495	0.104046243	2570	4.32
81	DESMRen1243	67	F	PSP	NR	Tau probable	0.51	324	51	868	0.157407407	3518	5.72
82	TOURMar1847	69	F	PSP	NR	Tau probable	0.26	227	32	573	0.140969163	4198	6.36

N° patient	Code	Age	Sexe	Phénotype clinique	Génétique	Protéine agrégée	Pt (g/L) n = 102	tTau (ng/L) n = 104	pTau (ng/L) n = 104	Aβ 1-42 (ng/L) n = 74	pTau/tTau n = 104	NfL (ng/L) n = 99	tTDP43 (µg/L) n = 100
83	WESPEli1340	75	F	PSP	NR	Tau probable	0.41	196	34	470	0.173469388	5137	5.53
84	FERRMar2043	67	F	PSP	NR	Tau probable	0.38	331	53	524	0.160120846	3402	5.34
85	DEMOMar1651	63	F	PSP	Negative	Tau certain	0.21	84	14	124	0.166666667	NR	5.07
86	PROSNic1550	58	F	DFT	Negative	Tau certain	NR	286	41	883	0.143356643	NR	3.47
87	ALPARam0168	50	M	PSY - dépression	NR	Absence probable	0.6	219	47	1357	0.214611872	1173	3.96
88	BIESMar1146	72	F	PSY - bipolaire	NR	Absence probable	0.36	247	48	921	0.194331984	1189	12.13
89	BOULPau2792	26	F	PSY - dépression	NR	Absence probable	0.19	116	24	939	0.206896552	291	3.71
90	CARDMar2036	82	F	PSY - bipolaire	NR	Absence probable	0.4	278	48	434	0.172661871	2118	6.86
91	CERVMar3056	62	F	PSY - dépression	NR	Absence probable	0.31	145	32	1062	0.220689655	900	4.79
92	CUNHDan0658	60	M	PSY - dépression	NR	Absence probable	0.73	132	29	989	0.21969697	1256	5.97
93	DUJAAnd2636	82	F	PSY - anxiété	NR	Absence probable	0.33	252	44	897	0.174603175	1420	5.2
94	EL HAbd0154	64	M	PSY - dépression	NR	Absence probable	0.3	198	45	1190	0.227272727	1357	6.29
95	GILGSuz1145	73	F	PSY - dépression	NR	Absence probable	0.31	196	31	799	0.158163265	1543	12.4
96	GONCCar0250	68	F	PSY - dépression	NR	Absence probable	0.32	140	32	504	0.228571429	1107	4.86
97	MEURFlo0759	59	M	PSY - dépression	NR	Absence probable	0.46	250	37	1106	0.148	2038	6.36
98	MONTFre2665	53	M	PSY - dépression	NR	Absence probable	0.36	154	25	777	0.162337662	897	3.86
99	MUNNPat1152	66	M	PSY - dépression	NR	Absence probable	0.3	223	39	1131	0.174887892	2178	2.86
100	PIEGBla1367	51	F	PSY - dépression	NR	Absence probable	0.26	209	35	1113	0.167464115	1077	5.57
101	PIOLMar2841	77	F	PSY - anxiété	NR	Absence probable	0.68	291	48	609	0.164948454	1634	5.14
102	POIRNic2073	45	M	PSY - bipolaire	NR	Absence probable	0.37	64	20	633	0.3125	964	2.72
103	PONCRay0152	66	F	PSY - dépression	NR	Absence probable	0.25	169	34	1248	0.201183432	732	3.44
104	QUINJea1859	59	M	PSY - dépression	NR	Absence probable	0.22	213	44	1184	0.20657277	1189	4.04
105	RAPHAnn1348	70	F	PSY - bipolaire	NR	Absence probable	0.24	294	49	1228	0.166666667	1667	5.72
106	ROCHHen0652	66	M	PSY - bipolaire	NR	Absence probable	0.4	198	38	1030	0.191919192	1498	6.94

Annexe 5 : Protocole d'extraction de la protéine TDP43 cérébrale - d'après Sampathu, Neumann *et al.* 2006



Lavage culots par TX Buffer (500 µL) : centrifugation 180 000 g pendant 30 min - 4°C

Reprise culots par TX + S Buffer (5 mL/g) - 500 µL : centrifugation 180 000 g pendant 30 min - 4°C

Reprise culots par SARK Buffer (5 mL/g) - 500 µL

Incubation 1h 22°C sous agitation

Centrifugation 180 000 g pendant 30 min - 22°C

Reprise culot par SDS Buffer (1 mL/g) - 100 µL

Reprise culot par Urea Buffer (1 mL/g) - 100 µL

Centrifugation 25 000 g pendant 30 min - 22°C

Composition des tampons

Tampons	Réactifs	Solvant
Low Salt Buffer (LS)	Tris pH 7.5, 10 mmol/L EDTA 5 mmol/L DTT 1 mmol/L Sucrose 10 % Inhibiteur de protéase	H_2O
Triton-X Buffer (TX)	Triton-X100 1% NaCl 0.5 mol/L	LS Buffer
Triton-X + Sucrose Buffer (TX+S)	Sucrose 30 %	TX Buffer
Sarkosyl Buffer (SARK)	N-lauroylsarcosine 1% NaCl 0.5 mol/L	LS Buffer
SDS Buffer (SDS)	SDS 2% Tris pH 7.6, 50 mmol/L Inhibiteur de protéase	H_2O
Urée Buffer (Urée)	Urée 8 mol/L CHAPS 4% Tris pH 8.5, 30 mmol/L	H_2O

Dementia
and Geriatric
Cognitive Disorders

Dement Geriatr Cogn Disord 2018;46:180–185
DOI: 10.1159/000492963
Received: July 6, 2018
Accepted: August 16, 2018
Published online: September 27, 2018
© 2018 S. Karger AG, Basel
www.karger.com/dem

Original Research Article

C9orf72 Protein Plasmatic Concentrations Are Similar between *C9ORF72* Expansion Carriers and Noncarriers in Frontotemporal Dementia

Anthony Fourier[a, b] Maité Formaglio[c, d] Mathilde Sauvée[e]
Armand Perret-Liaudet[a, b, d] Philippe Latour[a] Muriel Bost[a]
Isabelle Quadrio[a, b, d]

[a]Neurochemistry and Neurogenetics Laboratory, Department of Biochemistry, Lyon University Hospital, Bron, France; [b]BIORAN Team, Lyon Neuroscience Research Center, CNRS UMR 5292, INSERM U1028, Lyon 1 University, Bron, France; [c]Department of Neurology, Lyon University Hospital, Lyon, France; [d]Center for Memory Resources and Research, Hospices Civils de Lyon, Charpennes Hospital, Lyon 1 University, Villeurbanne, France; [e]Department of Neurology, Grenoble University Hospital, Grenoble, France

Keywords
Frontotemporal dementia · *C9ORF72* expansion · C9orf72 protein · Haploinsufficiency

Abstract
Background/Aims: The aim of the study was to assess the theory of haploinsufficiency in *C9ORF72* expansion carriers, the most frequent causative gene of frontotemporal dementia. ***Methods:*** Plasmatic concentrations of C9orf72 protein were measured in 33 patients suspected of familial frontotemporal dementia using an enzyme-linked immunosorbent assay. ***Results:*** No difference was observed between *C9ORF72* expansion carriers (21.2% of patients) and noncarriers (78.8% of patients). C9orf72 protein determination is not a suitable biomarker for screening *C9ORF72* expansion carriers. ***Conclusion:*** Our results provide new evidence against the hypothesis of haploinsufficiency leading to frontotemporal dementia in *C9ORF72* expansion carriers.
© 2018 S. Karger AG, Basel

Introduction

Frontotemporal dementia (FTD) is the second cause of young-onset dementia, after Alzheimer's disease [1]. Up to 50% of FTD patients may present with a positive familial history and 10% of patients have a clear autosomal dominant history [2]. Three genes cause most of familial FTD: *MAPT*, *GRN*, and *C9ORF72*, cited by chronological order of discovery [3].

Anthony Fourier
59 Boulevard Pinel
FR–69677 Bron (France)
E-Mail anthony.fourier@chu-lyon.fr

Downloaded by:
King's College London
137.73.144.138 - 9/28/2018 7:55:16 PM

Dement Geriatr Cogn Disord 2018;46:180–185
DOI: 10.1159/000492963
© 2018 S. Karger AG, Basel
www.karger.com/dem

This last mutation consists of hexanucleotide GGGGCC repeat expansions between noncoding *C9ORF72* exons 1a and 1b [4] and is the most common genetic cause of FTD, accounting for 25% of all familial FTD [5].

Since its discovery in 2011, much research has been done to elucidate pathological mechanisms connecting *C9ORF72* expansion and the clinical and neuropathological disorders observed in FTD patients. Presently, 3 major hypotheses have emerged and are still debated [6]. The first one is a potential loss of function of C9orf72 protein because of the hexanucleotide long expansion: this theory is called haploinsufficiency [7]. Haploinsufficiency can be defined as an inactivation of one allele, leading to a reduction by half of protein levels [8]. This mechanism can already be observed in FTD patients harboring mutations in the progranulin gene *(GRN)*, resulting in reduced secreted progranulin protein [9]. The second mechanism explaining disease with *C9ORF72* repeat expansion would be a gain of RNA toxicity [4]. Finally, the third hypothesis would be a toxicity caused by the formation of repeat-associated non-ATG proteins [10].

The aim of this study was to assess the *C9ORF72* expansion haploinsufficiency theory resulting in FTD, comparing plasmatic C9orf72 protein concentrations between *C9ORF72* expansion carriers and noncarriers.

Material and Methods

Patients

This study included a population of 33 patients aged from 39 to 87 years (16 men and 17 women) who were referred to Lyon and Grenoble Centers for Memory Resources and Research between 2014 and 2016 for a diagnostic evaluation of cognitive impairment. The patients met the diagnosis of probable behavioral variant of FTD (bvFTD) according to Rascovsky criteria [11]. The diagnosis of bvFTD was proposed in a multidisciplinary consultation, taking into account clinical and neuropsychological observations, imaging analysis, and cerebrospinal fluid marker results (i.e., negative Alzheimer's disease profile [12]). Moreover, most patients were suspected of familial FTD [2] because of a family history of neurodegenerative diseases including FTD and/or ALS (amyotrophic lateral sclerosis) in particular. Following genetic counseling, all the patients included in this study gave informed written consent for FTD genetic testing and blood sampling was collected.

Genetic Screening for C9ORF72 *Expansion*

After DNA extraction, the screening for GGGGCC repeat expansions in *C9ORF72* was performed using a repeat-primed PCR (RP-PCR), according to a protocol adapted from the international study from Akimoto et al. [13]. RP-PCR products were separated by capillary electrophoresis using an ABI 3130xL Genetic Analyzer (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA) with Genescan™ 500 ROX Size Standard (Life Technologies®). Data were analyzed using GeneMapper® Software 5 (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). RP-PCR gave qualitative results for *C9ORF72* expansion screening, i.e., positive or negative. Positive cases harbored a typical saw tooth sloping pattern. A cutoff of 30 repeats was used to differentiate positive from negative cases. Otherwise, the genetic testing for *C9ORF72* was considered negative. All positive and negative results were confirmed using Southern blot analysis. Seven patients harbored *C9ORF72* repeat expansions; frequencies were 18.8% (3/16) for male patients and 23.5% (4/17) for female patients, respectively.

Plasmatic C9orf72 Protein Quantification

EDTA whole blood samples were centrifuged at 2,000 *g* for 10 min. Two hundred microliters of plasma aliquots were prepared and stored at –80 °C until further analysis. C9orf72 protein quantification was performed using a Human C9orf72 ELISA kit (Cusabio®, College Park, MD, USA), according to the manufacturer's instructions. The quality of the assay was previously assessed by performing different plates with acceptable analytical criteria defined by good calibration models with r^2 >0.99, a duplicate standard variability below 5%, a linearity of signals (r^2 = 0.996) obtained for samples diluted from 1/5th to 1/30th and a within-run assay coefficient of variation at 5.1% (n = 4 repetitions). Plasmatic C9orf72 protein concentrations (samples diluted 1/10th) were determined in duplicate in the same assay.

Downloaded by:
King's College London
137.73.144.138 - 9/28/2018 7:55:16 PM

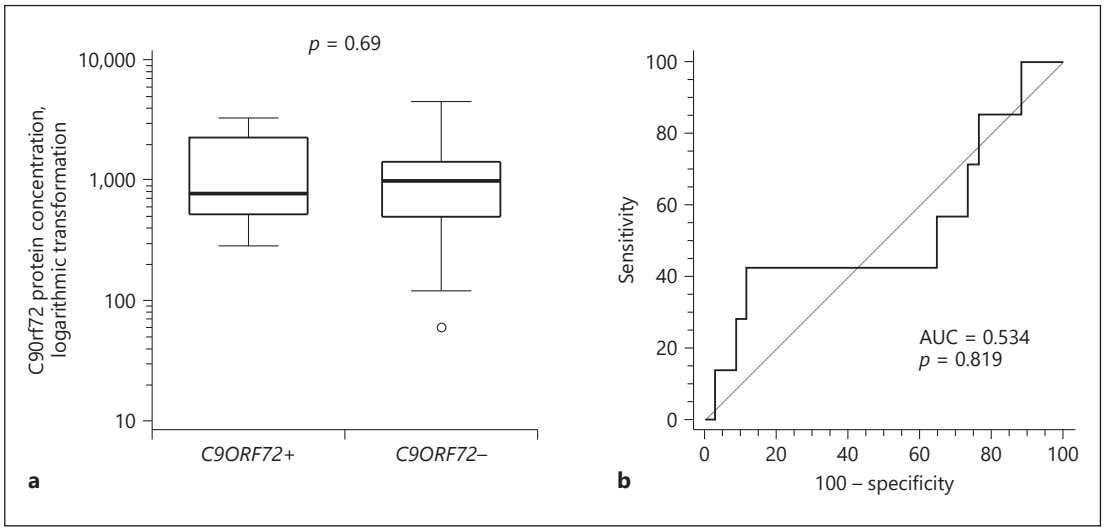


Fig. 1. a Distribution of C9orf72 protein concentration *C9ORF72* expansion carriers and noncarriers. **b** Diagnostic performances of C9orf72 protein to discriminate between *C9ORF72* expansion carriers and noncarriers (ROC curve).

Table 1. Demographic and biological characteristics of the cohort of patients

	C9ORF72 carriers	*C9ORF72* noncarriers	All patients
Demography			
Patients, *n* (%)	7 (21.2)	26 (78.8)	33 (100)
Male/female, %	3/4	13/13	16/17
Age, years	70.9±9.3	67.7±10.7	68.4±10.3
Plasmatic marker			
C9orf72 protein, pg/mL	781 (531–2,256)	876 (447–1,328)	844 (485–1,378)

Age is expressed as mean ± standard deviation. C9orf72 protein concentrations are expressed as median (25th–75th percentile).

