



# Caractérisation d'un modèle murin knock out pour le gène C9orf72

Camille Corbier

## ► To cite this version:

Camille Corbier. Caractérisation d'un modèle murin knock out pour le gène C9orf72. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ080 . tel-02917185

**HAL Id: tel-02917185**

**<https://theses.hal.science/tel-02917185>**

Submitted on 18 Aug 2020

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (ED 414)**  
**IGBMC (CNRS UMR 7104 – Inserm U 964)**

# THÈSE présentée par :

**Camille CORBIER**

soutenue le : **15 Octobre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences du Vivant / Aspects moléculaires et  
cellulaires de la biologie

## Caractérisation d'un modèle murin knock out pour le gène *C9orf72*

**THÈSE dirigée par :**

**M. CHARLET-BERGUERAND Nicolas** DR INSERM, IGBMC, Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme. MARTINAT Cécile**

DR INSERM, I-STEM, Corbeil-Essonnes

**M. KABASHI Edor**

DR INSERM, ICM, Paris

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. DUPUIS Luc**

DR INSERM, Faculté de Médecine, Strasbourg

---

**INVITÉS :**

**Mme. SELLIER Chantal**

CR INSERM, IGBMC, Strasbourg

**Mme. KIRSTETTER Peggy**

CR INSERM, IGBMC, Strasbourg

**M. GROS Frédéric**

MCU-HDR CNRS, IBMC, Strasbourg

# REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord adresser mes remerciements au Dr. Cécile Martinat, au Dr. Edor Kabashi et au Dr. Luc Dupuis, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture et à l'évaluation des travaux présentés dans ce manuscrit.

Je voudrais remercier mon directeur de thèse, le Dr. Nicolas Charlet, pour m'avoir accueillie dans son équipe Maladies à Gain de Fonction d'ARN, pour la confiance qu'il m'a accordée et pour son aide et ses conseils tout au long de mes travaux et pour la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier le Dr. Chantal Sellier, avec qui j'ai pu travailler pendant la première partie de ma thèse lors de l'étude de la fonction de C9ORF72, pour ses conseils et tout son travail sur la SLA qui a conditionné la tournure de ma thèse.

Merci également à Angéline, qui m'a aidée dans mes expériences et a grandement contribué à créer une ambiance de travail chaleureuse et enrichissante.

Merci à Véronique, pour son aide grandement appréciée pour le génotypage des souris et d'autres expériences.

Je souhaite adresser un grand merci aux membres passés et présents de l'équipe du Dr. Charlet, en particulier Michel, Séréna, Manon, Guillaume, Clément et Nacima. Merci à tous pour l'aide que vous avez pu m'apporter et pour avoir créé une bonne ambiance au travail.

Je voudrais chaleureusement remercier les Dr. Frédéric Gros et Peggy Kirstetter pour leur grande contribution dans toute la partie immunologie de mes travaux de thèse, pour leurs conseils et leur aide lors de la planification et la réalisation des expériences.

Merci aux différentes plateformes de l'IGBMC, à Muriel et Claudine pour leur compagnie et leur aide lors de longues heures passées au FACS, aux animaleries conventionnelle et SPF de l'IGBMC et de l'ICS, aux différents services communs de l'IGBMC, à Denis pour sa bonne humeur omniprésente et ses solutions tampons toutes prêtes à l'emploi, et aux différents services administratifs, qui facilitent tous grandement la vie au labo et permettent de travailler dans d'excellentes conditions.

Merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées lors de ces trois années à l'IGBMC, en particulier les différentes équipes du département de Médecine Translationnelle et Neurogénétiques, les membres du SPB, Christophe pour son aide lors de l'organisation de la Retraite.

Merci aux voisins du premier étage, notamment Mélanie, Mélody, Mónica, Aline et Jérémy et aux ex voisins comme Benjamin pour avoir créé une ambiance amicale et chaleureuse.

Merci à Angéline, Chantal, Mélanie, Mónica, Alice, Denis, Guillaume et Jérémy pour les bons moments passés hors du laboratoire, à Strasbourg ou ailleurs.

Un grand merci enfin à ma famille, pour m'avoir encouragée, soutenue et motivée ces trois dernières années surtout dans les moments difficiles, merci à mes parents, mon frère, mes grands-parents et mes amis, je suis très heureuse de vous compter tous parmi mes proches.

A tous ceux qui pourraient un jour lire cette thèse, merci de vous intéresser à mes travaux.

# **SOMMAIRE**

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>REMERCIEMENTS</b>                                                   | 2  |
| <b>ABREVIATIONS</b>                                                    | 11 |
| <b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>                                    | 18 |
| I. La Sclérose Latérale Amyotrophique et la Démence Fronto-Temporale   | 18 |
| A. La Sclérose Latérale Amyotrophique                                  | 18 |
| B. La Démence Fronto-Temporale                                         | 20 |
| C. Continuum entre SLA et DFT                                          | 24 |
| D. Différents gènes impliqués dans la SLA ou la SLA-DFT                | 26 |
| 1. SOD1                                                                | 28 |
| 2. TARDBP                                                              | 29 |
| 3. FUS                                                                 | 31 |
| 4. VCP                                                                 | 32 |
| 5. UBQLN2                                                              | 33 |
| 6. SQSTM1                                                              | 33 |
| 7. OPTN                                                                | 34 |
| 8. TBK1                                                                | 34 |
| E. Une expansion de répétitions GGGGCC est la cause majeure de SLA-DFT | 35 |
| 1. Gène C9ORF72                                                        | 35 |
| 2. Mutation dans C9ORF72                                               | 36 |
| 3. Mécanismes conduisant à la pathologie                               | 38 |
| F. Étude de la fonction de C9ORF72                                     | 42 |
| G. Les Rab-GTPases                                                     | 43 |
| 1. Rôle biologique et propriétés                                       | 43 |
| 2. C9ORF72 et les Rab-GTPases                                          | 44 |
| II. L'autophagie                                                       | 45 |
| A. Mécanismes généraux                                                 | 45 |
| 1. L'autophagie médiée par les protéines chaperones                    | 46 |
| 2. La micro-autophagie                                                 | 48 |
| 3. La macro-autophagie                                                 | 48 |
| B. Implication de l'autophagie dans la SLA-DFT                         | 52 |
| III. Les acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative         | 54 |
| A. L'hématopoïèse                                                      | 58 |
| B. Cellules clés de l'immunité innée                                   | 60 |
| 1. Les macrophages                                                     | 60 |
| 2. Les cellules dendritiques                                           | 62 |
| a) Cellules dendritiques conventionnelles                              | 62 |

|                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------|-----|
| (1) Ontogénie .....                                                       | 62  |
| (2) Rôle .....                                                            | 64  |
| b) Cellules dendritiques plasmacytoïdes .....                             | 65  |
| (1) Rôle .....                                                            | 66  |
| (2) Activation .....                                                      | 66  |
| C. Les lymphocytes B et T, cellules clés de l'immunité adaptative .....   | 69  |
| 1. Ontogénie des lymphocytes B et T .....                                 | 69  |
| 2. Différenciation des cellules effectrices LT CD8+ et CD4+ .....         | 70  |
| <b>OBJECTIFS</b> .....                                                    | 73  |
| <b>MATERIELS ET METHODES</b> .....                                        | 77  |
| I. Modèles murins .....                                                   | 77  |
| A. Génération de souris <i>C9orf72</i> KO .....                           | 77  |
| B. Génération des souris présentant un KO <i>C9orf72</i> spécifique ..... | 79  |
| C. Génération des souris <i>Smcr8</i> KO .....                            | 80  |
| II. Phénotypage des souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre .....       | 81  |
| III. Analyse du sérum des souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre ..... | 82  |
| IV. ImmunoHistoChimie .....                                               | 83  |
| V. Immunophénotypage .....                                                | 84  |
| A. Préparation des échantillons .....                                     | 84  |
| B. Marquage extracellulaire .....                                         | 85  |
| C. Marquage intracellulaire .....                                         | 91  |
| VI. Cultures de BMpDC .....                                               | 91  |
| A. Préparation des échantillons .....                                     | 91  |
| B. Mise en culture et différenciation en BMpDC .....                      | 93  |
| C. Tri des cellules mises en culture .....                                | 93  |
| D. Induction des BMpDC .....                                              | 94  |
| VII. Extraction d'ARN .....                                               | 95  |
| VIII. RTqPCR .....                                                        | 95  |
| IX. Cultures cellulaires .....                                            | 96  |
| X. Protocole de transfection .....                                        | 96  |
| XI. Co-Immunofluorescence .....                                           | 97  |
| XII. Isolation cellulaire par billes magnétiques .....                    | 97  |
| XIII. Immunoblots .....                                                   | 98  |
| <b>RESULTATS PARTIE 1</b> .....                                           | 101 |
| <b>RESULTATS PARTIE 2</b> .....                                           | 105 |
| <b>Caractérisation du modèle murin <i>C9orf72</i> KO</b> .....            | 105 |

|      |                                                                                                                                         |     |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| I.   | Modèle murin <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre .....                                                                                   | 105 |
| A.   | Génération du modèle murin <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre et vérification du génotype.....                                          | 105 |
| B.   | Absence de symptômes correspondant à une SLA/DFT dans le modèle murin <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre KO .....                       | 106 |
| 1.   | Suivi du poids des animaux <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre .....                                                                     | 107 |
| 2.   | Phénotype locomoteur.....                                                                                                               | 107 |
| 3.   | Phénotype cognitif .....                                                                                                                | 111 |
| C.   | Découverte d'un désordre immunitaire sévère dans les souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre .....                                    | 113 |
| 1.   | Hyperplasie des ganglions lymphatiques et de la rate des souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre.....                                 | 113 |
| 2.   | Histologie des rates et ganglions lymphatiques des souris <i>C9orf72</i> <sup>-/-</sup> .....                                           | 115 |
| 3.   | Analyses sériques des souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre.....                                                                    | 115 |
| 4.   | Histologie des reins des souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CV Cre .....                                                                 | 117 |
| II.  | Identification de la population cellulaire responsable du désordre immunitaire chez les souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre ..... | 119 |
| A.   | Génération de nouveaux modèles murins KO pour <i>C9orf72</i> .....                                                                      | 119 |
| B.   | Immunophénotypage de la lignée cellulaire dendritique .....                                                                             | 121 |
| 1.   | Immunophénotypage des précurseurs myéloïdes.....                                                                                        | 123 |
| 2.   | Immunophénotypage des progéniteurs dendritiques .....                                                                                   | 125 |
| 3.   | Immunophénotypage des cellules dendritiques pré-conventionnelles.....                                                                   | 125 |
| 4.   | Immunophénotypage des cellules dendritiques conventionnelles .....                                                                      | 127 |
| 5.   | Immunophénotypage des cellules dendritiques plasmacytoïdes .....                                                                        | 127 |
| C.   | Immunophénotypage des pDC chez les souris CMV Cre et CD11c Cre.....                                                                     | 129 |
| D.   | Validation de du rôle de <i>C9orf72</i> dans les cellules dendritiques .....                                                            | 131 |
| 1.   | Etude des lymphocytes B, lymphocytes T et macrophages .....                                                                             | 131 |
| 2.   | Etude des cellules dendritiques.....                                                                                                    | 133 |
| III. | Reproduction du phénotype immature des pDC en cellules .....                                                                            | 135 |
| A.   | Culture de pDC dérivées à partir de moelle osseuse (BMpDC).....                                                                         | 135 |
| B.   | Expression d'interféron par induction des BMpDC.....                                                                                    | 137 |
| IV.  | Autres modèles murins .....                                                                                                             | 139 |
| A.   | Génération de modèles murins <i>Smcr8</i> KO .....                                                                                      | 139 |
| B.   | Hyperplasie des ganglions lymphatiques et de la rate des souris <i>Smcr8</i> KO .....                                                   | 139 |
| C.   | Immunophénotypage des lymphocytes T chez les souris <i>Smcr8</i> KO .....                                                               | 141 |
| D.   | Immunophénotypage des cellules dendritiques plasmacytoïdes chez les souris <i>Smcr8</i> KO ..                                           | 141 |
|      | <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....                                                                                                 | 145 |
| I.   | Caractérisation des fonctions moléculaires et cellulaires de C9ORF72 .....                                                              | 145 |
| II.  | Conséquences de la perte de C9ORF72 en modèle murin.....                                                                                | 146 |

|      |                                                                                                                                         |     |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III. | Identification de la population cellulaire responsable du désordre immunitaire chez les souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre ..... | 147 |
| A.   | Génération de nouveaux modèles murins KO pour le gène <i>C9orf72</i> .....                                                              | 147 |
| B.   | Immunophénotypage de la lignée cellulaire dendritique chez les souris KO pour <i>C9orf72</i> ...                                        | 148 |
| C.   | Validation de la lignée cellulaire impliquée dans le phénotype inflammatoire.....                                                       | 149 |
| IV.  | Reproduction du phénotype immature des pDC en cellules .....                                                                            | 150 |
| V.   | Modèle murin SMCR8 .....                                                                                                                | 151 |
| VI.  | Identification du rôle spécifique de du complexe <i>C9orf72</i> /Smcr8 dans la régulation de la voie de signalisation TLR7/TLR9.....    | 152 |
| VII. | Autres modèles murins .....                                                                                                             | 153 |
| A.   | Modèle murin avec un KO spécifique de <i>C9orf72</i> dans les pDC .....                                                                 | 153 |
| B.   | Modèle murin présentant un double KO pour <i>C9orf72</i> et le récepteur à l'interféron .....                                           | 154 |

## Liste des tableaux

|           |                                                                                           |     |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Table 1 : | Marquage Précurseurs Myéloïdes Communs.....                                               | 87  |
| Table 2 : | Marquage Précurseurs Myéloïdes Dendritiques et des Progéniteurs Dendritiques Communs..... | 88  |
| Table 3 : | Marquage Cellules Dendritiques Préconventionnelles.....                                   | 88  |
| Table 4 : | Marquage Cellules Dendritiques Conventionnelles.....                                      | 89  |
| Table 5 : | Marquage Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes.....                                        | 89  |
| Table 6 : | Marquage pour le phénotypage des pDC et CDc.....                                          | 90  |
| Table 7 : | Primers et protocole Light-Cycler utilisés pour les qPCR.....                             | 196 |

## Liste des figures

|            |                                                                                                 |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : | Atteintes des motoneurones supérieurs et inférieurs dans la SLA.....                            | 17 |
| Figure 2 : | Classification des sous-formes de DFT associées à la SLA.....                                   | 21 |
| Figure 3 : | Classification des différents variants d'APP.....                                               | 23 |
| Figure 4 : | Gènes impliqués dans la SLA, la DFT et la SLA/DFT.....                                          | 27 |
| Figure 5 : | Schéma du gène <i>C9ORF72</i> , des différents transcrits et des deux isoformes protéiques..... | 37 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 6 : Modèles de toxicité des répétitions GGGGCC au sein du gène <i>C9ORF72</i> .....                                                                                                                                                                                                   | 39  |
| Figure 7 : Différentes formes d'autophagie.....                                                                                                                                                                                                                                              | 47  |
| Figure 8 : Mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de l'autophagie.....                                                                                                                                                                                                           | 51  |
| Figure 9 : Implication de la protéine C9ORF72 dans l'autophagie.....                                                                                                                                                                                                                         | 53  |
| Figure 10 : Interactions entre immunité innée et adaptative.....                                                                                                                                                                                                                             | 57  |
| Figure 11 : Hématopoïèse.....                                                                                                                                                                                                                                                                | 59  |
| Figure 12 : Ontogénie des cellules dendritiques et facteurs de transcription mis en jeu.....                                                                                                                                                                                                 | 63  |
| Figure 13 : Voies de signalisation des TLR intracellulaires dans les pDC.....                                                                                                                                                                                                                | 67  |
| Figure 14 : Différentes sous-populations de LT CD4+.....                                                                                                                                                                                                                                     | 71  |
| Figure 15 : Génération du modèle murin <i>C9orf72</i> flox x CMV Cre.....                                                                                                                                                                                                                    | 76  |
| Figure 16 : Génération du modèle murin <i>C9orf72</i> KO dans différentes populations cellulaires.....                                                                                                                                                                                       | 78  |
| Figure 17 : Immunophénotypage des cellules dendritiques et de leurs précurseurs cellulaires.....                                                                                                                                                                                             | 86  |
| Figure 18 : Knock out du gène <i>C9orf72</i> en modèle murin : contrôle de l'expression de <i>C9orf72</i><br>et effet sur la longévité des animaux.....                                                                                                                                      | 104 |
| Figure 19 : Histogramme montrant les masses corporelles totales et le contenu en masse grasse<br>et en masse maigre des animaux <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre.....                                                                                                                      | 108 |
| Figure 20 : Tests locomoteurs des souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre.....                                                                                                                                                                                                             | 109 |
| Figure 21 : Tests cognitifs des souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre.....                                                                                                                                                                                                               | 110 |
| Figure 22 : Photographies montrant les ganglions lymphatiques et les rates de souris wild type<br>et <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre.....                                                                                                                                                 | 112 |
| Figure 23 : IHC sur des coupes de ganglions axillaires des souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre de<br>6 mois.....                                                                                                                                                                       | 114 |
| Figure 24 : Histogrammes présentant les résultats d'analyses des immunoglobulines du sérum<br>des souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre.....                                                                                                                                             | 116 |
| Figure 25 : IHC sur des coupes de reins des souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre et wild type<br>de 6 mois .....                                                                                                                                                                        | 118 |
| Figure 26 : Photographies montrent des ganglions lymphatiques et des rates de souris WT,<br><i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre, <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CD11c Cre, <i>C9orf72</i> loxP/loxP x<br>LysM Cre, <i>C9orf72</i> loxP/loxP x Mb1 Cre, et <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CD4 Cre..... | 120 |
| Figure 27 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des précurseurs<br>myéloïdes des lignées <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre et wild type en cytométrie en<br>flux.....                                                                                        | 122 |
| Figure 28 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des progéniteurs<br>myéloïdes dendritiques des lignées <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre et wild type en<br>cytométrie en flux.....                                                                          | 124 |

|                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 29 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques pré-conventionnelles des lignées <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre et wild type en cytométrie en flux.....                                      | 124 |
| Figure 30 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques conventionnelles des lignées <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre et wild type en cytométrie en flux.....                                          | 126 |
| Figure 31 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques plasmacytoïdes des lignées <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre et wild type en cytométrie en flux.....                                            | 126 |
| Figure 32 : Histogrammes présentant l'expression de différents marqueurs extra et intracellulaires par les pDC des lignées <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre et wild type en cytométrie en flux.....                                                     | 128 |
| Figure 33 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques plasmacytoïdes des lignées <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre, <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CD11c Cre et wild type en cytométrie en flux.....      | 130 |
| Figure 34 : Immunoblot illustrant l'expression de protéines liées à l'autophagie ou à l'inflammation dans les lymphocytes B, T et les macrophages de la souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre comparées à des wild type.....                          | 132 |
| Figure 35 : Immunoblots illustrant l'expression de protéines liées à l'autophagie ou à l'inflammation dans les cellules dendritiques des souris <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre et <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CD11c Cre comparées à des wild type..... | 132 |
| Figure 36 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques plasmacytoïdes des lignées <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre, <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CD11c Cre et wild type en cytométrie en flux.....      | 134 |
| Figure 37 : Histogramme illustrant l'expression de <i>C9orf72</i> et d'interféron de type I dans les BMpDC des lignées <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre, <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CD11c Cre et wild type.....                                         | 136 |
| Figure 38 : Histogramme illustrant l'expression de <i>C9orf72</i> et d'interféron de type I dans les BMpDC des lignées <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CMV Cre, <i>C9orf72</i> loxP/loxP x CD11c Cre et wild type.....                                         | 136 |
| Figure 39 : Conséquences de la perte d'expression de <i>Smcr8</i> <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                                                   | 138 |
| Figure 40 : Photographies montrant les ganglions lymphatiques et les rates de souris wild type et <i>Smcr8</i> KO.....                                                                                                                                    | 138 |
| Figure 41 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques plasmacytoïdes des lignées <i>Smcr8</i> KO et wild type en cytométrie en flux....                                                                | 140 |
| Figure 42 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques plasmacytoïdes des lignées <i>Smcr8</i> KO et wild type en cytométrie en flux....                                                                | 142 |

# ABREVIATIONS

Les facteurs de transcription directement en lien avec ce sujet de recherche ont été indiqués dans les abréviations. Les autres facteurs mentionnés dans ce manuscrit ont été nommés avec leurs abréviations usuelles.