Statistics

All the statistics were performed on MedCalc® software, version 15.11.4. The distribution of C9orf72 protein concentrations was assessed using the d'Agostino-Pearson test. Mann-Whitney tests were performed to assess differences in C9orf72 protein concentration regarding the sex of patients and the presence/absence of *C9ORF72* expansion and Spearman's rho was assessed to measure a rank correlation between C9orf72 protein concentrations and age.

Results

Plasmatic C9orf72 protein concentrations ranged from 119 to 4,490 pg/mL in the whole cohort of 33 patients (Table 1). C9orf72 protein concentrations did not follow a normal distribution ($p = 0.0001$). C9orf72 protein concentrations were not influenced by the sex ($p = 0.10$) or the age of the patients ($p = 0.71$).

Plasmatic C9orf72 protein concentrations were not different between *C9ORF72* expansion carriers and noncarriers ($p = 0.69$). The area under the ROC curve was 0.549, with 95% confi-

Downloaded by:
King's College London
137.73.144.138 - 9/28/2018 7:55:16 PM

dence interval ranging from 0.367 to 0.722. The Youden index was 0.313 and the associated criterion was >1,557 pg/mL, giving sensitivity and specificity of 42.9 and 88.5%, respectively (Fig. 1).

Discussion

To our knowledge, our study is the first one reporting C9orf72 protein concentrations measured in the plasma of FTD patients. In this cohort of 33 patients suspected of familial FTD, C9orf72 protein concentrations varied widely from 119 to 4,490 pg/mL, with a median of 844 pg/mL, and were nondependent on the sex or age of the patients. More interestingly, no difference was observed between *C9ORF72* expansion carriers and noncarriers. Indeed, 7 patients presented a large GGGGCC *C9ORF72* expansion using the RP-PCR assay. A full concordance between this assay and Southern blot was obtained (data not shown). Despite the small size of the cohort, the percentage of positive cases was in good concordance with those presented by the different epidemiologic studies performed in Europe [5]. In the same way, no difference concerning sex ratio was observed between *C9ORF72* expansion carriers and noncarriers [14].

Our preliminary findings seem to suggest that haploinsufficiency may not explain clinical expression in bvFTD patients carrying *C9ORF72* expansion. Indeed, one could hypothesize that a potential haploinsufficiency would lead to a significant decrease of plasmatic C9orf72 protein concentration; this phenomenon was observed in *GRN* mutation carriers (symptomatic or not), leading to decreased plasmatic progranulin concentrations [15]. In *C9ORF72* expansion carriers, haploinsufficiency hypothesis was firstly suggested following the observation that all *C9ORF72* mRNA transcripts were decreased in the frontal cortex of FTD patients using quantitative real-time PCR [7, 16]. Unfortunately, immunoblotting assays in the brain were inconclusive, potentially due to nonspecific binding of antibodies [7]. Finally, recent findings showed that *C9ORF72* transcripts were also decreased in *MAPT* and *GRN* mutation carriers [17]. This lack of specificity means that a decrease of *C9ORF72* transcripts is not the only pathological process leading to FTD. In conclusion, plasmatic C9orf72 protein determination seemed not suitable to detect *C9ORF72* expansion carriers in our cohort of patients.

Another hypothesis is a *C9ORF72* gain-of-function mechanism, suggested by much in vitro and in vivo evidence [18]. RNA aggregates or foci were found in different brain regions of *C9ORF72* FTLD patients [19]. These foci might not cause a direct cellular dysfunction [20], but lead to a sequestration of RNA binding proteins and disrupt their normal activity [21, 22]. Finally, an unconventional translation of *C9ORF72* expansions into specific polypeptides was discovered in 2013 [23]. This process was also highlighted in other pathologies (myotonic dystrophy for example) whose molecular mechanism relies on abnormal genetic expansions [24]. Following a noncanonical translation [25], meaning the absence of an initiating codon and multiple reading frames, different proteins – poly(GP), poly(GA) and poly(GR) – can be synthetized in *C9ORF72* expansion carriers and are called C9RAN proteins [23]. The intrinsic toxicity of these C9RAN proteins remains unclear today. However, C9RAN proteins were discovered in the brain [23] and cerebrospinal fluid of symptomatic and asymptomatic *C9ORF72* expansion carriers [26, 27]. These proteins appear to be specific compared to controls or to other neurodegenerative diseases. Further analysis with larger cohorts including the whole spectrum of FTD-ALS should compare diagnostic performances of C9RAN and C9orf72 proteins in FTD.

Downloaded by:
King's College London
137.73.144.138 - 9/28/2018 7:55:16 PM

Statement of Ethics

Following genetic counseling, all the patients included in this study gave informed written consent for FTD genetic testing.

Disclosure Statement

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

1 Neary D, Snowden J, Mann D. Frontotemporal dementia. Lancet Neurol. 2005 Nov;4(11):771–80.
2 Wood EM, Falcone D, Suh E, Irwin DJ, Chen-Plotkin AS, Lee EB, et al. Development and validation of pedigree classification criteria for frontotemporal lobar degeneration. JAMA Neurol. 2013 Nov;70(11):1411–7.
3 Galimberti D, Scarpini E. Genetics of frontotemporal lobar degeneration. Front Neurol. 2012 Apr;3:52.
4 DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. Neuron. 2011 Oct;72(2):245–56.
5 Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S, et al.; Chromosome 9-ALS/FTD Consortium; French research network on FTLD/FTLD/ALS; ITALSGEN Consortium. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. Lancet Neurol. 2012 Apr;11(4):323–30.
6 Todd TW, Petrucelli L. Insights into the pathogenic mechanisms of Chromosome 9 open reading frame 72 (C9orf72) repeat expansions. J Neurochem. 2016 Aug;138 Suppl 1:145–62.
7 Gijselinck I, Van Langenhove T, van der Zee J, Sleegers K, Philtjens S, Kleinberger G, 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. 2012 Jan;11(1):54–65.
8 Seidman JG, Seidman C. Transcription factor haploinsufficiency: when half a loaf is not enough. J Clin Invest. 2002 Feb;109(4):451–5.
9 Wang J, Van Damme P, Cruchaga C, Gitcho MA, Vidal JM, Seijo-Martínez M, et al. Pathogenic cysteine mutations affect progranulin function and production of mature granulins. J Neurochem. 2010 Mar;112(5):1305–15.
10 Yang D, Abdallah A, Li Z, Lu Y, Almeida S, Gao FB. FTD/ALS-associated poly(GR) protein impairs the Notch pathway and is recruited by poly(GA) into cytoplasmic inclusions. Acta Neuropathol. 2015 Oct;130(4):525–35.
11 Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. Brain. 2011 Sep;134(Pt 9):2456–77.
12 Kämäläinen A, Herukka SK, Hartikainen P, Helisalmi S, Moilanen V, Knuuttila A, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease in patients with frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis with the C9ORF72 repeat expansion. Dement Geriatr Cogn Disord. 2015;39(5-6):287–93.
13 Akimoto C, Volk AE, van Blitterswijk M, Van den Broeck M, Leblond CS, Lumbroso S, et al. A blinded international study on the reliability of genetic testing for GGGGCC-repeat expansions in C9orf72 reveals marked differences in results among 14 laboratories. J Med Genet. 2014 Jun;51(6):419–24.
14 Le Ber I, Camuzat A, Guillot-Noel L, Hannequin D, Lacomblez L, Golfier V, et al. C9ORF72 repeat expansions in the frontotemporal dementias spectrum of diseases: a flow-chart for genetic testing. J Alzheimers Dis. 2013;34(2):485–99.
15 Meeter LH, Patzke H, Loewen G, Dopper EG, Pijnenburg YA, van Minkelen R, et al. Progranulin Levels in Plasma and Cerebrospinal Fluid in Granulin Mutation Carriers. Dement Geriatr Cogn Disord Extra. 2016 Jul;6(2):330–40.
16 Belzil VV, Bauer PO, Prudencio M, Gendron TF, Stetler CT, Yan IK, et al. Reduced C9orf72 gene expression in c9FTD/ALS is caused by histone trimethylation, an epigenetic event detectable in blood. Acta Neuropathol. 2013 Dec;126(6):895–905.
17 Rizzu P, Blauwendraat C, Heetveld S, Lynes EM, Castillo-Lizardo M, Dhingra A, et al. C9orf72 is differentially expressed in the central nervous system and myeloid cells and consistently reduced in C9orf72, MAPT and GRN mutation carriers. Acta Neuropathol Commun. 2016 Apr;4(1):37.
18 Haeusler AR, Donnelly CJ, Rothstein JD. The expanding biology of the C9orf72 nucleotide repeat expansion in neurodegenerative disease. Nat Rev Neurosci. 2016 Jun;17(6):383–95.
19 Mizielinska S, Lashley T, Norona FE, Clayton EL, Ridler CE, Fratta P, et al. C9orf72 frontotemporal lobar degeneration is characterised by frequent neuronal sense and antisense RNA foci. Acta Neuropathol. 2013 Dec;126(6):845–57.

Downloaded by:
King's College London
137.73.144.138 - 9/28/2018 7:55:16 PM

20 Peters OM, Cabrera GT, Tran H, Gendron TF, McKeon JE, Metterville J, et al. Human C9ORF72 Hexanucleotide Expansion Reproduces RNA Foci and Dipeptide Repeat Proteins but Not Neurodegeneration in BAC Transgenic Mice. Neuron. 2015 Dec;88(5):902–9.
21 Cooper-Knock J, Walsh MJ, Higginbottom A, Robin Highley J, Dickman MJ, Edbauer D, et al. Sequestration of multiple RNA recognition motif-containing proteins by C9orf72 repeat expansions. Brain. 2014 Jul;137(Pt 7):2040–51.
22 Haeusler AR, Donnelly CJ, Periz G, Simko EA, Shaw PG, Kim MS, et al. C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. Nature. 2014 Mar;507(7491):195–200.
23 Ash PE, Bieniek KF, Gendron TF, Caulfield T, Lin WL, Dejesus-Hernandez M, et al. Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. Neuron. 2013 Feb;77(4):639–46.
24 Cleary JD, Ranum LP. Repeat-associated non-ATG (RAN) translation in neurological disease. Hum Mol Genet. 2013 Oct;22(R1):R45–51.
25 Gendron TF, Bieniek KF, Zhang YJ, Jansen-West K, Ash PE, Caulfield T, et al. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. Acta Neuropathol. 2013 Dec;126(6):829–44.
26 Su Z, Zhang Y, Gendron TF, Bauer PO, Chew J, Yang WY, et al. Discovery of a biomarker and lead small molecules to target r(GGGGCC)-associated defects in c9FTD/ALS. Neuron. 2014 Sep;83(5):1043–50.
27 Lehmer C, Oeckl P, Weishaupt JH, Volk AE, Diehl-Schmid J, Schroeter ML, et al. German Consortium for Frontotemporal Lobar D, Schludi MH, Arzberger T, Kremmer E, Flatley A, Feederle R, Steinacker P, Weydt P, Ludolph AC, Edbauer D, Otto M: Poly-GP in cerebrospinal fluid links C9orf72-associated dipeptide repeat expression to the asymptomatic phase of ALS/FTD. EMBO Mol Med. 2017 Jul;9(7):859–68.

Downloaded by:
King's College London
137.73.144.138 - 9/28/2018 7:55:16 PM

EFFICACITÉ DES BIOMARQUEURS DU LCR POUR DISCRIMINER LES TROUBLES PSYCHIATRIQUES PRIMAIRES DES DÉMENCES FRONTOTEMPORALES (DFT)

A. FOURIER[1,2], M. FORMAGLIO[3,4], H MOLLION[4,5], A. PERRET-LIAUDET[1,2,4], M. SAUVÉE[6], I. QUADRIO[1,2,4]

[1] Service de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand Est, HCL, France
[2] Equipe BIORAN, CRNL, CNRS UMR 5292, INSERM U1028, Université de Lyon, France
[3] Service de neuro-cognition et neuro-ophtalmologie, HCL, France
[4] Centre Mémoire de Recherche et de Ressources, HCL, France
[5] Service de Neuropsychologie, HCL, France
[6] Département de Neurologie, CHU de Grenoble, France

INTRODUCTION

Des symptômes neuropsychiatriques comme l'apathie, les troubles du comportement ou encore les manifestations hallucinatoires, sont fréquemment observés chez les patients atteints de maladies neurodégénératives. Parmi ces dernières, le diagnostic différentiel entre démence fronto-temporale (DFT) et maladie psychiatrique peut se révéler particulièrement ardu : au moment du diagnostic de DFT, plus de 50 % des patients avaient auparavant été adressés en psychiatrie (Woolley JD., *J Clin Psychiatry*, 2011).

OBJECTIFS

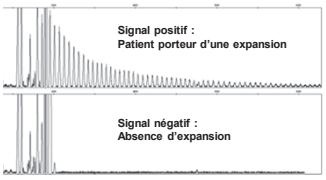
Les biomarqueurs du LCR (marqueurs de la maladie d'Alzheimer et neurofilaments) peuvent-ils différencier les patients atteints de troubles psychiatriques de ceux atteints de DFT ?

MÉTHODES

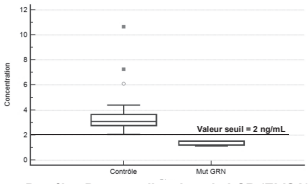
L'étude a inclus **41 patients** (20 hommes et 21 femmes) âgés de 45 à 84 ans. Ces patients ont été adressés aux Centres Mémoire de Ressources et de Recherche (CMRR) de Lyon et de Grenoble pour une évaluation diagnostique d'un déclin des fonctions cognitives. Le diagnostic final était discuté en **Réunion de Concertation Pluridisciplinaire** en intégrant l'évaluation clinique et neuropsychologique, ainsi que les résultats d'imagerie et de biologie.

21 patients étaient atteints de **DFT-TDP43 certaine** :
- 15 patients porteurs d'une expansion sur le gène *C9ORF72*
- 5 patients porteurs d'une mutation sur le gène *GRN*
- 1 patient autopsié *a posteriori* (mise en évidence d'agrégats TDP43)

20 patients étaient atteints de **maladie psychiatrique primaire** :
- 14 patients atteints d'un épisode dépressif
- 4 patients atteints de troubles bipolaires
- 2 patients atteints de troubles anxieux et alcooliques



Expansions sur le gène *C9ORF72* (RP-PCR)



Protéine Progranuline dans le LCR (ELISA)

DÉPISTAGE DES ANOMALIES GÉNÉTIQUES SUR LES GÈNES *C9ORF72* et *GRN*

Les biomarqueurs du LCR ont été mesurés par technique **ELISA**
- Protéine Tau totale, protéine Tau phosphorylée en position 181 (phosphoTau) et peptide amyloïde Aβ 1-42 (Innotest, Fujirebio, Belgique)
- Neurofilaments chaîne légère NFl (UmanDiagnostics, Suède)

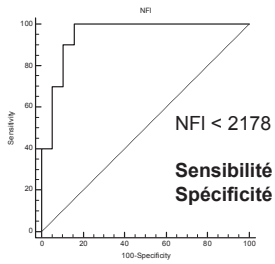
RÉSULTATS

Les **performances diagnostiques** des **neurofilaments (NFl)** ont été étudiées selon 2 approches :

Approche globale

Dosage des NFl pour tous les patients

n = 41



NFl < 2178 pg/mL

Sensibilité : 100 %
Spécificité : 84,2 %

Au final : 3 patients DFT mal classés

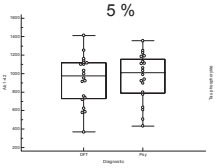
Approche séquentielle

1\ Dosage des marqueurs MA pour tous les patients

n = 41

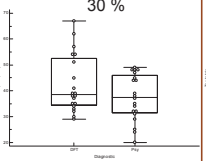
pour une sensibilité fixée à 100 %

Spécificité Aβ 1-42 5 %



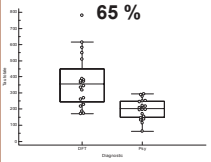
Aβ 1-42 > 366 ng/L

Spécificité phosphoTau 30 %



phosphoTau < 49 ng/L

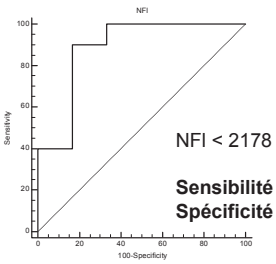
Spécificité Tau totale 65 %



Tau < 294 ng/L

2\ Dosage des NFl si Tau < 294 ng/L

n = 26 (20 PSY et 6 DFT)



NFl < 2178 pg/mL

Sensibilité : 100 %
Spécificité : 66,7 %

Au final : 2 patients DFT mal classés

DISCUSSION & CONCLUSION

Le dosage systématique des neurofilaments offre de très bonnes performances diagnostiques : ce test classe correctement tous les patients atteints de troubles psychiatriques et 18 patients DFT sur 21.