ADARB2 : Adenosine Deaminase RNA Specific B2

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AIM2 : Absent In Melanoma 2

AMPK : AMP-activated protein Kinase

APP : Aphasie Progressive Primaire

APPvl : Variant logopénique de l'Aphasie Progressive Primaire

APPvnf : Variant non fluent de l'Aphasie Progressive Primaire

APPvs : Variant sémantique de l'Aphasie Progressive Primaire

ARN : Acide RiboNucléique

ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD

ATXN2 : Ataxine 2

ATG : Autophagy Related Genes

BCR : B cell receptor

BECN1 : Beclin-1

BMpDC : Bone Marrow derived plasmacytoid Dendritic Cells

BSA : bovine serum albumine

BST2 : bone marrow stromal antigen 2

bvDFT : variant comportemental de la Démence Fronto-Temporale

C9ORF72 : Chromosome 9 open reading frame 72

CCNF : Cyclin-F

CCR9 : C-C chemokine Receptor type 9

CDP : Progéniteurs Dendritiques Communs

CLP : précurseur lymphoïde commun

CMA : Chaperone Mediated Autophagy

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMP : Précurseurs Myéloïdes Communs  
CMV : Cytomégalovirus  
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène  
DAB : 3,3-diaminobenzidine tétrahydrochloride  
DAMP : Danger-Associated Molecular Pattern  
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole  
DC : cellules dendritiques  
DENN : Differentially Expressed in Normal and Neoplastic cells  
DFCP1 : Double FYVE-containing protein 1  
DFT : Démence Fronto-Temporale  
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DPR : DiPeptide Repeats  
EDTA : Ethylène Diamine TétraAcétique  
FSC : Forward SCatter  
FIP200 : FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa  
Flt3 : fms like tyrosine kinase 3  
Flt3-L : Flt3-Ligand  
FSLA : Sclérose Latérale Amyotrophique Familiale  
FUS : FUsed in Sarcoma  
GM-CSFR : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor  
GABARAP : Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein  
GAP : GTPase Activating Protein  
GAPDH : GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase  
GEF : GDP/GTP Exchange Factor  
GMP : précurseurs myéloïdes granulocytaires  
hnRNP : heterogenous nuclear RiboNucleoProtein  
HSC : cellule souche hématopoïétique  
hsc70 : heat shock cognate protein 70  
IFN : interféron  
Ig : Immunoglobuline  
IHC : immunohistochimie

I $\kappa$ B $\alpha$ : NF- $\kappa$ B inhibitor alpha  
 IKK : NF- $\kappa$ B inhibitor Kinase  
 IL : Interleukine  
 iPSC : induced Pluripotent Stem Cells  
 IRAK : Interleukin-1 receptor-associated kinase  
 IRF : Interferon Regulatory Factor  
 KI : Knock In  
 KO : Knock Out  
 LAMP2 : Lysosome Associated Membrane Protein type 2A  
 LC3B : Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3  
 LPS : Lipopolysaccharides  
 M-CSFR : macrophage colony stimulating factor receptor  
 MAMP : Microbes-Associated Molecular Pattern  
 MAP1LC3 : Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3  
 MAPT : Microtubule-associated protein tau  
 MDP : Progéniteurs Dendritiques Myéloïdes  
 MEP : Précurseurs Myéloïdes Erythrocytaires  
 MMLV : Moloney murine leukemia *virus*  
 MPP : progéniteur multipotent  
 mTOR : mammalian Target Of Rapamycin  
 MyD88 : Myeloid differentiation primary response protein  
 NaCl : Chlorure de Sodium  
 NDP52 : Nuclear Dot Protein 52 kDa  
 NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor kappa B  
 NK : Natural Killer  
 OPTN : Optineurine  
 PBS : phosphate buffered saline  
 pDC : Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes  
 PDCA1 : plasmacytoid dendritic cells antigen 2  
 pré-DC : cellules dendritiques pré-conventionnelles  
 PGRN : Progranuline

PRR : Pattern Recognition Receptor

PtdIns : Phosphatidylinositides

PtdIns3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate

Pur $\alpha$  : Purine-rich binding protein alpha

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

Rab : Ras-related proteins in brain

RAN : Repeat-Associated Non ATG

rpm : rotation par minute

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SMCR8 : Smith Magenis syndrome Chromosome Region candidate 8

SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor

SOD1 : Superoxyde Dismutase 1

SPF : Specific Pathogen Free

SQSTM1 : Sequestosome 1

SSC : Side Scatter

SSLA : Sclérose Latérale Amyotrophique Sporadique

TAB2 : TAK1 Binding protein 2

TAK1 : Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1

TARDBP : Transactive Response DNA binding protein

TAXBP1 : Tax Binding Protein 1

TBS-T : Tris-Buffered Saline – Tween20

TCR : T Cell Receptor

TDP-43 : Transactive Response DNA DNA binding protein 43

TBK1 : TANK Binding Kinase 1

TCR : T cell receptor

Th : lymphocyte T helper

TLR : Toll-Like Receptor

TLS : Translocated in LipoSarcoma

TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha

TRAF : TNF receptor-associated factor

UBQLN2 : Ubiquilin-2

ULK1 : Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1

VCP : Valosin Containing Protein

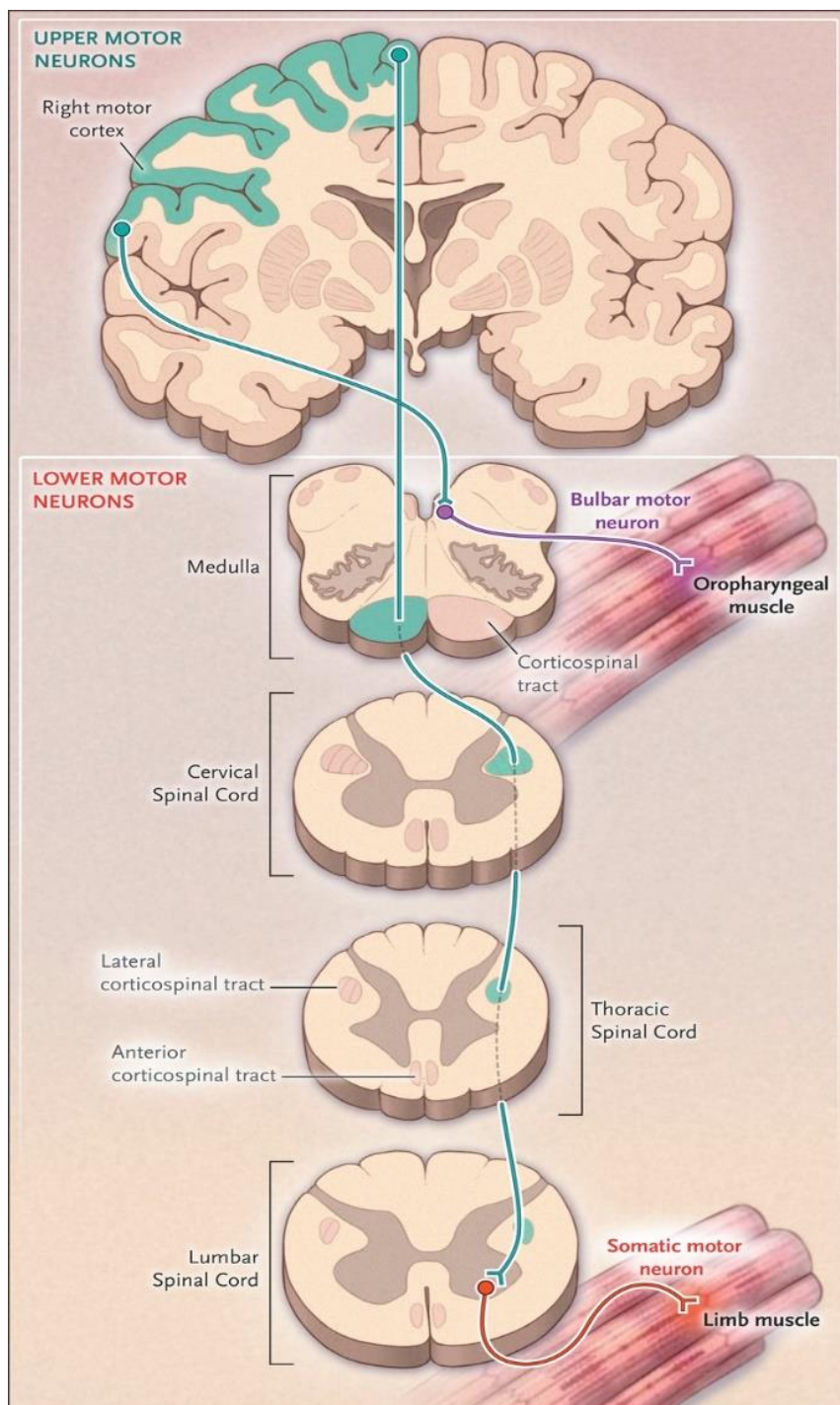
VSP34 : Phosphatidylinositol 3-kinase

WDR41 : WD repeat containing protein 41

WIPI2 : WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2

WT : wild type

# **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**



**Figure 1 : Atteintes des motoneurones supérieurs et inférieurs dans la SLA (d'après Brown *et al.* 2017)**

Les atteintes des motoneurones supérieurs entraînent des spasticités, une hyperéflexie et un syndrome pseudo-bulbaire, tandis que des atteintes des motoneurones inférieurs engendrent des atrophies musculaires et une faiblesse accompagnée de fasciculations.

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

## I. La Sclérose Latérale Amyotrophique et la Démence Fronto-Temporale

### A. La Sclérose Latérale Amyotrophique

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), également appelée maladie de Charcot en Europe ou maladie de Lou Gehrig aux Etats Unis, est la plus fréquente des maladies liées aux motoneurones. Son incidence est de 2,16 cas pour 100 000 personnes par an pour une prévalence d'environ 1/20 000 personnes, et elle touche environ 1,5 homme pour 1 femme (Logroscino *et al.*, 2010). La SLA sporadique apparaît généralement entre 55 et 65 ans, mais peut également se manifester chez des sujets plus vieux ou plus jeunes, notamment dans les cas d'origine génétique. La SLA est une affection neurodégénérative caractérisée par une dégénérescence des motoneurones supérieurs et inférieurs, se manifestant par une faiblesse et une atrophie musculaire menant à la paralysie. En évoluant, la maladie peut atteindre les muscles nécessaires à la respiration et dans plus de la moitié des cas, les patients atteints de SLA décèdent entre 3 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes, le plus souvent d'une insuffisance respiratoire (Yamashita and Ando, 2015) (figure 1).

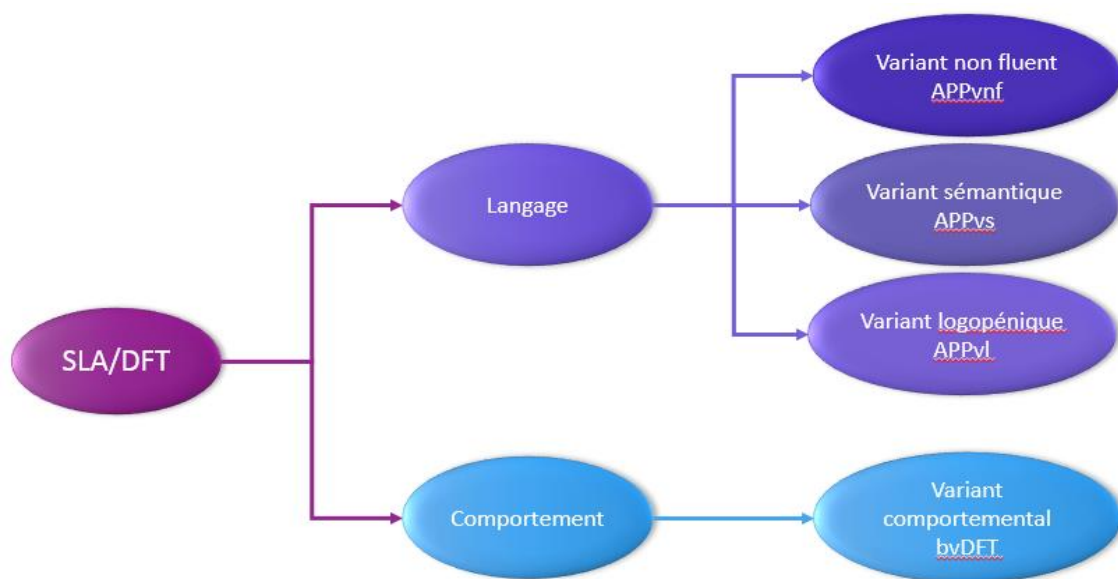
La SLA dite « typique » peut se présenter sous deux formes principales : la forme bulbaire et la forme spinale. Environ 2/3 des patients sont atteints de la forme spinale de la maladie, qui se caractérise par l'atteinte asymétrique des membres supérieurs ou inférieurs. Comme son nom l'indique, la forme spinale est due à la dégénérescence des motoneurones présents dans la moelle épinière. La maladie débute avec une sensation de faiblesse dans un seul membre, suivie par une atrophie musculaire, et accompagnée de spasmes musculaires aussi nommés fasciculations. Ces symptômes peuvent parfois évoluer en crampes prolongées avec une raideur dans les membres qui gênent leur utilisation et impactent la dextérité du patient et sa démarche (Swash and Desai, 2000; Wijesekera and Leigh, 2009). La forme bulbaire, quant à elle, représente environ 30% des cas de SLA. Les patients présentent en premier lieu des problèmes de phonation et d'articulation aussi nommés dysarthries, et développent par la suite des problèmes de déglutition engendrant chez la majorité des patients une accumulation excessive de salive (Kühnlein *et al.*, 2008). Ces deux formes peuvent se développer simultanément ou se succéder rapidement généralement dans les 2 ans après l'apparition des symptômes de la première forme, pour évoluer conjointement vers la forme complète de SLA composée de la forme spinale et de la forme bulbaire.

Bien que la majorité des cas de SLA soient sporadiques (SSLA), environ 10% des patients présentent une forme familiale (FSLA) due à des mutations génétiques. Ainsi, les premières mutations causant une SLA furent identifiées en 1993 dans le gène *SOD1* (Cu-Zn superoxyde dismutase 1) (Rosen *et al.*, 1993). Depuis, de nombreuses mutations dans environ 30 gènes (comme *OPTN*, *SQSTM1*, *UBQLN2*, *TARDBP*, *FUS*, *TBK1*, *C9ORF72*, *CCNF* ou *C9ORF72*) ont été identifiées pour leur rôle dans le développement de cette maladie (Kabashi *et al.*, 2008; Vance *et al.*, 2009; DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011; Freischmidt *et al.*, 2015;

Williams *et al.*, 2016). Il s'agit généralement de mutations avec une transmission autosomale dominante (Cooper-Knock *et al.*, 2015), mais il existe de rares cas avec une transmission autosomale récessive, ou encore liée à l'X, par exemple pour le gène de l'ubiquilin 2 (UBQLN2) (Chen *et al.*, 2013). Les patients avec une forme familiale de SLA montrent généralement une apparition des symptômes à un âge plus précoce et une évolution plus rapide de la maladie, l'exemple le plus frappant étant les porteurs de mutations dans le gène FUS qui peuvent développer une SLA dès l'âge de 18 à 20 ans. Je reviendrai dans les chapitres suivants (§I.D et §I.E) à la description de ces mutations, notamment dans le gène C9ORF72, et leur rôle dans la SLA.

## B. La Démence Fronto-Temporale

La Démence Fronto-Temporale (DFT) est la troisième forme la plus commune de démence dégénérative après la maladie d'Alzheimer et les démences à corps de Lewy (Vieira *et al.*, 2013). Son incidence est d'environ 1,6 cas pour 100 000 personnes par an, pour une prévalence de 15 à 22 cas pour 100 000 personnes (Coyle-Gilchrist *et al.*, 2016; Podcasy and Epperson, 2016). Cette pathologie apparaît généralement chez des sujets âgés de 55 à 70 ans, avec environ 13% des patients développant la maladie avant l'âge de 50 ans. Bien que des premières études sur de faibles effectifs suggéraient une plus forte incidence de la DFT chez les hommes que chez les femmes (de 3 à 4,7 hommes / 1 femme), cette répartition ne fut pas confirmée par des recherches ultérieures (Mercy *et al.*, 2008; Podcasy and Epperson, 2016). Enfin, il est estimé que 30 à 50% des cas de Démences Fronto-Temporales sont d'origine génétique (*cf.* §I.C).



**Figure 2 : Classification des sous-formes de DFT associées à la SLA** (modifié d'après Zago *et al.* 2011)

Les DFT associées à la SLA engendrent des troubles du comportement (bvDFT) ou des atteintes du langage qui peuvent se présenter sous trois formes, le variant sémantique, APPvs, le variant non fluent APPvnf et le variant logopénique APPvl.

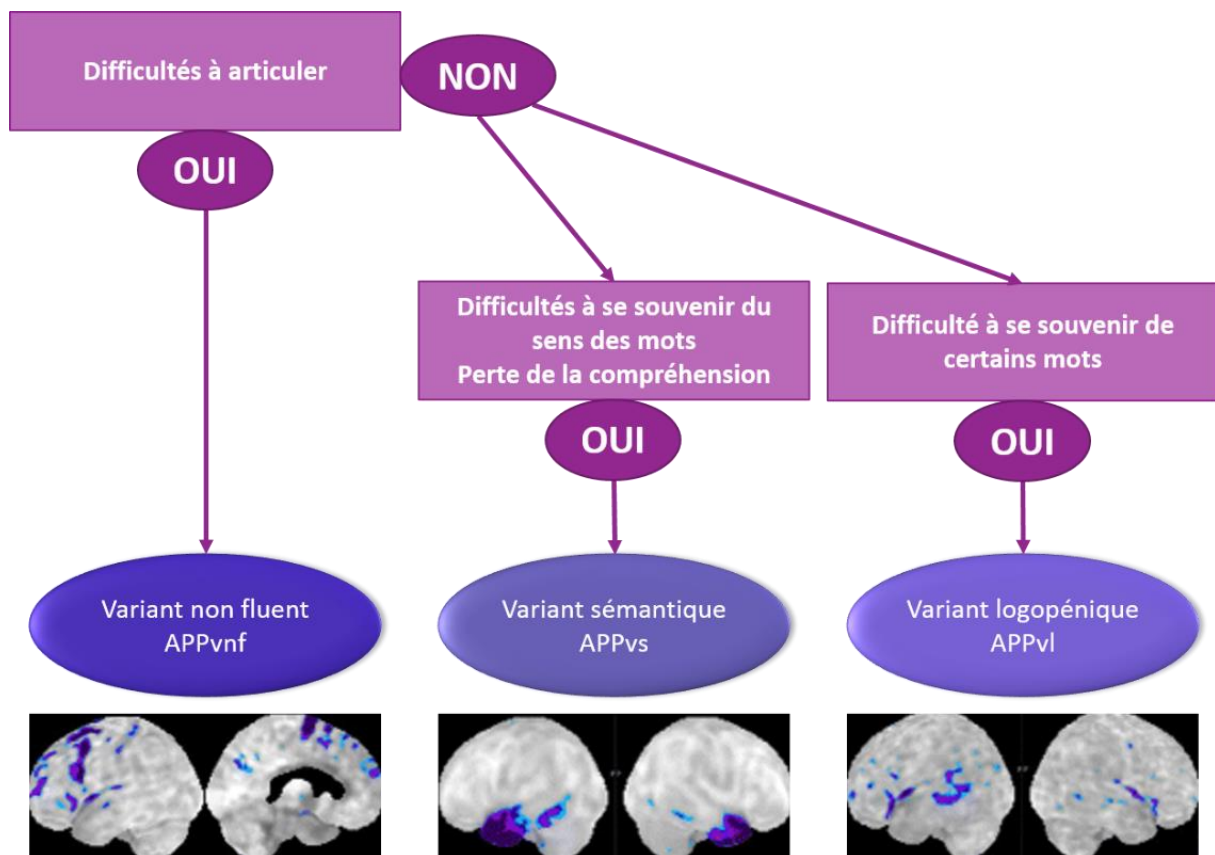
La DFT est due à l'atrophie progressive des lobes frontal et temporaux du cerveau, ce qui peut engendrer des troubles cliniquement hétérogènes. Ceux-ci peuvent être classifiés en deux catégories majeures basées soit sur une altération du langage, soit sur une altération du comportement (figure 2).