L'approche séquentielle (association des NFl à la protéine Tau totale) permet d'améliorer encore la spécificité diagnostique : seuls 2 patients sur 41 sont mal classés. De plus, cette stratégie de dosage séquentiel permet de diminuer le nombre de dosages de NFl réalisés, et ainsi d'en maîtriser leur coût.

Mol Neurobiol
DOI 10.1007/s12035-017-0607-2

Detection of CSF 14-3-3 Protein in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Patients Using a New Automated Capillary Western Assay

A. Fourier[1,2] · A. Dorey[1,3] · A. Perret-Liaudet[1,2,3] · I. Quadrio[1,2,3]

Received: 14 March 2017 / Accepted: 8 May 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) is a fatal rapidly progressive dementia. The detection of 14-3-3 protein in cerebrospinal fluid (CSF) is included in the WHO diagnostic criteria for the pre-mortem diagnosis of CJD. The aim of this study is to assess CSF 14-3-3 protein analytical and diagnostic performances using a new automated capillary Western technology (Simple Western technology-SW). For the validation of this assay, samples from a cohort of 268 patients suspected from sCJD were analyzed: 77 sCJD (including 40 definite sCJD) and 191 non-CJD samples were tested using both SW and the current Western Blot (WB) assays. Automated capillary Western determination provided better analytical performances than WB with a lower intra- and inter-assay variability. Analytical interferences such as hemolysis and high total protein concentration known to lead to false positive WB results were also assessed using SW assay: unfortunately, these interferences still remain confounders of CSF 14-3-3 protein determination. Finally, automated capillary Western assay's sensitivity and specificity were superior to those of WB assay (93.5 and 95.3%, respectively, compared to 92.2 and 84.8% for WB). In conclusion, with a shorter time of analysis than WB assays' (4 h versus 1.5 day), automated capillary Western assay is an excellent routine alternative method to the currently performed WB assay for CSF 14-3-3 protein detection in patients suspected of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.

Keywords Creutzfeldt-Jakob disease · 14-3-3 protein · Immunoblotting · Automation · Sensitivity and specificity · Dementia

Introduction

Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) is a fatal rapidly progressive dementia afflicting individuals with a mean age of onset around 65 [1, 2]. sCJD is a rare cause of dementia, whose annual incidence is approximately estimated at 1 to 2 cases per 1,000,000 persons [3, 4]. sCJD is difficult to diagnose: on one hand, clinical diagnosis is often problematic since sCJD cases may present non-specific psychiatric disturbances and, in many instances, sCJD diagnosis is hard to distinguish clinically from other dementias, including Alzheimer's disease and Lewy body dementia [5–8]; on the other hand, many pathologic conditions simulate the clinical pattern of sCJD including lymphomas, cerebrovascular amyloidosis, or cerebral hypoxic lesions [9].

The determination of 14-3-3 protein, a biochemical biomarker in Cerebrospinal Fluid (CSF), is a highly sensitive and specific assay for the pre-mortem diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) [10–12]. The positivity of CSF 14-3-3 protein associated with rapidly progressive dementia, clinical features (i.e., myoclonus, visual or cerebellar symptoms, pyramidal/extrapyramidal syndromes, or akinetic mutism), and the absence of alternative diagnosis defines a probable sCJD, according to the World Health Organization [13] and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) diagnostic criteria for CJD (https://www.cdc.gov/prions/cjd/diagnostic-criteria.html). These guidelines

✉ A. Fourier
anthony.fourier@chu-lyon.fr

1 Neurochemistry Laboratory, Biochemistry Department, Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Bron, France

2 BIORAN Team, Lyon Neuroscience Research Center, CNRS UMR 5292, INSERM U1028, Lyon 1 University, Bron, France

3 Center for Memory Resources and Research, Hospices Civils de Lyon, Charpennes Hospital, Lyon 1 University, Villeurbanne, France

Published online: 16 May 2017

also include other biomarkers such as suggestive electroencephalography (EEG presenting characteristic triphasic sharp wave complexes) and specific magnetic resonance imaging signal abnormalities [14, 15] (including high-signal intensity, on either FLAIR or DWI, in the basal ganglia or in at least two cortical regions from either the temporal, parietal, or occipital cortices).

The 14-3-3 protein is a 30-kDa protein abundant in the brain, particularly inside neuronal cytoplasm, glia, and synaptic membranes [16]. This protein plays an important role on signal transduction, neurotransmission, and cell differentiation and is released into CSF along with extensive neuronal damage [17]. To date, 7 isoforms of 14-3-3 protein are known. Over the years, some isoforms of this protein were described to increase in sCJD patients' CSF compared to CSF of patients without prion disease [9, 10, 18]. Concretely, the 14-3-3 protein β, γ, ε, and η isoforms are detectable in CSF of sCJD patients [19, 20].

14-3-3 detection in CSF of suspected sCJD patients is usually performed through Western Blot (WB) technique, the gold standard assay, allowing a dichotomous result, i.e., positive or negative [11, 20, 21]. This qualitative technique is time-consuming (1.5 day for our current assay) and is generally associated to inter-assay variability around 35% [22].

Facing an increase in 14-3-3 test referrals in CJD reference laboratories [23], the aim of this study was to develop and assess a new automated capillary Simple Western (SW) technology, drastically reducing the time of CSF 14-3-3 protein analysis to 4 h. The assessment of SW assay analytical and diagnostic performances was compared to those obtained with the current WB assay in a population of 268 patients suspected of sCJD.

Material and Methods

Study Population

This retrospective study included a population of 268 patients undergoing a lumbar puncture for the evaluation of CSF 14-3-3 protein in the frame of CJD diagnosis. Lumbar puncture was addressed to Neurochemistry Laboratory (Hospices Civils de Lyon, France) to support a suspicion of CJD or a differential diagnosis between CJD and other rapidly progressive dementias. Samples were collected between 2008 and 2016. After centrifugation, CSF supernatants were frozen at −80 °C until further analysis.

The population of 268 patients included 77 sCJD with unambiguous CSF 14-3-3 protein results. According to the WHO diagnostic criteria [13, 15], 37 fulfilled the diagnosis of "probable sCJD" and 40 were "definite sCJD" confirmed by neuropathological examination after autopsy driven in our P3 laboratory. Amongst the 77 sCJD patients, 71 patients had a positive WB for CSF 14-3-3 protein and 6 patients had a negative WB (sensitivity established at 92.2% for WB).

Concerning the non-CJD patients, CJD diagnosis was excluded by neurologists and the French surveillance network of CJD [24]. The clinical probable diagnosis was proposed by neurologists regarding clinical data, imaging/biological markers, and disease evolution. The non-CJD population was composed of 191 patients with unambiguous CSF 14-3-3 protein result: 131 other neurodegenerative dementias, 9 Normal Pressure Hydrocephalus, 7 metabolic encephalopathies, 14 psychiatric conditions, 6 epilepsies, 1 neoplastic syndrome, 2 infectious CNS syndromes, 2 autoimmune diseases, and 19 patients with other causes. Amongst these 191 non-CJD patients, 29 had a positive WB for CSF 14-3-3 protein, and 162 had a negative WB (specificity established at 84.8% for WB).

This study, based on biological samples collected for routine diagnosis, was not considered as "biomedical research" under French regulations and therefore did not require supplemental informed consent. Samples were stored in a bio bank with authorization from the French Ministry of Health (Declaration Number DC-2008-304). Collected data included age, gender, date of lumbar puncture, and CJD clinical/neuropathological diagnosis. Authorization for handling personal data was granted by the French data protection commission [*Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés* (CNIL)].

CSF Analysis

CSF Total Protein Concentration Assay

CSF total proteins were measured using a benzethonium chloride assay on Architect c16000 analyzer (Abbott Diagnostics®, Santa Clara, CA, USA).

Western Blot Assay

14-3-3 protein immunoassay was performed by Western blot analysis as described before [25]. Briefly, 75 microliters of CSF samples were denatured with a solution containing Tris 0.05 M pH 7.4, SDS 10%, DTT 1%, and glycerol heated at 98 °C for 5 min. The proteins were separated on an ExcelGel® SDS Homogeneous 15 for SDS-PAGE (GE Healthcare®, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane and blocked overnight with 1% nonfat-dried milk in Tris Buffer Saline (TBS). The membranes were incubated for 2 h with the primary anti-14.3.3 antibody 1/400th (β K19: sc-629, Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, TX, USA). After incubation, three washes were performed in TBS-0.1% nonfat-dried milk. Then membranes were saturated with alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit second antibody 1/1000th (sc-2057, Santa

Cruz Biotechnology®, Dallas, TX, USA) during 1 h and washed three more times with TBS-0.1% nonfat-dried milk and once with TBS. Finally, the colorimetric revelation was performed incubating 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium (Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA) during 5 min. The 14-3-3 protein band in CSF samples was optically observed and compared to known specimen to permit a characterization as negative or positive sample.

Automated Capillary Western Assay

Peggy Sue® 12–230 k Dalton (kDa) size assays were carried out: each analysis cycle was composed of 12 capillaries including a ladder and 11 CSF samples. Six microliters of CSF samples were denatured with a Fluorescent Master Mix® containing fluorescent molecular weight markers and 200 mM dithiotreitol, according to Protein Simple© recommendations. The mixtures were heated at 95 °C during 5 min. Primary anti-14-3-3 antibody (γ C-16: sc-731, Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, TX, USA) and 10× System Control (10xSC) primary rabbit antibody were diluted with antibody diluent to obtain a final dilution of 1/100th and 1/40th, respectively. Samples, blocking reagent, mix of primary antibodies, HRP conjugated second antibodies, chemiluminescent substrate, separation, and stacking matrices were dispensed to designated wells in a 384-well plate. The plate was then loaded on the Peggy Sue® platform to perform the different steps of separation electrophoresis and immunodetection automatically. Briefly, the proteins were separated inside a capillary per sample during 45 min and fixed on the surface of these capillaries. The incubations of primary antibodies and second antibody lasted 1 h and 30 min, respectively. Finally, the chemiluminescent revelation was performed incubating capillaries with a mix of luminol and peroxide. The determination of the size, areas, heights, and signal to noise (S/N) ratios of 14-3-3 protein and 10× System Control protein (used as internal standard) was automatically calculated on Compass for Simple Western® software, version 3.0.9. A composite criterion, called areas ratio, was also calculated to introduce the use of 10xSC protein as an internal standard. The formula of areas ratio was (area of 14-3-3 protein/area of 10× SC protein) × 10,000.

Analytical Performances Evaluation

Intra-assay and inter-assay variability of both techniques were assessed using 2 CSF positive quality controls (QC) previously analyzed with WB assay: the first one with a strong 14-3-3 band intensity and the second one with a faint 14-3-3 band intensity. The determination of the 14-3-3 protein signals was quantified calculating area 14-3-3 and areas ratio for automated capillary Western assay. To perform a quantitative evaluation of Western blot variability, some membranes were read out using ChemiDoc XRS (BioRad®, Hercules, CA, USA) and Quantity One® software to calculate the band intensity signal correlated to the amount of 14-3-3 protein. Results were expressed as percentage coefficient of variation for CSF 14-3-3 protein determination.

Human recombinant histidine-tagged 14-3-3 γ protein (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) was spiked into negative 14-3-3 protein CSF to assess 14-3-3 protein detection and size using SW assay. Other spiking assays were performed to analyze the influence of hemolysis and total protein concentration into CSF samples, according to an adapted protocol [26]. A red blood cell lysate containing 71 g/L hemoglobin was prepared: hemoglobin was measured on ABL800 Flex (Radiometer®, Copenhagen, Denmark). This lysate was spiked into a limpid negative 14-3-3 CSF sample to create a likely visible hemolyzed sample (0.28 g/L hemoglobin, by dilution of red blood cell lysate 1/250th) and a strongly visible hemolyzed sample (1.42 g/L hemoglobin, by dilution of red blood cell lysate 1/50th). Plasma containing 80 g/L total proteins (Biuret protocol on Architect c16000 analyzer) was diluted and spiked (5% volume/volume) into the same negative 14-3-3 CSF sample with proteins at 0.43 g/L to increase its total protein final concentration (from 1 to 4 g/L). Finally, the neat CSF sample, the likely visible and strongly visible hemolyzed samples and the increased total protein concentrations samples were analyzed in the same automated capillary assay.

Statistical Analysis

Mann-Whitney test and chi-square test were performed to assess differences between continuous and categorical variables respectively. Receiver operating characteristics (ROC) curves were performed to assess the diagnostic performances of CSF 14-3-3 protein regarding CJD status. Optimal cutoff values, sensitivity, and specificity were calculated using the Youden index [Se + (1–Sp)]. All the statistics were performed on MedCalc® software, version 15.11.4.

Results

Detection of CSF 14-3-3 Protein Using Automated Capillary Western Assay

Figure 1 represents the detection of 14-3-3 protein and recombinant histidine-tagged 14-3-3 protein, with both automated capillary Western (Fig. 1a, b) and Western Blot assays (Fig. 1c). Recombinant 14-3-3 protein was spiked into a negative 14-3-3 protein non-CJD CSF sample (S1). A representation of a positive CSF 14-3-3 protein sCJD sample (S2) and a negative CSF 14-3-3 protein non-CJD sample (S3) are also shown.