- Le variant comportemental (appelé bvDFT pour « behavior variant FrontoTemporal Dementia ») se caractérise par des changements dans le comportement, la personnalité et le contrôle émotionnel. Le patient peut ainsi présenter une altération de la conduite en société, avec un manque de tact et une désinhibition, une apathie physique ou affective (indifférence), une difficulté à s'adapter à de nouvelles situations, ainsi qu'une incapacité à exprimer des émotions primaires comme la joie ou la tristesse et des émotions sociales comme l'embarras ou l'empathie. Le patient présente aussi des difficultés à être conscient des symptômes qui l'affectent ou de sa perte d'émotions face à certaines situations (Snowden *et al.*, 2002; Olney *et al.*, 2017).

- L'aphasie progressive primaire (APP) se caractérise par des difficultés de langage. Il est possible de classer les APP en 3 sous catégories en fonction des altérations de langage observées chez les patients (figure 3).

- Le « variant non fluent » (APPvnf) : le patient présente une capacité de parole altérée, avec une élocution lente, une articulation difficile et une insertion/délétion voire substitution de syllabes, qui au fil du temps poussent les sujets vers une communication non verbale. Le patient garde cependant la compréhension des mots qu'il souhaite utiliser et peut écrire des phrases correctes.

- Le variant sémantique (APPvs) : le patient perd progressivement sa connaissance du sens des mots et sa capacité à nommer les objets, en commençant par des mots très peu



**Figure 3 : Classification des différents variants d'APP (d'après Vandenberghe, 2016)**

Classification des différents variants d'APP selon 3 grands critères permettant de les différencier et représentation des zones du cerveau atteintes lors du développement de ces APP.

utilisés pour finalement oublier des mots très courants. Cette forme a une progression très lente, les patients peuvent ainsi rester jusqu'à une dizaine d'années sans présenter d'autres symptômes, avant de développer une bvDFT.

- Le variant logopénique (APPvI) : le patient présente des difficultés à se souvenir de certains mots mais garde une connaissance de leur sens, rendant la parole hésitante quand le patient doit utiliser un mot peu courant ou former de phrases complexes. Le patient n'a cependant pas de problèmes d'élocution ou d'articulation contrairement à l'APPvnf (Baumann *et al.*, 2009; Olney *et al.*, 2017).

### C. Continuum entre SLA et DFT

Il est important de noter que la démence fronto-temporale et la sclérose latérale amyotrophique sont maintenant considérées comme pouvant faire partie d'un même spectre clinique. Ce continuum a été mis en évidence par des recherches cliniques, histopathologiques et génétiques chez des patients sporadiques ou des familles atteintes de SLA, de DFT, voire par ces deux maladies (cas de SLA-DFT).

Ainsi au niveau clinique, des études pionnières ont mis en évidence, outre les problèmes moteurs caractéristiques de la maladie, des troubles comportementaux ou mentaux parmi presque 50% des patients atteints de SLA qui correspondent chez environ 15% des patients à un diagnostic de Démence Fronto-Temporale. De même, chez les patients atteints de DFT, 40% des sujets présentent aussi des déficits moteurs dont 15% sont compatibles avec une SLA (Ringholz *et al.*, 2005; Burrell *et al.*, 2011).

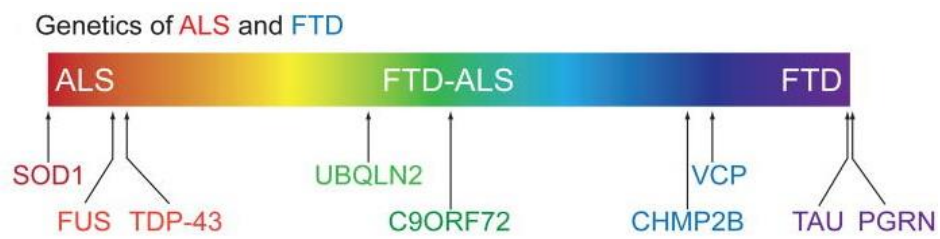
Au niveau histopathologique, ces deux syndromes présentent des caractéristiques communes tant pour les formes familiales que sporadiques, la plus notable étant la présence d'agrégats de protéine TDP-43 (codée par le gène *TARDBP*) tronquée et phosphorylée qui s'accumule dans le cytoplasme des neurones des patients (Neumann *et al.*, 2006). Il est important de noter que ces agrégats sont localisés dans les zones lésées du cerveau et/ou de la moelle épinière des patients, soit les motoneurones et/ou les neurones des zones corticales frontales et temporales. Ces agrégats de TDP-43 sont retrouvés chez environ 95% des patients atteints de SLA et 50% des cas de DFT, créant ainsi une caractéristique pathologique commune entre SLA et DFT (Xu and Yang, 2014). On peut aussi noter pour les cas de SLA, DFT et SLA-DFT dus à une expansion de répétitions GGGGCC dans le gène *C9ORF72*, la présence d'agrégats protéiques composés de « Dipeptide Repeats (DPR) », codés par les répétitions, et associés à la protéine p62, impliquée dans l'autophagie. De façon étonnante, les agrégats de DPR/p62 et les agrégats de TDP-43 se situent majoritairement dans des zones distinctes, les agrégats de DPR étant plutôt observés dans des zones du cerveau peu ou pas affectées, contrairement aux inclusions de TDP-43 qui sont caractéristiques des zones atteintes de neurodégénérescence (Mackenzie *et al.*, 2015; Khosravi *et al.*, 2016). Enfin, toutes les formes de SLA et de DFT ne sont pas associées à la présence d'agrégats de TDP-43. C'est le cas notamment lorsque des mutations sont présentes dans les gènes *SOD1*, *FUS* ou *MAPT*, qui présentent à la place des agrégats des protéines associées à ces gènes, soit respectivement SOD1, FUS ou Tau (Sheng *et al.*, 2012; Blokhuis *et al.*, 2013).

Enfin, la découverte de mutations génétiques, notamment dans *C9ORF72*, *TARDBP*, *FUS* ou *TBK1* pour les plus fréquentes, pouvant conduire soit à une SLA, soit à une DFT soit à l'apparition concomitante d'une SLA-DFT a définitivement confirmé l'existence d'un

continuum entre ces deux maladies (Kabashi *et al.*, 2008; DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011; Freischmidt *et al.*, 2015). Toutefois, si certaines mutations sont à l'origine de cas de SLA couplée à la DFT, certains gènes mutés sont responsables uniquement de formes dites « pures » de SLA ou de DFT. Ainsi, des mutations dans le gène *SOD1* conduisent à des symptômes correspondant à une SLA seule, et des mutations dans *MAPT* et progranuline (*PGRN*) conduisent à des cas de DFT sans signes de SLA (Rosen *et al.*, 1993; Rademakers *et al.*, 2004; Baker *et al.*, 2006). Au final, si une trentaine de gènes sont désormais connus comme associés à la SLA, la DFT ou à des cas de SLA-DFT, des mutations dans quatre gènes (*C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP* et *FUS*) sont responsables de plus de la moitié des formes familiales de SLA. De même, des mutations dans les gènes *C9ORF72*, *MAPT* et *PGRN* sont responsables de plus des deux tiers des cas de DFT familiales (Renton *et al.*, 2011; Woollacott and Rohrer, 2016; Olszewska *et al.*, 2016). Je vais donc m'attacher à décrire les mutations et les fonctions de ces différents gènes dans le chapitre suivant.

#### D. Différents gènes impliqués dans la SLA ou la SLA-DFT

Au fil des années, différents gènes impliqués dans les formes pures de SLA ou les SLA-DFT ont été identifiés. Je vais ici détailler les gènes les plus fréquemment impliqués dans les formes familiales et sporadiques (figure 4).



**Figure 4 : Gènes impliqués dans la SLA, la DFT et la SLA/DFT (adapté de Ling *et al.*, 2013).**

Des mutations dans certains gènes provoquent une SLA ou une DFT ou même les deux pathologies (SLA/DFT) selon les individus. Des mutations dans d'autres gènes donnent au contraire des formes « pures » de SLA (*SOD1*) ou de DFT (*MAPT*).

## 1. *SOD1*

Le gène *SOD1* est localisé sur le bras long du chromosome 21. Ce gène code pour la superoxyde dismutase, une protéine abondamment exprimée dans le cytoplasme. Le rôle de cette protéine est de convertir les ions superoxydes  $O_2^{\cdot -}$  produits par les mitochondries en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  ou en oxygène, ce qui en fait un antioxydant majeur de la cellule.

La découverte de mutations autosomales dominantes faux sens dans *SOD1* en 1993 en fait le premier gène découvert comme impliqué dans la SLA (Rosen *et al.*, 1993). Depuis, plus d'une centaine de mutations dominantes ou récessives dans le gène de *SOD1* ont été identifiées et peuvent expliquer environ 10 à 15% des cas de SLA familiaux, et environ 1 à 3% des cas de SLA sporadiques (Cudkowicz and Brown, 1996; Andersen, 1997; Chiò *et al.*, 2008; Renton *et al.*, 2014). Il existe une grande variabilité dans les symptômes observés chez les patients en fonction de leur mutation dans *SOD1*. En effet, certaines mutations conduisent à une forme de SLA très agressive à développement très rapide, conduisant à la mort du patient en moins d'un an après l'apparition des premiers symptômes, comme par exemple la mutation A4V, la plus fréquente dans la population nord-américaine. D'autres mutations, comme D90A, conduisent à une forme de SLA au développement beaucoup plus lent, les patients ne développant la phase terminale de la maladie qu'après une dizaine d'années (Cudkowicz and Brown, 1996; Andersen, 1997; Renton *et al.*, 2014). Ces diverses mutations ne semblent pas être pathogéniques via une perte de fonction de la protéine *SOD1*, mais conduisent à un gain de fonction toxique et à l'accumulation de protéine *SOD1* mutée sous forme d'agrégats cytoplasmiques dans les neurones atteints des patients. Ces patients ne présentent pas d'inclusions de TDP43. Enfin, il est à noter que l'insertion de mutation *SOD1*

dans le génome de la souris a permis d'établir les premiers modèles murins de SLA, et reste à ce jour un modèle animal de choix pour étudier cette pathologie.

## 2. *TARDBP*

Le gène *TARDBP* ou Transactive Response DNA binding protein, est localisé sur le bras court du chromosome 1. Il code pour la protéine TDP-43, une protéine de liaison à l'ARN d'un poids moléculaire de 43kDa régulant de nombreux mécanismes comme l'épissage alternatif des ARN pré-messagers ou la stabilité et la traduction des ARN messagers. Il est à noter que des inclusions cytoplasmiques neuronales de TDP-43 clivée et phosphorylée sont la signature histopathologique de 95% des patients atteints de SLA et de plus de la moitié des patients atteints de DFT, et cela même en absence de mutation dans *TARDBP* (Neumann *et al.*, 2006).

Des mutations dominantes dans *TARDBP* sont responsables de formes familiales de SLA, de DFT et de SLA-DFT (Sreedharan *et al.*, 2008; Kabashi *et al.*, 2008; Van Deerlin *et al.*, 2008). La quarantaine de mutations identifiées à ce jour sont, pour la plupart, localisées dans la région C-terminale de TDP-43, une zone riche en glycine, dite « prion like », et dont la mutation conduit à une agrégation de cette protéine. Les mutations dans *TARDBP* correspondent à moins de 5% des formes familiales de SLA et moins de 1% des formes sporadiques, avec une répartition relativement équivalente parmi les différentes populations atteintes de SLA (Chiò *et al.*, 2010, 2011, 2012).

La création de modèles murins transgéniques a permis de montrer que la surexpression de TDP-43, que ce soit la protéine wild type ou mutée, était toxique et conduisait à une forte mort neuronale associée à des déficits locomoteurs et à une activation des astrocytes et de la

microglie. Il est à noter que la sévérité et la vitesse d'évolution augmentent avec le niveau d'expression de la protéine TDP-43 dans ces modèles murins (Wils *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Stallings *et al.*, 2010; Wegorzewska and Baloh, 2011). Plus récemment, la création de modèles murins knock in exprimant des niveaux physiologiques de TDP-43 mutée a permis de reproduire une dégénérescence neuronale progressive et moins marquée associée à une pathologie des motoneurones au développement asymétrique chez les animaux homozygotes, reproduisant ainsi partiellement certains symptômes liés à la SLA (Ebstein *et al.*, 2019). En parallèle, des modèles knock out ont aussi été générés afin d'évaluer les conséquences de la perte de fonction de la protéine TDP-43. Les souris homozygotes knock out pour TDP-43 meurent au stade embryonnaire péri-implantatoire, et plus spécifiquement entre les jours 3,5 et 8,5 du développement embryonnaire (Wu *et al.*, 2009; Sephton *et al.*, 2010; Kraemer *et al.*, 2010). A l'état hétérozygote, si Kraemer et collaborateurs ont constaté une diminution de la force chez les animaux les plus âgés comparés aux souris wild type, ils n'ont cependant pas observé de dégénérescence neuronale permettant d'expliquer cette diminution de force. De plus, deux autres études (Wu *et al.*, 2009; Sephton *et al.*, 2010), n'ont, elles, constaté aucune anomalie particulière chez leurs souris hétérozygotes. Enfin, un modèle murin permettant un knock out de TDP-43 à l'âge adulte par le biais d'un promoteur inductible au tamoxifène montre une perte massive de graisse corporelle due à une augmentation de l'oxydation des acides gras conduisant à la mort des animaux en une dizaine de jours (Chiang *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent donc que les mutations de TDP-43 conduiraient à un gain de fonction toxique de cette protéine, associé à une possible perte de fonction nucléaire (Fratta *et al.*, 2018).

### 3. *FUS*

Le gène *FUS* (« Fused In Sarcoma »), aussi nommé TLS (« Translocated In LipoSarcoma »), est localisé sur le bras court du chromosome 16 et code pour une protéine liant les acides nucléiques et impliquée dans le métabolisme des ARN messagers et dans la réparation des dommages dans l'ADN. Des mutations faux sens dominantes de *FUS* sont responsables d'environ 4% des cas familiaux et 1% des cas sporadiques de SLA et de SLA-DFT (Kwiatkowski *et al.*, 2009; Vance *et al.*, 2009). Ces mutations sont principalement localisées dans la partie C-terminale de *FUS*, conduisant à la perte de son domaine de localisation nucléaire, ce qui empêche la liaison de *FUS* au récepteur d'import nucléaire Transportin et conduit à une accumulation cytoplasmique de *FUS* (Dormann *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2014). Ainsi, les patients avec une mutation dans le gène *FUS* présentent des inclusions cytoplasmiques de protéine *FUS* dans les neurones atteints (Kwiatkowski *et al.*, 2009; Vance *et al.*, 2009). Ces patients, contrairement à la majorité des cas de SLA, ne présentent pas d'agrégats de protéine TDP-43 dans les zones du cerveau affectées par la maladie.

Des modèles murins « gene trap » avec une expression réduite de la protéine *FUS* montrent, selon leur fond génétique et leur degré de consanguinité, soit une mortalité moins de 24h après leur naissance, soit des souris plus petites à la naissance et avec une fertilité réduite, soit des souris sans phénotype majeur apparent mais avec une hyperactivité et une réduction de l'anxiété (Hicks *et al.*, 2000; Kuroda *et al.*, 2000; Kino *et al.*, 2015). Afin d'abolir totalement l'expression de *Fus*, des modèles murin knock out ont alors été générés. Les animaux homozygotes knock out pour *FUS* naissent plus petits que les wild type et les souris hétérozygotes et, de plus, meurent dans les trente minutes après la naissance d'une insuffisance respiratoire (Scekic-Zahirovic *et al.*, 2016). En parallèle, la création d'animaux

transgéniques pour la protéine humaine FUS wild type ou mutée montre que la surexpression de FUS est toxique avec des animaux présentant une neurodégénérescence rapide et agressive chez les individus homozygotes, avec un déficit locomoteur sévère nécessitant l'euthanasie des animaux dès l'âge de trois mois (Verbeeck *et al.*, 2012; Mitchell *et al.*, 2013; Vance *et al.*, 2013). Afin de mieux comprendre le rôle de FUS dans la SLA, de nouveaux modèles murins ont alors été générés (Scekic-Zahirovic *et al.*, 2016; Scekic-Zahirovic *et al.*, 2017). Ces souris présentent un knock in dans le dernier intron du gène *FUS* conduisant à une perte de l'expression du dernier exon, contenant le domaine de localisation nucléaire, ce qui engendre une protéine FUS tronquée qui se localise principalement dans le cytoplasme. Les animaux homozygotes présentent des symptômes proches de ceux observés chez les souris knock out pour *FUS*, avec une petite taille et une mort rapide des individus après la naissance. Au contraire, les animaux hétérozygotes développent des symptômes similaires à ceux observés chez des patients atteints de SLA aux stades précoces, avec une légère atteinte des motoneurones due à une mauvaise localisation de la protéine FUS dans ces cellules (Scekic-Zahirovic *et al.*, 2016; Scekic-Zahirovic *et al.*, 2017). En conclusion, ces modèles ont permis de conclure que ce n'est pas tant l'absence de la protéine FUS en elle-même mais son accumulation cytoplasmique qui engendre une toxicité et une dégénérescence des motoneurones (Kino *et al.*, 2015; Scekic-Zahirovic *et al.*, 2016; Scekic-Zahirovic *et al.*, 2017; López-Erauskin *et al.*, 2018).

#### 4. VCP

Le gène *VCP* est localisé sur le bras court du chromosome 9 et code pour la protéine « Valosin containing protein ». Des mutations de ce gène causent des DFT associées avec une

myopathie à corps d'inclusions ainsi que de rares cas (<1%) de SLA familiales et sporadiques (Johnson *et al.*, 2010). La protéine VCP est impliquée dans la dégradation de protéines par le protéasome ainsi que par autophagie où elle joue un rôle dans la formation et la maturation de l'autophagosome, ainsi que dans la survie cellulaire en médiant les processus d'apoptose et d'autophagie (Yeo and Yu, 2016).

## 5. *UBQLN2*

Le gène *UBQLN2* est situé sur le bras court du chromosome X et code pour la protéine ubiquiline. L'ubiquiline joue un rôle important dans les mécanismes de dégradation des protéines, notamment en faisant le lien entre les protéines ubiquitinylées et le protéasome et lors de la formation et maturation de l'autophagosome durant la macro-autophagie (Zhang *et al.*, 2014). L'*UBQLN2* est impliquée dans moins de 1% des formes familiales et sporadiques de SLA et de SLA-DFT (Deng *et al.*, 2011).

## 6. *SQSTM1*

Le gène *SQSTM1* (Sequestosome 1) est situé sur le bras long du chromosome 5 et encode la protéine p62, qui joue un rôle fondamental dans l'autophagie en faisant le lien entre les protéines ubiquitinylées à dégrader et la membrane de l'autophagosome en formation. Des mutations perte de fonction de p62 ont été retrouvées dans des rares cas de SLA et correspondent à moins de 0,5 à 1% des cas totaux de SLA familiale et sporadique (Fecto *et al.*, 2011). Il est aussi à noter que p62 est également impliquée dans l'inhibition de la voie d'activation de NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-B) dans les ostéoclastes (Duran *et al.*, 2008;

Moscat *et al.*, 2016). Des mutations de p62 peuvent ainsi conduire à la maladie de Padgett, caractérisée par une activation des ostéoclastes conduisant à des lésions osseuses focales.

## 7. *OPTN*

Le gène *OPTN* se situe sur le bras court du chromosome 10 et code pour la protéine optineurine. En 2010, des mutations récessives ont été identifiées dans des cas de SLA chez des familles japonaises (Maruyama *et al.*, 2010). Toutefois, les mutations dans *OPTN* sont rares chez les patients SLA d'origine caucasienne et correspondent à un peu moins de 1% des formes familiales et des formes sporadiques de SLA (Chiò *et al.*, 2012). La protéine optineurine est, comme la protéine p62, impliquée dans l'autophagie où elle joue le rôle d'adaptateur entre les protéines ubiquitinylées à dégrader et la protéine LC3B présente à l'autophagosome en formation (Ying and Yue, 2016). Il est à noter que les mutations de l'optineurine identifiées chez les patients SLA sont de type perte de fonctions, alors que des duplications du gène ou des mutations gain de fonction sont responsables de glaucomes « Primary Open Angle Glaucoma ».

## 8. *TBK1*

Le gène *TBK1* (TANK binding kinase 1) se situe sur le bras long du chromosome 12 et code pour la protéine du même nom. Des mutations perte de fonction et faux sens dans ce gène conduisent à des cas de SLA, DFT et SLA/DFT (Cirulli *et al.*, 2015; Freischmidt *et al.*, 2015; Gijssels *et al.*, 2016). Ces mutations représentent environ 5% des cas de SLA/DFT génétiques

(Cui *et al.*, 2018). La protéine TBK1 est impliquée dans divers mécanismes physiologiques, incluant la réponse immunitaire et l'autophagie. En effet, TBK1 phosphoryle des sérines et des thréonines situées dans les domaines LIR des récepteurs autophagiques p62 et OPTN, augmentant ainsi leur liaison aux protéines LC3 ancrées à la membrane de l'autophagosome (Kachaner, 2012; Maruyama and Kawakami, 2013).