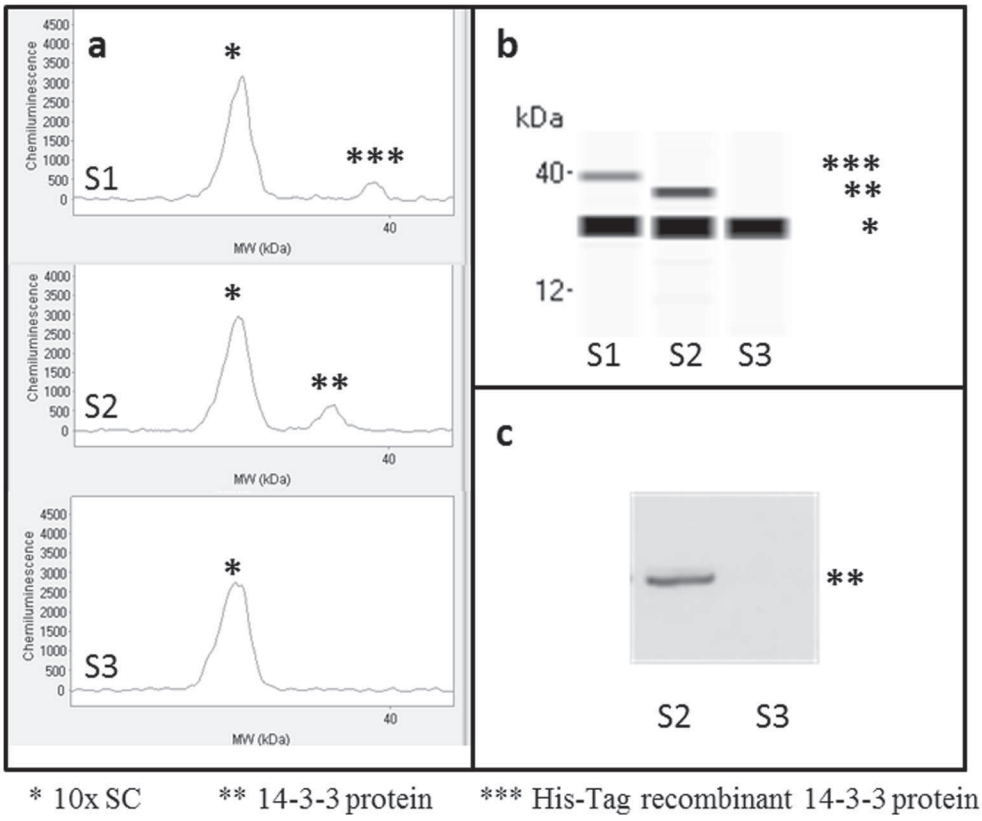


Fig. 1 Detection of His-Tag recombinant 14-3-3 protein or endogenous 14-3-3 protein in CSF samples. **a** Graph view and **b** lane view of Compass for Simple Western® software representing electropherograms with automated capillary Western assay (10× SC protein, used as internal standard at ≈26 kDa, 14-3-3 protein at ≈35 kDa and His-Tag recombinant 14-3-3 protein at ≈39 kDa). **c** Western Blot results of CSF 14-3-3 protein, a band can be seen for positive samples at ≈35 kDa. *S1* His-Tag recombinant protein spiked in a negative 14-3-3 CSF sample, *S2* a positive 14-3-3 sCJD CSF sample, *S3* a negative 14-3-3 non-CJD CSF sample

Diagnostic Performances of Automated Capillary Western Assay

Table 1 presents the comparison between the sCJD and non-CJD populations, regarding demography, total proteins of CSF samples and automated capillary Western results.

No difference was observed between the two populations concerning gender, age, or CSF total protein concentrations. 14-3-3 protein expression using automated capillary Western assay was statistically different between sCJD and non-CJD populations, whatever its mode of quantification (area 14-3-3, height 14-3-3, S/N 14-3-3 and the composite criterion areas ratio). The diagnostic performances of the four different SW expressions of CSF 14-3-3 protein are illustrated in Table 2.

All the four SW quantifications of CSF 14-3-3 protein (area 14-3-3, height 14-3-3, S/N 14-3-3 and areas ratio) gave coherent results with an AUC higher than 0.900 (p value <0.0001). Regarding Youden index, the criterion area 14-3-3, and the composite criterion areas ratio were the best to classify patients (Youden index at 0.8775 and 0.8879, respectively). Using the cutoff value at 1956 for the criterion area 14-3-3, the sensitivity and specificity were at 93.5 and 94.2%, respectively (5 sCJD CSF samples were classified as negative and 11 non-CJD CSF samples were classified as positive by SW assay). Using the cutoff value at 235 for the composite criterion areas ratio, the sensitivity was the same—93.5%—and the specificity was slightly increased at 95.3% (five sCJD CSF samples were classified as negative and nine non-CJD CSF samples were classified as positive by SW assay).

Analytical Performances of Automated Capillary Western Assay

The results obtained for variability using SW and WB assays are presented in Table 3. Two positive CSF quality controls

Table 1 Comparison of sCJD and non-CJD populations regarding demography, CSF total protein concentrations, and automated capillary Western results

	sCJD (n = 77)	Non-CJD (n = 191)
Demography		
Gender, M/F	31/46	96/95
Age, years	71.0 (52.4–86.7)	72.0 (54.1–86.0)
CSF samples		
Total proteins, g/L	0.39 (0.26–0.70)	0.40 (0.23–0.68)
Automated capillary Western results		
Area 14-3-3	7259 (1723–26,744)*	411 (0–2040)
Height 14-3-3	512 (99–1977)*	32 (0–199)
S/N 14-3-3	13.2 (2.8–40.0)*	2.9 (1.1–7.3)
Areas ratio	872 (195–3149)*	60 (0–234)

Data expressed as median (5th–95th percentile), *p < 0.0001 versus non-CJD

Table 2 Diagnostic performances of the 4 Simple Western expressions of CSF 14-3-3 protein

	AUC (95% CI)	Youden index	Criterion	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Area 14-3-3	0.973 (0.946–0.989)	0.8775	>1956	93.5	94.2
Height 14-3-3	0.971 (0.943–0.987)	0.8488	>147	92.2	92.7
S/N 14-3-3	0.913 (0.873–0.944)	0.7420	>5.2	85.7	88.5
Areas ratio	0.968 (0.939–0.985)	0.8879	>235	93.5	95.3

(QC) were analyzed in the same assay (intra-assay variability) or in different assays (inter-assay variability). The variability of SW assay was assessed using both area 14-3-3 and areas ratio since these two quantification modes showed the best diagnostic performances for SW assay (see Table 2).

Globally, SW assay provided a better intra-assay and inter-assay variability than WB assay, whatever the intensity of the 14-3-3 protein signal (strong positive or faint positive 14-3-3 protein band on CSF QC samples). Comparing SW assay quantification modes (area 14-3-3 and areas ratio), intra-assay variability was considered equal for both quantification modes. However, a difference in the inter-assay variability could be seen, the lowest was obtained for areas ratio expression. Indeed, the inter-assay variability decreased by 5 and 4 percentage points regarding strong positive or faint positive 14-3-3 protein band respectively on CSF QC samples using areas ratio instead of area 14-3-3 (Table 3). Consequently, the composite criterion areas ratio was chosen to compare SW and WB assays in subsequent assays regarding both its analytical and diagnostic performances.

Table 4 gives the distribution of the 268 CSF samples regarding both SW and WB assays:

A correct classification of CSF samples, considered as the addition of the populations of SW positive/WB positive samples (77/268) and SW negative/WB negative samples (164/268) was obtained for 241 samples (89.9% of the cohort of 268 patients).

The 27 CSF samples with a different classification between SW and WB assays were characterized regarding their belonging to sCJD or non-CJD populations. Amongst the 23 SW negative/WB positive samples, 22 were non-CJD patients: automated capillary western assay provided a better specificity than Western Blot assay. Amongst the 4 SW positive/WB negative samples, 2 were definite sCJD patients with areas ratio at 330 and 448, respectively. Finally, 4 sCJD samples remained negative using both assays: these patients were all definite sCJD (areas ratio at 34, 73, 155, and 194, respectively).

Table 5 indicates the results obtained during hemolysis and protein spiking assays. The size of the detected 14-3-3 peak using Compass for Simple Western software®, the values calculated for the composite criterion areas ratio and the interpretation of areas ratio are shown.

Hemolysis and total protein concentration in CSF were found in our study as confounders leading to a misinterpretation of 14-3-3 protein results. Indeed, a strongly visible hemolysis and/or CSF total proteins ≥1.5 g/L could lead to positive 14-3-3 protein results.

Discussion

For the first time, a new automated capillary Western assay was developed using Peggy Sue® platform (Protein Simple©) in order to detect CSF 14-3-3 protein, providing a format adapted to the routine biological diagnosis of CJD. Endogenous 14-3-3 protein and recombinant histidine-tagged 14-3-3 protein were correctly detected using automated capillary Western technology (Fig. 1). The four different modes of quantification of 14-3-3 protein signal (i.e., area 14-3-3, height 14-3-3, S/N 14-3-3, and the composite criterion areas ratio) gave all excellent results to discriminate between sCJD and non-CJD patients (Table 1). The criterion area 14-3-3 and the composite criterion areas ratio presented the best

Table 3 SW and WB variability analyzing 2 CSF positive quality controls

	WB assay (%)	SW assay Area 14-3-3(%)	SW assay Areas ratio (%)
Intra-assay variability (n = 5 repeats)			
Positive CSF QC1 (strong 14-3-3 band)	10	6	7
Positive CSF QC2 (faint 14-3-3 band)	30	13	12
Inter-assay variability (n = 20 repeats)			
Positive CSF QC1 (strong 14-3-3 band)	34	22	17
Positive CSF QC2 (faint 14-3-3 band)	39	29	25

QC1 with a strong 14-3-3 protein band and QC2 with a faint 14-3-3 protein band using WB

Table 4 Distribution of the 268 sCJD and non-CJD samples according to their 14-3-3 protein results using both SW and WB assays

	sCJD	Non-CJD	Total
Concordant results			
SW+/WB+	70	7	77
SW−/WB−	4	160	164
Discordant results			
SW+/WB−	2	2	4
SW−/WB+	1	22	23
Total	77	191	268

An SW assay was considered positive if areas ratio > 235

diagnostic performances with Youden indexes at 0.878 and 0.888, respectively. According to the variability assay results, areas ratio was the criterion chosen in our study to discriminate sCJD and non-CJD patients. Indeed, variability was lower with this mode of quantification using SW assay, especially focusing on inter-assay variability (Table 2). In addition, the use of this composite criterion ensured a supplemental analytical control, with the presence of one peak at least (10× SC protein) and two peaks for positive samples (10× SC and 14-3-3 proteins) in each capillary.

Areas ratio criterion calculated in SW assay provided better analytical performances than WB assay with lower intra- and inter-assay variability for a strong positive 14-3-3 protein QC sample at 7 and 17%, respectively (Table 3). Analyzing the same sample, intra- and inter-assay variability of WB assay were 10 and 34%, respectively, which is consistent with data from the literature [22]. Variability was higher with a faint positive QC sample, which is a commonly observed for the majority of immunoassays (Table 3). These good performances of SW assay were partly explained by the automation of the assay, improving protocols reproducibility (incubation time with antibodies, standardized revelation). Miniaturization also provided a decrease of antibodies uptake, allowing a less frequent variation of antibodies batches, at the origin of a great variability [27]. The automation of CSF 14-3-3 protein assay including an easier waste management also enhanced safety for technical staff manipulating potentially infectious CSF. Finally, CSF 14-3-3 protein detection using SW assay provided a shorter deadline to obtain results (4 h for the first samples) than WB assay, a method known for its time consumption (currently 1.5 day including an overnight saturation). The rapidity of this assay conjugated to its automation is helpful to deliver a result quickly. Indeed, in case of suspicion of sCJD in a patient with rapid cognitive and neurologic degradation, a negative CSF 14-3-3 could reorient diagnosis to other neurological disorders, some of them being curable [28, 29].

As for WB assay, CSF intrinsic properties such as hemolysis or total protein concentration were crucial confounders that should be determined before analysis [23]. Indeed, a strongly visible hemolysis led to a positive 14-3-3 result. This observation is explained by the physiological presence of 14-3-3 inside red blood cells [30]. Total protein concentrations in CSF higher than 1.5 g/L also led to apparent positive 14-3-3 protein results. However, the size of protein detected with SW assay was below the expected size of endogenous 14-3-3 protein (33 versus 35 kDa, respectively). For high total protein concentration samples, a careful observation of graph views was required in addition to the calculation of areas ratio for a correct interpretation of results. In accordance with the red blood cell lysate and proteins spiking assays, the detection of CSF 14-3-3 protein should not be performed for strongly visible hemolyzed or high total protein CSF samples (Table 5). Unfortunately, SW assay does not therefore bring any analytical improvement comparing to WB assay concerning these particular samples.

In the retrospective sCJD and non-CJD cohorts chosen for the study, automated capillary Western assay's sensitivity and specificity were superior to those of Western Blot assay (93.5

Table 5 CSF hemolysis and protein spiking assays

CSF sample	Size (kDa)	Areas ratio	Interpretation[a]
Hemolysis			
Neat CSF (limpid)	35	118	Negative
Likely visible hemolysis (hemoglobin 0.28 g/L)	35	138	Negative
Strongly visible hemolysis (hemoglobin 1.42 g/L)	35	919	Positive
Total protein concentration			
Neat CSF (0.43 g/L)	35	118	Negative
Protein-spiked CSF (1 g/L final)	35	102	Negative
Protein-spiked CSF (1.5 g/L final)	33	1109	Positive
Protein-spiked CSF (2.5 g/L final)	33	1560	Positive
Protein-spiked CSF (4 g/L final)	33	3751	Positive

[a] Positive 14-3-3 protein result if areas ratio > 235; negative 14-3-3 protein result if areas ratio ≤ 235

and 95.3% respectively for areas ratio, compared to 92.2 and 84.8% for the current WB assay). The results obtained for both assays were consistent to a meta-analysis published by Muayqil et al., reporting an average sensitivity and specificity of CSF 14-3-3 protein assay at 92 and 80%, respectively [31]. More precisely, SW assay's diagnostic performances were similar to CSF 14-3-3 protein determination performed with an ELISA assay [23, 32–34], supposed to yield more consistent results than WB assay [34]. However, ELISA assays are known to provide lower intra- and inter-assay variability. In our cohort of patients, four definite sCJD patients had a negative CSF 14-3-3 protein result using both SW and WB assays. Sensitivity of CSF 14-3-3 protein is not perfect and some sCJD patients may present negative CSF 14-3-3 results, especially in some specific clinical onsets [2]. The absence of CSF 14-3-3 protein could also be explained by the time when lumbar puncture was performed regarding disease onset, the sensitivity of CSF 14-3-3 determination increasing with disease course [25]. If clinical features persist, a second detection of CSF 14-3-3 protein should be performed on another lumbar puncture. Likewise, samples with area ratio next to the cutoff value at 235 should be carefully interpreted and re-analyzed on another run since inter-assay variability of SW assay was 25% for a faint positive CSF sample. On the other side, CSF 14-3-3 protein is a surrogate marker of sCJD [10] increasing with extensive brain damage [35], explaining its potential lack of specificity [11, 36, 37]. To counteract CSF 14-3-3 determination drawbacks, a lot of efforts have been done to develop other surrogate markers of CJD. In CJD patients, increases of total tau protein—another marker of neuronal lysis—and alpha-synuclein—a marker of synaptic degeneration—were observed [38, 39]. Diagnostic performances of these markers are similar or better than those of 14-3-3 protein, with sensitivity and specificity at 94 and 90% respectively for total tau protein and at 98 and 97% respectively for alpha-synuclein using ELISA assays [40, 41]. Furthermore, assays detecting prion protein, the etiological marker of CJD, are also now performed using ELISA or RT-QuIC methods [42, 43]. Pending the complete validation of these different assays before use in daily clinical practice, improving 14-3-3 protein determination is essential for CJD diagnosis since it remains nowadays the sole biological marker included in the WHO CJD diagnostic criteria.