Il est intéressant de noter que plusieurs des gènes impliqués dans la SLA et la DFT ont des fonctions au sein de voies biologiques communes, comme le métabolisme de l'ARN pour les gènes *TARDBP* et *FUS*, ou l'autophagie et la voie de dégradation des protéines pour les gènes *OPTN*, *SQSTM1*, *TBK1*, *UBQLN2* et *VCP*.

Enfin, je vais me concentrer dans la suite de ce manuscrit sur un gène en particulier, *C9ORF72*, dans lequel la présence d'une expansion de répétitions de nucléotides GGGGCC est responsable de la majorité des cas familiaux et sporadiques de SLA, de DFT et de SLA-DFT.

## E. Une expansion de répétitions GGGGCC est la cause majeure de SLA-DFT

### 1. Gène *C9ORF72*

Le gène *C9ORF72* (« Chromosome 9 open reading frame 72 ») contient 11 exons avec deux promoteurs alternatifs situés dans les exons non codants 1a et 1b. Deux isoformes de protéine sont générées à partir de l'épissage alternatif de l'intron 5. Il existe ainsi une forme courte de *C9ORF72*, composée de 222 acides aminés et encodée par les exons 2 à 5 suivis d'une Lysine et d'un codon stop provenant de la rétention de l'intron 5. L'isoforme longue de

C9ORF72 de poids moléculaire d'environ 54kDa est composée de 481 acides aminés, codés par les exons 2 à 11. Ces deux isoformes présentent des demi-vies, des interactions protéiques et des localisations différentes. La forme longue de C9ORF72 forme un complexe avec les protéines SMCR8 et WDR41 et présente une localisation cytoplasmique. Au contraire, la forme courte de C9ORF72 n'interagit pas avec SMCR8 et WDR41, est peu stable et semble localisée autour du noyau (Xiao *et al.*, 2015, 2016; Sellier *et al.*, 2016; Frick *et al.*, 2018) (figure 5).

## 2. Mutation dans C9ORF72

Une avancée majeure dans l'étude de la SLA et de la DFT fut la découverte en 2011 d'une mutation dans le gène *C9ORF72* comme étant la cause génétique principale de ces deux maladies en Europe et en Amérique du Nord (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011; Rohrer *et al.*, 2015). En effet, dans les populations d'origine caucasienne, cette mutation est présente dans 80 à 90% des cas de SLA-DFT familiaux, 20 à 50% des cas de SLA familiaux, 10 à 30% des cas de DFT familiaux et, en proportion moindre, pour les cas sporadiques (Majounie *et al.*, 2012).

Cette mutation est une expansion de plusieurs centaines voire milliers de répétitions d'hexanucléotides GGGGCC dans le premier intron du gène *C9ORF72*. Chez les individus sains, ce nombre de répétitions est généralement compris entre 2 et 10. La plus petite expansion conférant une pathologie n'est pas encore connue, mais il est estimé que le seuil pathologique pourrait commencer vers 30 à 60 répétitions (Xi *et al.*, 2015; Gijssels *et al.*, 2016). La toxicité des expansions de répétitions GGGGCC augmente avec l'âge des patients. Ainsi, la pénétrance chez les patients porteurs de la mutation est de 0% à l'âge de 35 ans, de 50% à 58 ans et une

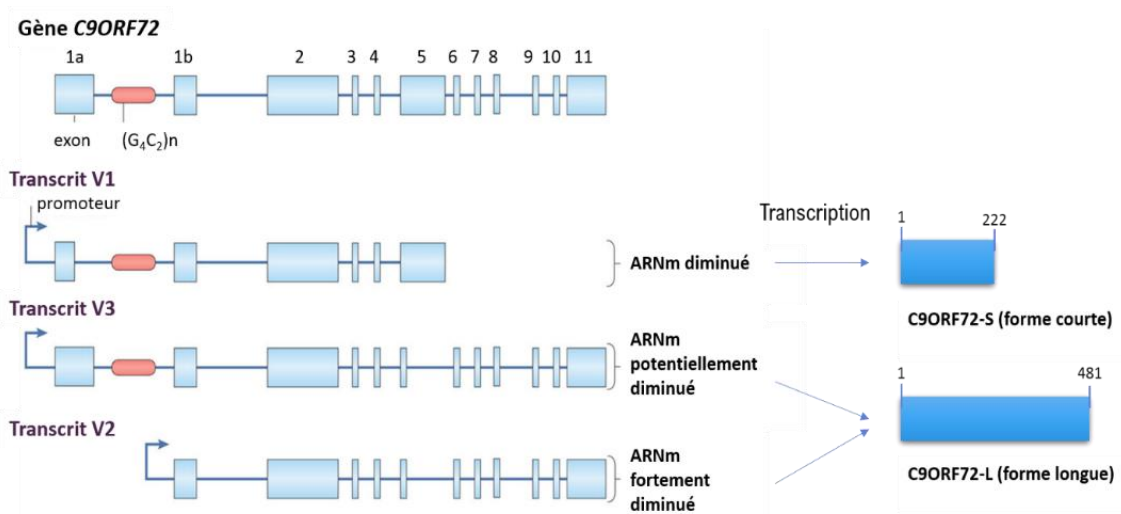


Figure 5 : Schéma du gène *C9ORF72*, des différents transcrits et des deux isoformes protéiques (adapté de Haeusler *et al.*, 2016).

Le gène *C9ORF72* est composé de 11 exons. Son épissage conduit à trois transcrits différents, V1, traduit en forme courte de la protéine, et V2 et V3 qui sont traduits en la forme longue de la protéine C9ORF72.

pénétrance quasi complète à plus de 90% à 80 ans (Majounie *et al.*, 2012; Benussi *et al.*, 2013). Toutefois, il existe des personnes porteuses d'expansions GGGGCC qui ne développent pas de SLA, même à un âge avancé (Galimberti *et al.*, 2014).

### 3. Mécanismes conduisant à la pathologie

Les mécanismes expliquant comment une expansion de répétitions GGGGCC dans le gène *C9ORF72* provoque une dégénérescence des neurones ne sont pas encore complètement identifiés. Trois modèles principaux non exclusifs ont cependant été proposés (figure 6).

- Plusieurs études suggèrent que les expansions de répétitions GGGGCC sont transcrites et sont alors capables de lier et séquestrer des protéines de liaison à l'ARN (« RNA Binding Proteins ») spécifiques, réduisant ainsi leur capacité à lier leurs ARN cibles naturels (Almeida *et al.*, 2013). Il a été observé des agrégats nucléaires d'ARN transcrits des répétitions GGGGCC dans des coupes de cerveau et de moelle épinière, ainsi que dans des neurones issus d'iPS (« induced Pluripotent Stem cells ») provenant de patients atteints de SLA ou de SLA-DFT. Plusieurs protéines ont été identifiées comme pouvant se lier aux répétitions GGGGCC, dont le plus grand groupe est celui des heterogenous nuclear RiboNucleoProteins (hnRNPs) (par exemple hnRNP-A1, hnRNP-A3 et hnRNP-PH), ADARB2, Pur  $\alpha$ , ou la nucléoline (Xu *et al.*, 2013; Mori *et al.*, 2013; Haeusler *et al.*, 2014; Conlon *et al.*, 2016). Toutefois, le rôle éventuel de la titration de ces protéines par les ARN GGGGCC dans la pathologie reste à préciser.

- Le second mécanisme potentiel pour la toxicité des expansions GGGGCC est une forme de traduction non canonique nommée « Repeat-Associated Non-ATG (RAN) translation », un mécanisme de traduction encore mal compris qui permet la synthèse protéique en absence

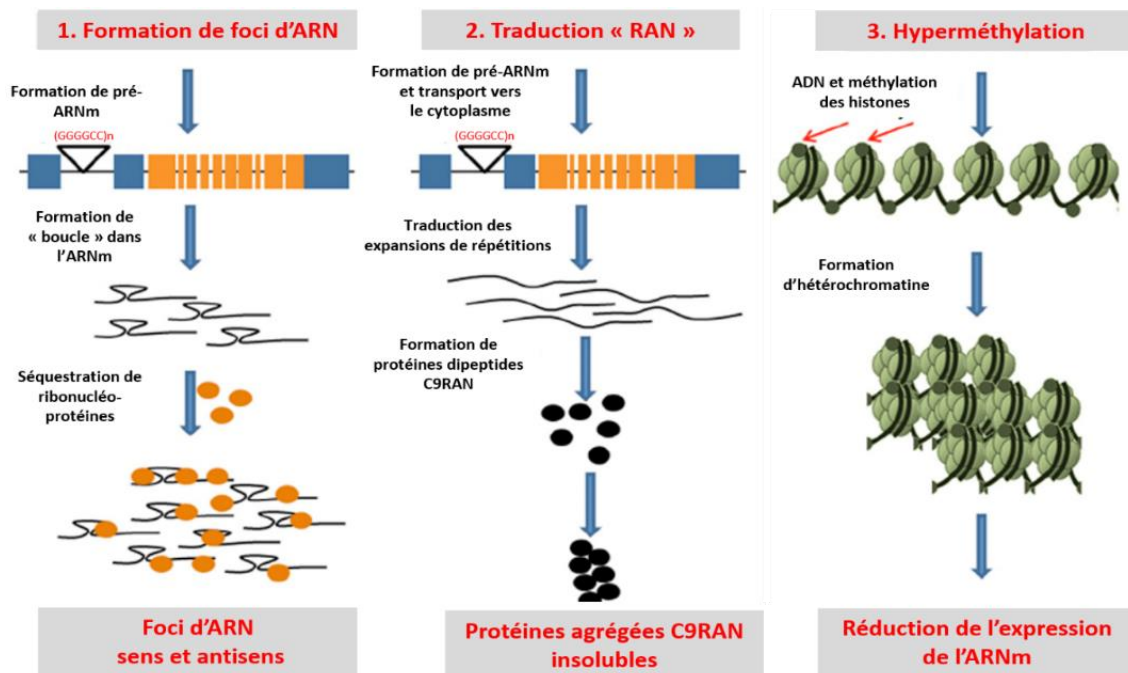


Figure 6 : Modèles de toxicité des répétitions GGGGCC au sein du gène *C9ORF72* (adapté de Vats *et al.*, 2014).