Finally, the automation of WB and isoelectric focusing (IEF) assays on the Peggy Sue® platform enables the emergence of many applications in fundamental or applied research [44, 45]. Concerning the development of neurodegenerative marker automated assays, Halgebauer et al. developed an IEF assay to detect oligoclonal bands in CSF [46] and proposed it for clinical practice. Using automated capillary technology will certainly open the way to the adaptation and routine use of many markers of neurodegenerative proteinopathies [47].

Conclusion

CSF 14-3-3 protein remains presently the biological marker recommended by international consensus to improve the probability of sCJD diagnosis, despite its nature of surrogate sCJD marker. Using the new automated capillary Western assay, analytical and diagnostic performances of CSF 14-3-3 protein detection were improved compared to the classical Western Blot assay. With a shorter time of analysis (4 h versus 1.5 day), this method would rapidly replace WB assay for the detection of CSF 14-3-3 protein in the frame of routine CJD diagnosis. Moreover, the automated Western platform has the potential to implement others biomarkers in the field of neurodegenerative disorders.

Acknowledgements We would to thank the French surveillance network of CJD for the support of CJD or non-CJD diagnosis. Particular thanks to Elisabeth Barbey, AD, and Geneviève Gentil-Perret, AD, Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Department of Biochemistry, Lyon, France.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Will RG, Ironside JW (2017) Sporadic and infectious human prion diseases. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 7 (1). doi:10.1101/cshperspect.a024364
2. Collins SJ, Sanchez-Juan P, Masters CL, Klug GM, van Duijn C, Poleggi A, Pocchiari M, Almonti S et al (2006) Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Brain J Neurol 129(Pt 9):2278–2287. doi:10.1093/brain/awl159
3. Brown P, Cathala F, Raubertas RF, Gajdusek DC, Castaigne P (1987) The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. Neurology 37(6):895–904
4. Holman RC, Belay ED, Christensen KY, Maddox RA, Minino AM, Folkema AM, Haberling DL, Hammett TA et al (2010) Human prion diseases in the United States. PLoS One 5(1):e8521. doi:10.1371/journal.pone.0008521
5. Van Everbroeck B, Dobbeleir I, De Waele M, De Deyn P, Martin JJ, Cras P (2004) Differential diagnosis of 201 possible Creutzfeldt-Jakob disease patients. J Neurol 251(3):298–304. doi:10.1007/s00415-004-0311-9
6. Paterson RW, Torres-Chae CC, Kuo AL, Ando T, Nguyen EA, Wong K, DeArmond SJ, Haman A et al (2012) Differential diagnosis of Jakob-Creutzfeldt disease. Arch Neurol 69(12):1578–1582. doi:10.1001/2013.jamaneurol.79
7. Jayaratnam S, Khoo AK, Basic D (2008) Rapidly progressive Alzheimer's disease and elevated 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid. Age Ageing 37(4):467–469. doi:10.1093/ageing/afn094
8. Reinwald S, Westner IM, Niedermaier N (2004) Rapidly progressive Alzheimer's disease mimicking Creutzfeldt-Jakob disease. J Neurol 251(8):1020–1022. doi:10.1007/s00415-004-0480-6

9. Stoeck K, Sanchez-Juan P, Gawinecka J, Green A, Ladogana A, Pocchiari M, Sanchez-Valle R, Mitrova E et al (2012) Cerebrospinal fluid biomarker supported diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease and rapid dementias: a longitudinal multicentre study over 10 years. Brain J Neurol 135(Pt 10):3051–3061. doi:10.1093/brain/aws238
10. Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG (1996) The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. N Engl J Med 335(13):924–930
11. Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Otto M, Poser S, Wiltfang J, Windl O, Kretzschmar HA et al (1998) Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol 43(1):32–40. doi:10.1002/ana.410430109
12. Collins S, Boyd A, Fletcher A, Gonzales M, McLean CA, Byron K, Masters CL (2000) Creutzfeldt-Jakob disease: diagnostic utility of 14-3-3 protein immunodetection in cerebrospinal fluid. Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia 7(3):203–208. doi:10.1054/jocn.1999.0193
13. WHO (2003) WHO manual for surveillance of human transmissible spongiform encephalopathies, including variant Creutzfeldt-Jakob disease. World Health Organization, Geneva
14. Shiga Y, Miyazawa K, Sato S, Fukushima R, Shibuya S, Sato Y, Konno H, Doh-ura K et al (2004) Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. Neurology 63(3):443–449
15. Zerr I, Kallenberg K, Summers DM, Romero C, Taratuto A, Heinemann U, Breithaupt M, Varges D et al (2009) Updated clinical diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Brain J Neurol 132(Pt 10):2659–2668. doi:10.1093/brain/awp191
16. Sanchez-Valle R, Saiz A, Graus F (2002) 14-3-3 protein isoforms and atypical patterns of the 14-3-3 assay in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Neurosci Lett 320(1–2):69–72
17. Shimada T, Fournier AE, Yamagata K (2013) Neuroprotective function of 14-3-3 proteins in neurodegeneration. Biomed Res Int 2013:564534. doi:10.1155/2013/564534
18. Shiga Y, Wakabayashi H, Miyazawa K, Kido H, Itoyama Y (2006) 14-3-3 protein levels and isoform patterns in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease patients in the progressive and terminal stages. Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia 13(6):661–665. doi:10.1016/j.jocn.2005.09.004
19. Wiltfang J, Otto M, Baxter HC, Bodemer M, Steinacker P, Bahn E, Zerr I, Kornhuber J et al (1999) Isoform pattern of 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. J Neurochem 73(6):2485–2490
20. Satoh K, Tobiume M, Matsui Y, Mutsukura K, Nishida N, Shiga Y, Eguhchi K, Shirabe S et al (2010) Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 90(11):1637–1644. doi:10.1038/labinvest.2009.68
21. Green AJ, Thompson EJ, Stewart GE, Zeidler M, McKenzie JM, MacLeod MA, Ironside JW, Will RG et al (2001) Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 70(6):744–748
22. Koller A, Watzig H (2005) Precision and variance components in quantitative gel electrophoresis. Electrophoresis 26(12):2470–2475. doi:10.1002/elps.200500024
23. Schmitz M, Ebert E, Stoeck K, Karch A, Collins S, Calero M, Sklaviadis T, Laplanche JL et al (2016) Validation of 14-3-3 protein as a marker in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease diagnostic. Mol Neurobiol 53(4):2189–2199. doi:10.1007/s12035-015-9167-5
24. Brandel JP, Peckeu L, Haik S (2013) The French surveillance network of Creutzfeldt-Jakob disease. Epidemiological data in France and worldwide. Transfusion clinique et biologique: journal de la Societe francaise de transfusion sanguine 20(4):395–397. doi:10.1016/j.tracli.2013.02.029
25. Giraud P, Biacabe AG, Chazot G, Later R, Joyeux O, Moene Y, Perret-Liaudet A (2002) Increased detection of 14-3-3 protein in cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease during the disease course. Eur Neurol 48(4):218–221
26. Dimeski G (2008) Interference testing. The Clinical biochemist Reviews 29(Suppl 1):S43–S48
27. Baker M (2015) Reproducibility crisis: blame it on the antibodies. Nature 521(7552):274–276. doi:10.1038/521274a
28. Chitravas N, Jung RS, Kofskey DM, Blevins JE, Gambetti P, Leigh RJ, Cohen ML (2011) Treatable neurological disorders misdiagnosed as Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol 70(3):437–444. doi:10.1002/ana.22454
29. Geschwind MD, Shu H, Haman A, Sejvar JJ, Miller BL (2008) Rapidly progressive dementia. Ann Neurol 64(1):97–108. doi:10.1002/ana.21430
30. Day IN, Thompson RJ (1984) Levels of immunoreactive aldolase C, creatine kinase-BB, neuronal and non-neuronal enolase, and 14-3-3 protein in circulating human blood cells. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 136(2–3):219–228
31. Muayqil T, Gronseth G, Camicioli R (2012) Evidence-based guideline: diagnostic accuracy of CSF 14-3-3 protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology 79(14):1499–1506. doi:10.1212/WNL.0b013e31826d5fc3
32. Van Everbroeck BR, Boons J, Cras P (2005) 14-3-3 [1]-isoform detection distinguishes sporadic Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias. J Neurol Neurosurg Psychiatry 76(1):100–102. doi:10.1136/jnnp.2003.032037
33. Matsui Y, Satoh K, Miyazaki T, Shirabe S, Atarashi R, Mutsukura K, Satoh A, Kataoka Y et al (2011) High sensitivity of an ELISA kit for detection of the gamma-isoform of 14-3-3 proteins: usefulness in laboratory diagnosis of human prion disease. BMC Neurol 11:120. doi:10.1186/1471-2377-11-120
34. Leitao MJ, Baldeiras I, Almeida MR, Ribeiro MH, Santos AC, Ribeiro M, Tomas J, Rocha S et al (2016) Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease diagnostic accuracy is improved by a new CSF ELISA 14-3-3gamma assay. Neuroscience 322:398–407. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.02.057
35. Satoh J, Kurohara K, Yukitake M, Kuroda Y (1999) The 14-3-3 protein detectable in the cerebrospinal fluid of patients with prion-unrelated neurological diseases is expressed constitutively in neurons and glial cells in culture. Eur Neurol 41(4):216–225
36. Kenney K, Brechtel C, Takahashi H, Kurohara K, Anderson P, Gibbs CJ Jr (2000) An enzyme-linked immunosorbent assay to quantify 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of suspected Creutzfeldt-Jakob disease patients. Ann Neurol 48(3):395–398
37. Beaudry P, Cohen P, Brandel JP, Delasnerie-Laupretre N, Richard S, Launay JM, Laplanche JL (1999) 14-3-3 protein, neuron-specific enolase, and S-100 protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. Dement Geriatr Cogn Disord 10(1):40–46
38. Riemenschneider M, Wagenpfeil S, Vanderstichele H, Otto M, Wiltfang J, Kretzschmar H, Vanmechelen E, Forstl H et al (2003) Phospho-tau/total tau ratio in cerebrospinal fluid discriminates Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias. Mol Psychiatry 8(3):343–347. doi:10.1038/sj.mp.4001220
39. Kasai T, Tokuda T, Ishii R, Ishigami N, Tsuboi Y, Nakagawa M, Mizuno T, El-Agnaf OM (2014) Increased alpha-synuclein levels in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. J Neurol 261(6):1203–1209. doi:10.1007/s00415-014-7334-7
40. Otto M, Wiltfang J, Cepek L, Neumann M, Mollenhauer B, Steinacker P, Ciesielczyk B, Schulz-Schaeffer W et al (2002) Tau

protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Neurology 58(2):192–197

41. Llorens F, Kruse N, Karch A, Schmitz M, Zafar S, Gotzmann N, Sun T, Kochy S et al (2017) Validation of alpha-Synuclein as a CSF biomarker for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Mol Neurobiol. doi:10.1007/s12035-017-0479-5
42. Dorey A, Tholance Y, Vighetto A, Perret-Liaudet A, Lachman I, Krolak-Salmon P, Wagner U, Struyfs H et al (2015) Association of cerebrospinal fluid prion protein levels and the distinction between Alzheimer disease and Creutzfeldt-Jakob disease. JAMA neurology 72(3):267–275. doi:10.1001/jamaneurol.2014.4068
43. McGuire LI, Peden AH, Orru CD, Wilham JM, Appleford NE, Mallinson G, Andrews M, Head MW et al (2012) Real time quaking-induced conversion analysis of cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol 72(2):278–285. doi:10.1002/ana.23589
44. Wang J, Valdez A, Chen Y (2016) Evaluation of automated Wes system as an analytical and characterization tool to support monoclonal antibody drug product development. J Pharm Biomed Anal. doi:10.1016/j.jpba.2016.12.024
45. Padhan N, Nordling TE, Sundstrom M, Akerud P, Birgisson H, Nygren P, Nelander S, Claesson-Welsh L (2016) High sensitivity isoelectric focusing to establish a signaling biomarker for the diagnosis of human colorectal cancer. BMC Cancer 16(1):683. doi:10.1186/s12885-016-2725-z
46. Halbgebauer S, Haussmann U, Klafki H, Tumani H, Wiltfang J, Otto M (2015) Capillary isoelectric focusing immunoassay as a new nanoscale approach for the detection of oligoclonal bands. Electrophoresis 36(2):355–362. doi:10.1002/elps.201400339
47. Kovacs GG (2016) Molecular pathological classification of neurodegenerative diseases: turning towards precision medicine. Int J Mol Sci 17(2). doi:10.3390/ijms17020189

Analytical and Bioanalytical Chemistry
https://doi.org/10.1007/s00216-018-1437-4

RESEARCH PAPER

Development of an automated capillary nano-immunoassay—Simple Western assay—to quantify total TDP43 protein in human platelet samples

Anthony Fourier [1,2] · Jean Escal [1,2] · Emilien Bernard [3] · Ingolf Lachman [4] · Armand Perret-Liaudet [1,2,5] · Pascal Leblanc [6] · Isabelle Quadrio [1,2,5]

Received: 13 August 2018 / Revised: 11 October 2018 / Accepted: 18 October 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Frontotemporal lobar degeneration syndrome is the second cause of young-onset dementia. Unfortunately, reliable biomarkers are currently lacking for the diagnosis of this disease. As TDP43 protein is one of the proteins pathologically involved in frontotemporal lobar degeneration, many studies have been performed to assess TDP43 protein diagnostic performances. Mixed results were obtained using cerebrospinal fluid and plasma samples so far. The aim of the study was to develop an automated capillary nano-immunoassay—Simple Western assay—to detect and quantify TDP43 protein simultaneously in human blood-based samples. Simple Western assay was developed with two different cell lysates used as positive controls and was compared to Western blot. TDP43 protein profiles in plasma samples were disappointing, as they were discordant to our positive controls. On the contrary, similar TDP43 patterns were obtained between platelet samples and cell lysates using both assays. Simple Western assay provided good quantitative performances in platelet samples: a linearity of signals could be observed ($r^2 = 0.994$), associated to a within-run variability at 5.7%. Preliminary results based on a cohort of patients suffering from frontotemporal lobar degeneration showed large inter-individual variations superior to Simple Western's analytical variability. Simple Western assay seems to be suitable for detecting and quantifying TDP43 protein in platelet samples, providing a potential candidate biomarker in this disease. Further confirmation studies should now be performed on larger cohorts of patients to assess diagnostic performances of TDP43 protein in platelet samples.