(1) Les répétitions GGGGCC transcrites peuvent former des agrégats d'ARN et séquestrer des protéines spécifiques. (2) Une traduction non canonique des ARN contenant les répétitions GGGGCC peut produire à des polypeptides toxiques (polyGP, poly GA, poly GR). (3) L'expansion peut mener à une inhibition de la transcription de *C9ORF72* (haplo-insuffisance).

de codon d'initiation ATG. Plusieurs études ont ainsi montré une traduction des répétitions GGGGCC en protéines « DPR » composées de répétitions de di-acides aminés poly(Gly-Pro), poly(Gly-Ala) et poly(Gly-Arg) (Mori *et al.*, 2013; Gendron *et al.*, 2013; Zu *et al.*, 2013). De même, il est proposé qu'une transcription anti-sens du gène *C9ORF72* produise des ARN contenant des répétitions GGCCCC eux aussi traduits en protéines composées de répétitions de di-acides aminés poly(Pro-Gly) comme lors de la transcription sens, poly(Pro-Ala) et poly(Pro-Arg). Le mécanisme de « RAN translation » peut ainsi produire cinq protéines différentes. Des analyses histopathologiques montrent que parmi ces diverses protéines, les poly(Gly-Pro) et poly(Gly-Ala) sont les plus abondantes et sont trouvées sous forme d'inclusions cytoplasmiques couplées à la protéine p62 dans des lames de cerveau de patients atteints de SLA, de DFT ou de SLA-DFT. Toutefois il est étonnant de constater que ces protéines DPR sont présentes dans des zones du cerveau peu ou pas touchées par la neurodégénérescence, contrairement aux agrégats de TDP-43 qui sont eux associés aux zones altérées (Mackenzie *et al.*, 2015). La cytotoxicité de ces polypeptides a été démontrée récemment en culture cellulaire et chez la drosophile (Wen *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2015) et plus récemment dans des neurones obtenus à partir d'iPS de patients ainsi que dans des modèles murins exprimant les répétitions (Peters *et al.*, 2015; O'Rourke *et al.*, 2016). Ces études montrent que ces protéines DPR sont toxiques en altérant le transport nucléocytoplasmique et/ou en altérant les mécanismes de dégradation protéique, notamment le protéasome (Zhang *et al.*, 2014, 2016; Kwon *et al.*, 2014; Mizielinska *et al.*, 2014; May *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2015; Jovičić *et al.*, 2015; Freibaum *et al.*, 2015; Boeynaems *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2018).

- Enfin, le dernier mécanisme proposé est une inhibition de la transcription du gène *C9ORF72*, engendrant une perte de fonction partielle de sa protéine. Une diminution de l'expression de *C9ORF72* chez ces patients pourrait être provoquée par des modifications épigénétiques de l'ADN, notamment une hyperméthylation des CpG en amont des expansions de répétitions GGGGCC (Xi *et al.*, 2013; Belzil *et al.*, 2013). En accord avec cette hypothèse, plusieurs études montrent une diminution de l'expression de l'ARN messager de *C9ORF72* dans des échantillons de cerveaux de patients porteurs d'expansions GGGGCC (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011; van Blitterswijk *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013; Gendron *et al.*, 2013). Ces résultats ont été confirmés au niveau protéique par différentes études montrant une diminution de l'expression de *C9ORF72* dans le cerveau de patients porteurs de la mutation G4C2 (Waite *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2015; Frick *et al.*, 2018). Les conséquences pathologiques d'une diminution d'expression de *C9ORF72* sont encore peu claires puisque la diminution d'expression de *C9orf72* chez le poisson zèbre ou dans des neurones différenciés à partir de cellules iPS conduit à une neurodégénérescence (Ciura *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2018), alors que le knockout du gène *C9orf72* chez la souris ne provoque pas de mort neuronale (Atanasio *et al.*, 2016; Burberry *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2016; Koppers *et al.*, 2015; Lagier-Tourenne *et al.*, 2013; O'Rourke *et al.*, 2016; Sudria-Lopez *et al.*, 2016).

En conclusion, les mécanismes proposés pour la toxicité des expansions GGGGCC sont complexes et il est possible qu'aucun de ces mécanismes ne puisse à lui seul expliquer la neurodégénérescence. En effet, la séquestration de protéines par les ARN GGGGCC n'a pas de conséquences pathologiques claires. Concernant les protéines DPR, la surexpression de celles-ci dans des modèles cellulaires ou animaux est toxique, mais ces protéines ne sont pas observées dans les zones affectées par la neurodégénérescence chez les patients. Enfin, les

conséquences pathologiques de la diminution d'expression de la protéine C9ORF72 sont mal comprises. Il est donc fortement possible que ces mécanismes agissent ensemble, et que la toxicité des répétitions provienne alors de leur synergie. Il est aussi possible que la toxicité des répétitions GGGGCC nécessite d'autres mutations ou variations, bénignes chez des sujets sains, mais induisant un stress cellulaire pouvant déclencher la pathologie chez les patients porteurs des expansions de répétitions GGGGCC (Sellier *et al.*, 2016).

## F. Étude de la fonction de C9ORF72

Bien que la perte d'expression de C9ORF72 chez la souris ne conduise pas à un phénotype de SLA, il est important de comprendre la fonction de cette protéine, notamment vis-à-vis d'une synergie de toxicité avec d'autres mécanismes (protéines DPR ou un autre stress, par exemple). Or seulement très peu d'informations étaient disponibles concernant la protéine C9ORF72 lors de mon arrivée dans l'équipe du Dr. Charlet. Les travaux effectués par le Dr. Sellier et moi-même durant cette thèse nous ont permis d'en apprendre un peu plus sur C9ORF72 et son implication dans différents mécanismes pouvant mener à au développement d'une pathologie comme la SLA-DFT.

Des analyses bioinformatiques d'alignements de séquences et de prédictions structurales montrent que C9ORF72 contient des domaines DENN (« *Differentially Expressed in Normal and Neoplastic cells* »), qui sont caractéristiques des facteurs d'échanges GDP/GTP (GEF) pour les protéines Rab GTPases (Zhang *et al.*, 2012; Levine *et al.*, 2013). Ces domaines de 400 à 500 acides aminés forment deux lobes pouvant se lier l'un à l'autre ainsi qu'aux protéines Rab GTPases. De plus, des études d'interactions protéine-protéine ont permis d'établir que

C9ORF72 existait en complexe avec deux autres protéines, WDR41 et SMCR8 (Sullivan *et al.*, 2016 ; Sellier *et al.*, 2016). WDR41 (« WD repeat containing protein 41 ») est une protéine de 52kDa composée de six domaines WD40 mais dont la fonction est inconnue. SMCR8 (« Smith Magenis syndrome Chromosome Region candidate 8 ») est une protéine de 105 kDa qui contient, tout comme C9ORF72, un domaine DENN, et qui a été trouvée en 2011 comme interagissant avec la kinase ULK1 (« Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1 »), un régulateur majeur de l'autophagie (Behrends *et al.*, 2011). Le complexe C9ORF72/SMCR8/WDR41 pourrait donc jouer un rôle de facteur d'échange GDP/GTP pour des protéines Rab GTPase impliquées dans l'autophagie. Je vais donc décrire ces protéines et ce mécanisme de dégradation dans les chapitres suivants.

## G. Les Rab-GTPases

### 1. Rôle biologique et propriétés

Les protéines Rab (« Ras-related proteins in brain ») font partie de la superfamille des GTPases Ras. Actuellement, environ soixante-dix protéines Rab ont été identifiées chez l'Homme (Deacon and Gelfand, 2001; Farg *et al.*, 2014). Ces protéines Rab sont impliquées dans de nombreuses étapes du trafic membranaire, comme la formation de vésicules, leur migration le long des réseaux d'actine ou de tubuline et leur fusion à une membrane ou vésicule cible (Stenmark and Olkkonen, 2001; Schwartz *et al.*, 2007). En effet, dans la cellule, les protéines Rab sont localisées sur la face cytosolique des membranes internes et ont un rôle majeur dans la spécificité du transport vésiculaire en régulant l'amarrage des vésicules à leur membrane cible, notamment en facilitant l'appariement des protéines v-SNARE et t-

SNARE entre elles. Ces deux protéines sont complémentaires, la première étant associée à la membrane vésiculaire (vesicule-SNARE) et la seconde à la membrane du compartiment cible de la vésicule (target-SNARE). Enfin, l'assemblage des protéines v- et t-SNARE génère l'énergie nécessaire à la fusion des deux membranes (Novick and Brennwald, 1993).

Les protéines Rab possèdent une activité GTPase faible, et existent dans deux états conformationnels : un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. Les protéines d'échanges GDP/GTP (GEF) permettent de catalyser la conversion des Rab GTPases de leur forme inactive à leur forme active, activant ainsi les fonctions des Rab. Au contraire, l'inactivation des Rab se fait par hydrolyse du GTP, qui est accélérée par les protéines GAP (« GTPase Activating Protein ») (Novick and Brennwald, 1993).

## 2. *C9ORF72 et les Rab-GTPases*

Les protéines C9ORF72 et SMCR8 présentent des domaines DENN caractéristiques des facteurs d'échange GDP/GTP (GEF) pour Rab GTPases. Comme nous le verrons plus en détail dans la première partie des résultats dans ce manuscrit, des études menées par notre équipe ont permis de montrer une interaction entre le complexe C9ORF72/SMCR8 et plusieurs Rab GTPases, notamment une interaction forte avec Rab8a et Rab39b, et plus faiblement avec Rab6, Rab12, Rab25, Rab33a et Rab38. En absence de SMCR8, C9ORF72 seule n'interagit que très faiblement avec Rab8a et Rab39b. Au contraire, la protéine SMCR8 seule interagit avec plusieurs Rab GTPases, comme Rab24, Rab32 ou Rab29, ce qui suggère que la liaison avec C9ORF72 modifie la spécificité d'interaction de la protéine SMCR8 (Sellier *et al.*, 2016).

Rab8a et Rab39b sont connues pour jouer un rôle dans la formation et le transport des vésicules autophagiques, suggérant que le complexe C9ORF72/SMCR8/WDR41 pourrait lui aussi jouer un rôle dans l'autophagie. Il est intéressant de