Keywords Dementia · TDP43 proteinopathies · Capillary electrophoresis/electrophoresis · High-throughput screening assays · Biomarkers

✉ Anthony Fourier
anthony.fourier@chu-lyon.fr

[1] Neurochemistry Laboratory, Biochemistry Department, Centre de Biologie et Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, 59 Bd Pinel, 69677 Bron, France

[2] BIORAN Team, Lyon Neuroscience Research Center, CNRS UMR 5292 – INSERM U1028, Université de Lyon – Université Claude Bernard, 95 Bd Pinel, 69675 Bron, France

[3] Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, 59 Bd Pinel, 69677 Bron, France

[4] AJ Roboscreen GmbH, Hohmannstraße 7, 04129 Leipzig, Germany

[5] Center for Memory Resources and Research, Hospices Civils de Lyon, Charpennes Hospital, Lyon 1 University, 69100 Villeurbanne, France

[6] Institut NeuroMyoGène (INMG), CNRS UMR5310 - INSERM U1217, Université de Lyon - Université Claude Bernard, 69008 Lyon, France

Introduction

Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) is a clinically and pathologically heterogeneous syndrome, characterized by progressive atrophy of frontal and/or anterior temporal lobes [1]. FTLD spectrum is the second cause of young-onset dementia [2]. Different clinical syndromes exist, defined on the basis of leading features at presentation. They include behavioral frontotemporal dementia (bvFTD) and other cognitive syndromes impairing language capabilities primarily [3, 4]. In addition, both syndromes can overlap with motor neuron diseases [5]. The diagnosis of FTLD with definite pathology relies on the association of a clinical diagnosis with different core features depending on the syndrome and either presence of histopathologic evidence of specific protein aggregates or a known pathogenic mutation [6, 7].

In 2006, Neumann et al. discovered TDP43 protein as the major component of ubiquitin-positive, tau- and alpha-

Published online: 29 October 2018

synuclein negative inclusions in FTLD [8]. TDP43 cerebral inclusions contain an accumulation of native protein, but also hyperphosphorylated and truncated forms of TDP43 protein [9]. Numerous studies have been performed so far to elucidate TDP43 protein's functions, metabolism and misprocessing [10]. Otherwise, a lot of research has been done to detect TDP43 protein in patients' biofluids, potentially providing a diagnostic, prognostic and/or therapeutic evaluation biomarker [11]. Cerebrospinal fluid (CSF) markers are commonly evaluated in neurodegenerative diseases [12]. Plasma samples are less invasive, but neurodegenerative markers may exhibit lower concentrations than in CSF. Developing blood-based biomarkers could then become challenging in the absence of sensitive enough technologies [13]. Currently, no CSF or plasma biomarker can positively identify living FTLD patients [14]. Some studies showed differences in TDP43 protein between FTLD patients and other neurodegenerative diseases or controls in both matrices [15, 16]. However, quantification of TDP43 protein in CSF and plasma gave contradictory results so far. Potential reasons to these discrepancies could be the very low concentration of this protein or the low-binding affinity of the antibodies in the presence of abundant immunoglobulins and albumin, underscoring the necessity to identify disease-specific patterns [17]. Interestingly, different high-throughput Western blot platforms exhibit qualitative patterns associated to quantitative results and offer simplified workflows compared to traditional Western Blot [18–20]. Moreover, some studies highlighted an important role of platelets in neurodegenerative diseases, thus providing a new potential matrix for biomarkers' discovery [21].

The main objective of this study was to evaluate Simple Western technology developed on Peggy Sue analyzer (Protein Simple®) to detect TDP43 protein in platelet samples, in the context of lacking validated markers for FTLD. This automated technology coupled both electrophoresis and a chemiluminescent detection, providing qualitative and semi-quantitative measurements for tested samples. After initial development using cell culture lysates, Simple Western assays were performed to detect TDP43 protein in plasma and platelets samples. This first step was followed by an evaluation of automated quantification of TDP43 protein. Finally, the suitability and analytical performances of Simple Western assay were assessed on platelet samples from FTLD patients.

Material and methods

Samples

Endogenous TDP43 protein in cell culture lysates

The human embryonary kidney cell line HEK293T was obtained from the Généthon (Evry, France). Cells were cultured in DMEM-Glutamax medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and penicillin/streptomycin (Invitrogen). The human neuroblastoma cell line SH SY5Y was obtained from Sigma-Aldrich® (Saint-Louis, USA) and was cultured in DMEM-F12 (1/1) Glutamax supplemented with 10% FBS, non-essential amino acids and penicillin/streptomycin (Invitrogen®, Carlsbad, USA). SH SY5Y and HEK293T cells were recovered in 1× PBS and pelleted by centrifugation at 4 °C. Cell pellets were suspended and lysed in Laemmli lysis sample buffer (6% Tris HCl pH 6.8, 10% β-mercaptoethanol, 4% SDS, glycerol and bromophenol blue) and sonicated at 4 °C. Cell lysates were frozen at − 20 °C until further analyses.

Study population and *C9ORF72* genetic testing

The cohort included 2 male and 7 female patients aged between 59 and 76 years old. All the patients met the diagnosis of probable behavioral variant of frontotemporal dementia (bvFTD) according to Rascovsky criteria [6] and exhibited a family history of neurodegenerative diseases including FTD and/or ALS [22]. Following genetic counseling in the framework of their medical follow-up, the patients included in this study or their legal next of kin gave two informed written consents: the first one for FTLD genetic testing and the second one authorizing a change of biological purpose for remaining parts of samples. Blood sampling (EDTA tubes) was collected. After DNA extraction, the screening for GGGGCC repeat expansions in *C9ORF72* (the genetic variant with the highest prevalence in FTLD) was performed using a repeat-primed PCR (RP-PCR), adapted from the international study from Akimoto et al. [23]. RP-PCR products were separated by capillary electrophoresis using an ABI 3130xL (Life Technologies®, Carlsbad, USA) with Genescan™ 500 ROX size standard (Life Technologies®). Data were analyzed using GeneMapper® software 5 (Applied Biosystems®, Foster City, USA). RP-PCR gave negative results for *C9ORF72* expansion screening in all patients.

Blood fractionation of samples

In parallel to classical genetic testing, a part of whole-blood samples was centrifuged at 200*g* during 15 min (without acceleration and deceleration) to obtain platelet-rich plasmas (PRP). PRP were then centrifuged at 2000*g* during 15 min. Platelet-poor plasmas (PPP) were then saved, aliquoted, and stored at − 80 °C. Pellets were suspended in 4 mL of washing buffer (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2.7 mM in water, pH 7.35). A second centrifugation at 2000*g* during 15 min was performed, supernatant was discarded and pellets were suspended again in 4 mL of washing buffer. Platelet counts were performed on Sysmex® (Kobe, Japan) XN-2000 analyzer. Another centrifugation was performed at 2000*g* during

15 min and supernatant was discarded. Pellets were suspended in a variable volume of buffer (Tris 50 mM, NaCl 150 mM in water, pH 7.35/Triton X-100 20%, ratio 40:1) to obtain a similar final platelet concentration in all samples (200 G/L). Platelet samples were heated at 37 °C during 15 min, aliquoted and stored at − 80 °C until further analysis. Diluted solutions of albumin (Vialebex®, LFB Biomedicaments®, France, 40 g/L) and immunoglobulins (Privigen®, CSL Behring®, USA, 100 g/L) were analyzed in parallel to plasma samples (final dilution for both solutions: 0.5 g/L).

Recombinant TDP43 protein

Recombinant human TDP43 protein (Ag1231) was purchased from Proteintech® (Rosemont, USA). This truncated recombinant protein includes TDP43 1-260 amino acids, with N-terminal GST tag and its approximated molecular weight is 56 kDa. Serial dilutions from a stock solution (0.5 mg/mL) were performed to assess semi-quantitative performances of Simple Western assay.

Antibodies

Rabbit polyclonal 10782-2-AP antibody (ProteinTech®, Rosemont, USA) was chosen to detect total TDP43 protein in the different tested matrices. This antibody is one of the most popular anti-TDP43 antibodies and detects TDP43 aminoacids 203–209 and aminoacids near N-terminus [24]. Rabbit polyclonal 12892-1-AP antibody (ProteinTech®, Rosemont, USA) and mouse monoclonal 2G10 antibody (AJ Roboscreen GmbH®, Leipzig, Germany) were used to confirm the specificity of TDP43 protein profiles. These antibodies are directed against TDP43 aminoacids 288–414 and aminoacids 201–220 respectively.

Simple Western assays

Simple Western 12–230 kDa size-assays were carried out using Peggy Sue® analyzer (Protein Simple, San Jose, CA, USA). First, we prepared a 384-microwell plate containing samples mixed with fluorescent standards and denatured at 95 °C during 5 min, a ladder including 6 size markers, primary antibodies (dilution 1/50 in our study), secondary antibodies, the detection solution (equivalent volumes of luminol and peroxide), stacking and separation matrices, according to the manufacturer's preparation template [25]. After centrifugation at 1000*g* during 5 min, the 384-microwell plate was loaded into Peggy Sue® platform. Then, the complete automated workflow, ranging from samples' uptake on the plate to the chemiluminescent detection and quantification of proteins, was launched. The first step consisted in samples' loading into 12 individual single-use capillaries per cycle (1 cycle comprising 11 samples and 1 ladder), followed by a size-based separation (45 min in our study). A detection of fluorescence of standards, mixed with every sample, ensured a control of electrophoresis. Sample proteins were captured onto capillary beds after illumination with UV light. Incubations of primary and secondary antibodies lasted 1 h and 30 min respectively in our protocol. Finally, a chemiluminescent detection of target proteins was automatically performed with different exposure times, ranging from 4 to 512 s [20]. Target proteins' sizes were determined for each sample in comparison to the migration of the size markers of the ladder. Heights and areas of all detected peaks were systematically calculated on Compass for Simple Western® software, version 3.1.7, using the 4-s exposure time.

Western blot assays

According to their nature, samples could be preliminary diluted in sodium chloride. Then Laemmli lysis sample buffer (6% Tris-HCl pH 6.8, 10% β-mercaptoethanol, 4% SDS, glycerol and bromophenol blue) was added to samples (ratio 1:1). Samples were denaturated at 95 °C for 5 min and 10 µL of samples were separated on NuPAGE 4–12% Bis-Tris protein gels, 1.0 mm (Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA) with MOPS SDS running buffer (Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA) according to manufacturer's instructions. Proteins were then transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane and blocked during 2 h with 5% nonfat-dried milk in Phosphate Buffered Saline (PBS). Membranes were incubated overnight at 4 °C with rabbit polyclonal 10782-2-AP antibody (dilution 1/2000). Three washes were then performed in PBS-0.1% Tween. Membranes were incubated 30 min with secondary HRP anti-rabbit antibody (Agilent Dako®, Santa Clara, USA, dilution 1/2000), washed four more times with PBS-0.1% Tween and then three times with PBS. Finally, membranes were incubated with SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA) and exposed on Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare®, Buckinghamshire, UK). Apparent sizes of proteins were determined using MagicMark XP Western Protein Standard (Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA).

Analytical performances of Simple Western assay

The determination of the limit of detection (LOD) and the lowest limit of quantification (LLOQ) was performed using 6 samples containing only Sample Buffer, the reagent used to perform dilutions with Simple Western assay. These "blank" samples were incubated in 6 different capillaries with both primary and secondary antibodies. Heights' and areas' peaks were determined for each of these 6 "blank" samples. LOD and LLOQ were then calculated as: LOD = average signal (height or area) + 3* (standard deviation); LLOQ = average signal (height or area) + 10* (standard deviation). In platelet

samples, capillary-to-capillary variability was evaluated using 6 determinations of the same sample in the same cycle. The correlation between calculated heights and areas of TDP43 protein signals was determined with the Pearson correlation coefficient *r*. The linearity observed for TDP43 protein signals was assessed performing a linear regression.

Results

Development of a Simple Western assay to detect TDP43 protein

Identical 1/50 dilutions of SH SY5Y and HEK293T cell lysates were compared using both Simple Western and Western Blot assays. First assays were performed using rabbit polyclonal 10782-2-AP antibody (Fig. 1a).

Identical TDP43 protein profiles were observed in SH SY5Y and HEK293T cell lysates using Western Blot assay, with a band of strong intensity between 40 and 50 kDa and faint bands between 30 and 40 kDa. The same patterns were obtained with Simple Western assay, but bands were around 10 kDa higher than those observed with the manual technique (54 kDa and 44 kDa respectively). In both assays, the intensity of signals was stronger in HEK293T cell lysate. The shift of TDP43 protein sizes was confirmed using two other anti-TDP43 antibodies presenting a different epitope (rabbit polyclonal 12892-1-AP antibody) or coming from a different species (mouse monoclonal 2G10 antibody) compared to rabbit polyclonal 10782-2-AP antibody (Fig. 1b).

Blood-based samples obtained from one patient were then compared to SH SY5Y cell lysate using both Western Blot and Simple Western assays (Fig. 2a).

Western Blot and Simple Western TDP43 protein profiles were once again concordant, except for the shift of apparent sizes previously described (Fig. 2a). Both assays exhibited similar patterns in platelet samples and SH SY5Y cell lysate (lanes 3 and 4). On the contrary, protein profiles were different between plasma samples and SH SY5Y cell lysate: the bands that were previously described in platelet samples and SH SY5Y cell lysate were not detected in plasma samples (lanes 1, 2, and 4). However, plasma samples harbored other bands of different molecular weight. The electrophoretic profile of diluted PPP was compared to diluted solutions of immunoglobulins (IgG) and albumin (Alb.), as these two compounds are abundant in plasma and therefore could serve as migration controls (Fig. 2b). A similar pattern could be observed between diluted PPP and immunoglobulins. No reactivity was detected with diluted albumin.

Quantitation of TDP43 protein using Simple Western assay

Quantitation performances of Simple Western assay were first performed using a stock solution of recombinant GST-tagged TDP43 protein (0.5 mg/mL according to manufacturer's instructions). Serial dilutions were performed, ranging from 0 to 20 µg/L (Fig. 3).

A band of 57 kDa apparent mass was observed in all the dilutions of recombinant GST-tagged TDP43 protein. No

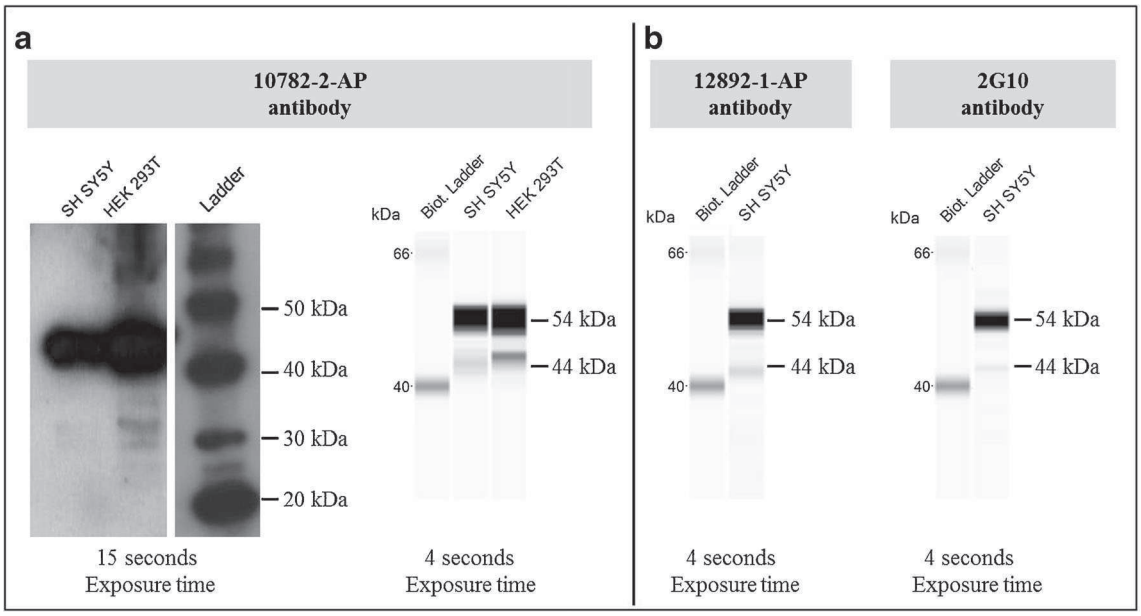


Fig. 1 Comparison of Western Blot and Simple Western TDP43 protein profiles in HEK293T and SH SY5Y cell lysates. **a** Comparison of Western Blot and Simple Western protein profiles of SH SY5Y and HEK293T cell lysates (dilution 1/50) using rabbit polyclonal 10782-2-AP antibody. **b** Identical Simple Western profiles were obtained in SH SY5Y cell lysate using both rabbit polyclonal 12892-1-AP and mouse monoclonal 2G10 antibodies

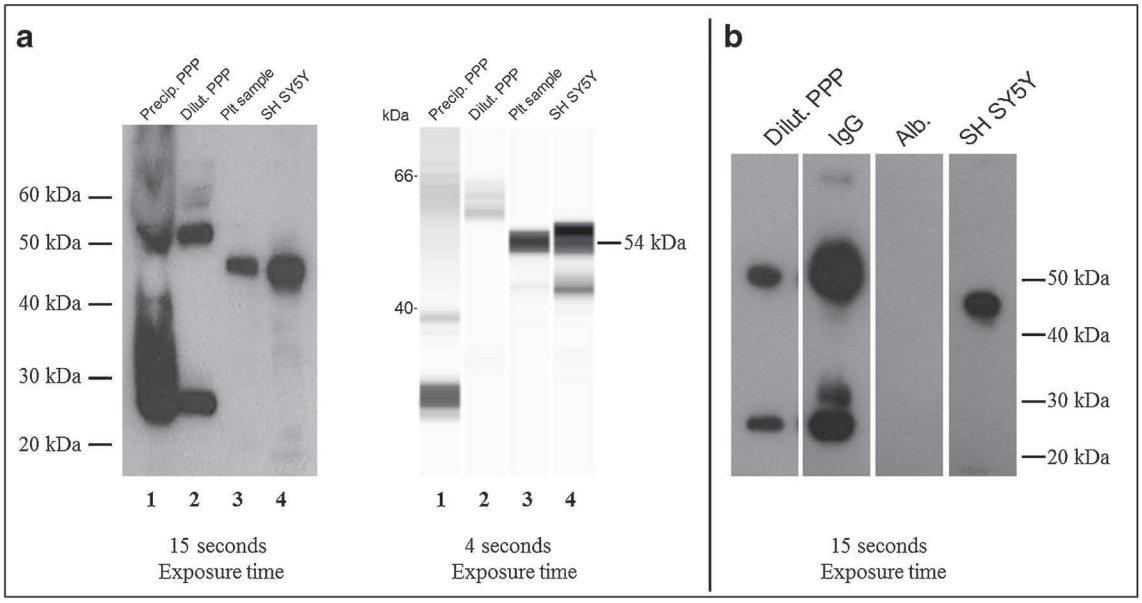
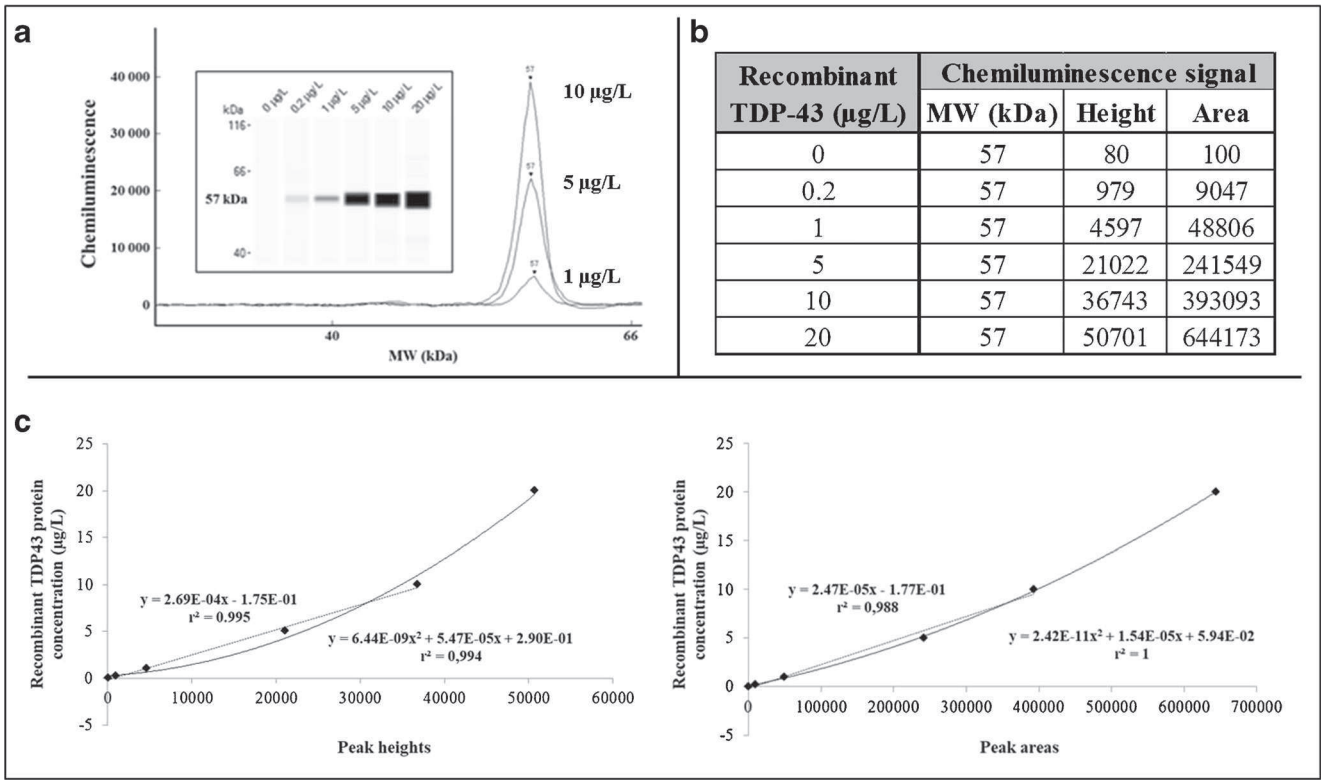


Fig. 2 TDP43 protein profiles in blood-derived samples using rabbit polyclonal 10782-2-AP antibody. **a** Comparison of Western Blot (left) and Simple Western (right) assays representing blood fractionation of one patient: platelet-poor plasma (PPP) sample precipitated with ice-cold acetone (lane 1), PPP sample - dilution 1/100 - (lane 2) and platelet sample (lane 3) are compared to SH SY5Y cell lysate (lane 4). **b** Western Blot assays of diluted immunoglobulins (IgG) and albumin (Alb) solutions with anti-TDP43 antibody compared to a diluted PPP sample and SH SY5Y cell lysate

signal was visible when no recombinant TDP43 protein was added and increased signals were observed for increased recombinant protein concentrations (Fig. 3a). The intensity of signals was automatically calculated by Compass for



Recombinant TDP-43 (µg/L)	Chemiluminescence signal		
	MW (kDa)	Height	Area
0	57	80	100
0.2	57	979	9047
1	57	4597	48806
5	57	21022	241549
10	57	36743	393093
20	57	50701	644173

Fig. 3 Serial dilutions of recombinant GST-tagged TDP43 protein using Simple Western assay. **a** Graph view and lane view (Compass for Simple Western® software) of serial dilutions of recombinant TDP43 protein (4-s exposure time). **b** Molecular weights, heights, and areas for all the dilutions of recombinant protein (from 0 to 20 µg/L) automatically calculated by Compass for Simple Western® software. **c** Representation of calibration curves obtained for heights and areas signals

Simple Western® software (heights and areas are provided in Fig. 3b). The analysis of 6 "blank" samples, containing Sample Buffer only, gave a limit of detection (LOD) of 371 for peak heights and 1595 for peak areas. Using the same raw data, the lower limit of quantification (LLOQ) was 930 and 4322 for peak heights and areas respectively. Next, calibration curves were generated: a linear calibration curve ($r^2 = 0.995$ for heights and $r^2 = 0.988$ for areas) was obtained for concentrations below 10 µg/L (Fig. 3c), as a saturation of signals was observed for the highest concentration (20 µg/L). Interestingly, a quadratic model fitted correctly to all concentrations ($r^2 = 0.994$ for heights and $r^2 = 1$ for areas). Using this last fitting model, the corresponding LLOQ of recombinant TDP43 protein were then 0.35 µg/L and 0.13 µg/L for heights and areas respectively. The lowest standard included in the calibration curve (0.2 µg/L) gave peak heights and peak areas close to these calculated values (Fig. 3b).

Further assays were performed to assess Simple Western assay's suitability to detect and quantify TDP43 signals in platelet samples (Fig. 4). Signals were detectable until a ten-fold dilution, which was the strongest dilution performed in this assay (Fig. 4a). A linearity of signals was observed ($r^2 = 0.9719$) for peak heights. Concordant results ($r^2 = 0.9087$) were obtained with peak areas. The variability of Simple Western assay was also assessed with repeated measurements of the same sample 6 times within one cycle: Simple Western assay exhibited an interesting 5.7% coefficient of variation for heights' determination (Fig. 4b). The coefficient of variation for areas' determination was 6.3%.

Finally, platelet samples were tested in duplicates in the cohort of nine patients suspected of familial FTLD (Table 1). Calculated parameters by Compass for Simple Western® software gave concordant results for signals detection and calculation. Indeed, average heights and areas measured for a same patient were well-correlated (Pearson correlation coefficient $r = 0.986$). Duplicates variation was correct for both calculations, the highest duplicate variability for average heights and areas being 13.1% and 13.6% respectively. Average heights exhibited a lower variability than average areas, with an average coefficient of variation at 4.9% versus 6.2%. In this cohort of 9 samples with normalized platelet concentration (200 G/L), a 38-fold difference was observed between the lowest and the highest TDP43 protein concentrations. Indeed, these two concentrations were 0.39 µg/L and 14.76 µg/L respectively using the quadratic calibration curve obtained for height signals. This variation was significantly above the analytical variation of Simple Western assay (the coefficient of variation was 5.7%), meaning that samples exhibited TDP43 protein signals in platelet samples which were quantitatively different between patients.

Discussion

In this study, platelets appeared as a suitable sample matrix to study TDP43 protein in frontotemporal dementia patients. Indeed, platelet samples and SH SY5Y cell lysate, considered as a positive control for our target protein, gave identical TDP43 protein patterns using two different qualitative immunodetection assays: Western Blot and Simple Western assays. Western Blot assay is a commonly used tool to identify a specific protein in a complex mixture, and was therefore

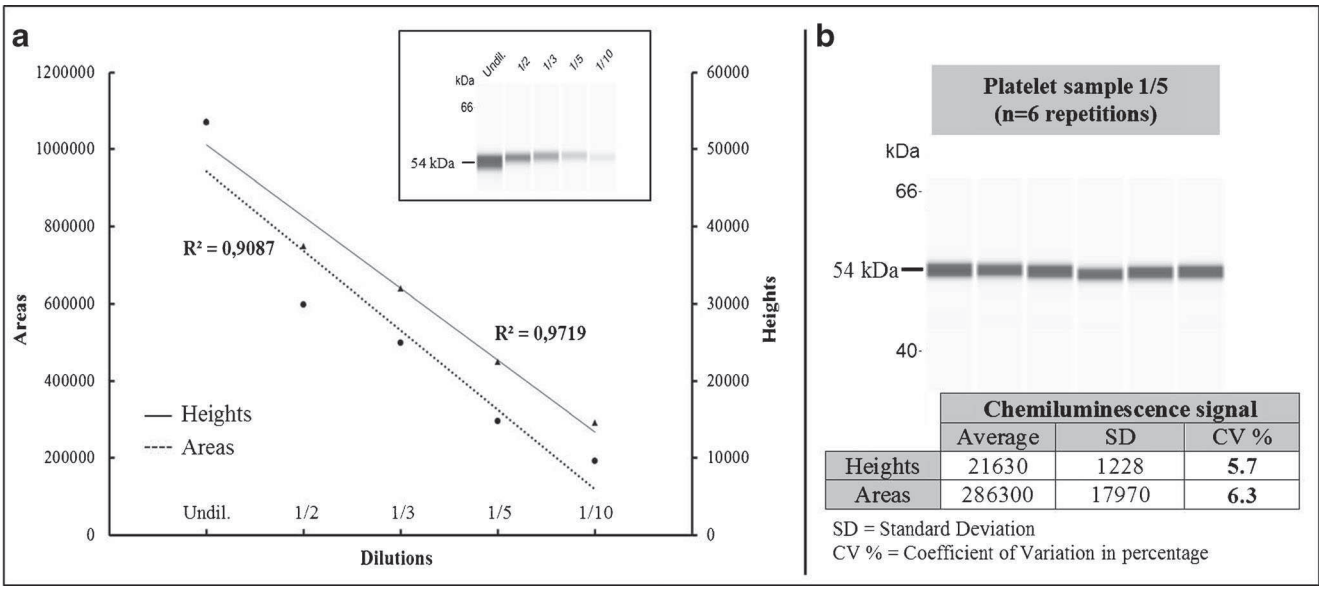


Fig. 4 Suitability of Simple Western assay to quantify TDP43 signals in platelet samples. **a** Serial dilution of one platelet sample gives linear signals using Simple Western assay (4-s exposure time). **b** Capillary-to-capillary precision ($n = 6$) of TDP43 protein chemiluminescent signals (heights and areas) using Simple Western assay

Table 1 Calculated TDP43 signals in normalized platelet samples (200 G/L) Calculated parameters include average heights and areas of samples duplicates, their relative standard deviation (SD) and their coefficient of variation in percentage (% CV)

Sample	Calculated parameters (Compass for Simple Western® software)					
	Average height	SD	% CV	Average area	SD	% CV
Patient 1	19,750	25	0.1%	363,476	2580	0.7%
Patient 2	43,363	79	0.2%	974,709	15,054	1.5%
Patient 3	19,675	2569	13.1%	379,628	50,736	13.4%
Patient 4	28,583	2742	9.6%	601,856	37,526	6.2%
Patient 5	28,717	3176	11.1%	523,724	71,382	13.6%
Patient 6	41,743	1015	2.4%	827,149	12,269	1.5%
Patient 7	37,042	1829	4.9%	693,959	36,997	5.3%
Patient 8	25,686	158	0.6%	479,711	18,352	3.8%
Patient 9	1496	28	1.9%	28,569	2883	10.1%

considered as the reference method in our study [26]. Simple Western assay, a new automated capillary nano-immunoassay, provided qualitative protein patterns like Western Blot. First steps of Simple Western assays' development included the assessment of different dilutions of SH SY5Y and HEK293T cell lysates, ranging from 1/200 to 1/20 using rabbit polyclonal 10782-2-AP anti-TDP43 antibody. A band of strong intensity at 54 kDa and a fainter band at 44 kDa were visible. The comparison of Simple Western and Western Blot assays gave similar TDP43 protein patterns, at the exception of apparent molecular weight (Fig. 1a). Many factors can affect proteins' motility including the type of gel or matrix used for electrophoresis, running buffers and even the intrinsic characteristics of target protein [27]. TDP43 protein profiles obtained with Simple Western technology were confirmed using two other anti-TDP43 antibodies presenting a different epitope—rabbit polyclonal 12892-1-AP antibody—or coming from a different species—mouse monoclonal 2G10 antibody—(Fig. 1b). Our results were concordant with those of an industrial company providing another mouse monoclonal anti-TDP43 antibody (clone 671834), which was tested on A431 human epithelial carcinoma and NR8383 rat alveolar macrophage cell lines (https://www.novusbio.com/products/tdp-43-tardbp-antibody-671834_mab7778) [28]. Despite the shift of protein sizes observed between both assays, Simple Western was successful in providing qualitative TDP43 protein patterns. Differences were observed between plasma samples and SH SY5Y cell lysate. Indeed, the 54 kDa band observed in our positive control was not detected in plasma samples. On the other hand, additional bands were detectable in plasma samples, corresponding to immunoglobulin light and heavy chains (Fig. 2b). This cross-reaction with immunoglobulins was already described by Steinacker et al. assessing TDP43 protein in CSF samples [29]. Interestingly, contrary to plasma samples, platelet samples and SH SY5Y cell lysate exhibited similar TDP43 protein profiles.

In addition to protein profiles assessment, Simple Western assay allowed an automated semi-quantification of all the peaks obtained in each capillary. An evaluation of the analytical performances of the protocol previously developed was then performed. When performing serial dilutions from a TDP43 recombinant protein solution, linear signals were observed for concentrations below 10 µg/L (Fig. 3c). With increased concentrations, a loss of linearity was observed, leading to a potential underestimation of signals [30]. Moreover, a burn-out phenomenon was visible, leading to the presence of split peaks or to a complete disappearance of signals for the most concentrated samples (data not shown). This phenomenon was already described for Simple Western assays [25] and is known as ghost or hollow bands in traditional Western Blot assays, occurring when too much target protein is applied, leading to a total depletion of substrate [26].

The linearity of chemiluminescent signals was observed for one platelet sample (Fig. 4a). In parallel, Simple Western assay provided a low capillary-to-capillary variability below 6.3% for both TDP43 heights and areas (Fig. 4b). These performances were similar to other variability assays performed using Simple Western assay or enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for CSF markers [31, 32]. Thus, Simple Western protocol seems suitable to detect and quantify total TDP43 protein in platelet samples.

In our cohort of nine platelet samples obtained from FTD patients, the lowest and the highest height values were 1496 and 43,363 respectively, despite a normalized platelets' concentration of 200 G/L per sample. The associated TDP43 protein concentrations were then 0.39 µg/L and 14.76 µg/L respectively. These values were above the LOD and LLOQ of this assay, validating the suitability of Simple Western assay to quantify TDP43 protein in platelet samples. Furthermore, this preliminary exploratory study indicates that TDP43 protein presents an important inter-individual variability in platelet samples superior to its analytical variability. This observation strengthens the fact that TDP43 protein's detection and quantification in platelet samples could become a potential candidate biomarker for diagnosis' purposes, reflecting pathological mechanisms in FTLD and ALS patients [33]. However,

this variability could also be due to physiological variations such as age and/or sex. To address these questions, a prospective study based on our newly validated Simple Western assay, combining coupled qualitative and quantitative measurements, should be performed to assess TDP43 protein diagnostic performances in larger cohorts of patients with neurodegenerative definite pathology.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Ingolf Lachmann provided 2G10 antibody and reports that he is employee of AJ Roboscreen GmbH®, Leipzig, Germany. No other conflict of interest is reported.

Ethical approval This study was based on biological samples collected for routine diagnosis in the framework of a medical follow-up recommended for FTLD patients. The samples associated to written consents were stored in a bio bank with the authorization from the French Ministry of Health (Declaration Number DC-2008-304). Authorization for handling personal data was granted by the French data protection commission [Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL)].

The patients included in this study or their legal next of kin gave two informed written consents: the first one for FTLD genetic testing and the second one authorizing a change of biological purpose for remaining parts of samples.

References

1. Rabinovici GD, Miller BL. Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. CNS Drugs. 2010;24(5):375–98. https://doi.org/10.2165/11533100-000000000-00000.
2. Warren JD, Rohrer JD, Rossor MN. Clinical review. Frontotemporal dementia. BMJ. 2013;347:f4827. https://doi.org/10.1136/bmj.f4827.
3. Neary D, Snowden J, Mann D. Frontotemporal dementia. Lancet Neurol. 2005;4(11):771–80. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70223-4.
4. Grossman M. Primary progressive aphasia: clinicopathological correlations. Nat Rev Neurol. 2010;6(2):88–97. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.216.
5. Irwin DJ, Cairns NJ, Grossman M, McMillan CT, Lee EB, Van Deerlin VM, et al. Frontotemporal lobar degeneration: defining phenotypic diversity through personalized medicine. Acta Neuropathol. 2015;129(4):469–91. https://doi.org/10.1007/s00401-014-1380-1.
6. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. Brain. 2011;134(Pt 9):2456–77. https://doi.org/10.1093/brain/awr179.
7. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. Neurology. 2011;76(11):1006–14. https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31821103e6.
8. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science. 2006;314(5796):130–3. https://doi.org/10.1126/science.1134108.
9. Gao J, Wang L, Huntley ML, Perry G, Wang X. Pathomechanisms of TDP-43 in neurodegeneration. J Neurochem. 2018. https://doi.org/10.1111/jnc.14327.
10. Buratti E. TDP-43 post-translational modifications in health and disease. Expert Opin Ther Targets. 2018;22(3):279–93. https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1439923.
11. Geser F, Prvulovic D, O'Dwyer L, Hardiman O, Bede P, Bokde AL, et al. On the development of markers for pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. Prog Neurobiol. 2011;95(4):649–62. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.08.011.
12. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011;7(3):263–9. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005.
13. Snyder HM, Carrillo MC, Grodstein F, Henriksen K, Jeromin A, Lovestone S, et al. Developing novel blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2014;10(1):109–14. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.10.007.
14. Riedl L, Mackenzie IR, Forstl H, Kurz A, Diehl-Schmid J. Frontotemporal lobar degeneration: current perspectives. Neuropsychiatr Dis Treat. 2014;10:297–310. https://doi.org/10.2147/NDT.S38706.
15. Kasai T, Tokuda T, Ishigami N, Sasayama H, Foulds P, Mitchell DJ, et al. Increased TDP-43 protein in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol. 2009;117(1):55–62. https://doi.org/10.1007/s00401-008-0456-1.
16. Foulds PG, Davidson Y, Mishra M, Hobson DJ, Humphreys KM, Taylor M, et al. Plasma phosphorylated-TDP-43 protein levels correlate with brain pathology in frontotemporal lobar degeneration. Acta Neuropathol. 2009;118(5):647–58. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0594-0.
17. Feneberg E, Gray E, Ansorge O, Talbot K, Turner MR. Towards a TDP-43-based biomarker for ALS and FTLD. Mol Neurobiol. 2018. https://doi.org/10.1007/s12035-018-0947-6.
18. Anderson GJ, C MC, Kennedy RT. Western blotting using capillary electrophoresis. Anal Chem. 2011;83(4):1350–5. https://doi.org/10.1021/ac102671n.
19. Hughes AJ, Herr AE. Microfluidic Western blotting. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(52):21450–5. https://doi.org/10.1073/pnas.1207754110.
20. Chen JQ, Wakefield LM, Goldstein DJ. Capillary nano-immunoassays: advancing quantitative proteomics analysis, biomarker assessment, and molecular diagnostics. J Transl Med. 2015;13:182. https://doi.org/10.1186/s12967-015-0537-6.
21. Behari M, Shrivastava M. Role of platelets in neurodegenerative diseases: a universal pathophysiology. Int J Neurosci. 2013;123(5):287–99. https://doi.org/10.3109/00207454.2012.751534.
22. Wood EM, Falcone D, Suh E, Irwin DJ, Chen-Plotkin AS, Lee EB, et al. Development and validation of pedigree classification criteria for frontotemporal lobar degeneration. JAMA Neurol. 2013;70(11):1411–7. https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.3956.
23. Akimoto C, Volk AE, van Blitterswijk M, Van den Broeck M, Leblond CS, Lumbroso S, et al. A blinded international study on the reliability of genetic testing for GGGGCC-repeat expansions in C9orf72 reveals marked differences in results among 14 laboratories. J Med Genet. 2014;51(6):419–24. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102360.
24. Goossens J, Vanmechelen E, Trojanowski JQ, Lee VM, Van Broeckhoven C, van der Zee J, et al. TDP-43 as a possible biomarker for frontotemporal lobar degeneration: a systematic review of existing antibodies. Acta Neuropathol Commun. 2015;3:15. https://doi.org/10.1186/s40478-015-0195-1.
25. Nelson GM, Guynn JM, Chorley BN. Procedure and key optimization strategies for an automated capillary electrophoretic-based immunoassay method. J Vis Exp. 2017;(127). https://doi.org/10.3791/55911.

26. Alegria-Schaffer A, Lodge A, Vattem K. Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. Methods Enzymol. 2009;463:573–99. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63033-0.
27. Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(6):1760–5. https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106.
28. R&D systems a biotechne brand. Human/Mouse/Rat TDP-43/TARDBP Antibody - Monoclonal Mouse IgG2A Clone # 671834 - Catalog Number: MAB7778 - https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/mab7778.pdf. Rev. 2/7/2018.
29. Steinacker P, Hendrich C, Sperfeld AD, Jesse S, von Arnim CA, Lehnert S, et al. TDP-43 in cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Arch Neurol. 2008;65(11):1481–7. https://doi.org/10.1001/archneur.65.11.1481.
30. Charette SJ, Lambert H, Nadeau PJ, Landry J. Protein quantification by chemiluminescent Western blotting: elimination of the antibody factor by dilution series and calibration curve. J Immunol Methods. 2010;353(1–2):148–50. https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.12.007.
31. Fourier A, Dorey A, Perret-Liaudet A, Quadrio I. Detection of CSF 14-3-3 protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients using a new automated capillary Western assay. Mol Neurobiol. 2017. https://doi.org/10.1007/s12035-017-0607-2.
32. Mattsson N, Andreasson U, Persson S, Carrillo MC, Collins S, Chalbot S, et al. CSF biomarker variability in the Alzheimer's Association quality control program. Alzheimers Dement. 2013;9(3):251–61. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.01.010.
33. Bennion Callister J, Pickering-Brown SM. Pathogenesis/genetics of frontotemporal dementia and how it relates to ALS. Exp Neurol. 2014;262(Pt B):84–90. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.001.

RESUME

Les dégénérescences lobaires frontotemporales (DLFT) représentent la troisième étiologie des troubles neurocognitifs chez l'adulte de moins de 65 ans. Les DLFT sont constituées d'un ensemble hétérogène de phénotypes cliniques et sont fréquemment héréditaires. Leurs particularités neuropathologiques communes reposent sur une atrophie des lobes frontaux et/ou temporaux associée à la présence d'inclusions de protéines agrégées parmi lesquelles la protéine *TAR DNA binding protein 43* (TDP43). Actuellement, aucun marqueur protéique n'est validé pour diagnostiquer les DLFT du vivant du patient.

Une cohorte de cas certains DLFT-TDP43 a été constituée grâce au développement d'outils spécifiques de diagnostic moléculaire. Une analyse des concentrations pondérales de protéine TDP43 dans le liquide cérébrospinal (LCS) a été réalisée dans cette cohorte, puis comparée à des cohortes bien caractérisées sur le plan clinique et neuropathologique. Finalement, les profils qualitatifs de la protéine TDP43 ont été étudiés dans différents compartiments accessibles du vivant du patient : les profils des formes solubles (LCS et plasma) et des formes intracellulaires (éléments figurés du sang) de la protéine TDP43 ont été comparés aux profils protéiques obtenus sur des tissus cérébraux présentant des inclusions de protéine TDP43. Les profils protéiques des culots plaquettaires présentent des similitudes avec le tissu cérébral et pourraient devenir un marqueur candidat pour le diagnostic probabiliste des DLFT.

MOTS-CLES : Dégénérescence lobaire frontotemporale ; Protéinopathies ; TDP43 ; C9ORF72 ; Biomarqueurs Profils protéiques ; Criblage à haut débit

TITLE

Towards biomarkers of frontotemporal lobar degeneration: quantitative variations and protein patterns of TDP43 protein in biological matrices

ABSTRACT

Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) syndrome is the third most common etiology of presenile neurocognitive disorders. FTLD is a clinically heterogeneous syndrome and comprises many hereditary cases. Common neuropathological features rely on a degeneration of the frontal and/or anterior temporal lobes, associated to specific inclusions of aggregated proteins including TAR DNA binding protein 43 (TDP43). Unfortunately, no practical protein marker is currently validated to improve FTLD diagnosis in living patients.

A cohort of FTLD patients with definite TDP43 pathology was defined with the development of specific genetic testing. An analysis of TDP43 concentrations in cerebrospinal fluid (CSF) was performed in this cohort and then compared to other cohorts well-characterized on clinical and neuropathological features. Finally, qualitative patterns of TDP43 were studied in compartments accessible from the patient's living: profiles of soluble TDP43 protein (in CSF or in plasma) and intracellular TDP43 protein (in the formed elements of blood) were compared to protein patterns observed in brain tissues with TDP43 protein inclusions. Platelet samples exhibit similar characteristics to brain tissue and could become a candidate biomarker for FTLD probabilistic diagnosis.

KEYWORDS : Frontotemporal lobar degeneration; Proteinopathies; TDP43; C9ORF72; Biomarkers Protein patterns; High throughput screening

INTITULE ET ADRESSE DE L'UMR OU DU LABORATOIRE

U1028/UMR5292 Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL) - Equipe BIORAN (Biomarqueurs radiopharmaceutiques et neurochimiques)
95 boulevard Pinel, 69675 Bron Cedex

Service de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand Est - Unité Médicale Pathologies Neurologiques et Cardiaques - Hospices Civils de Lyon - Centre de Biologie et Pathologie Est
59 boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex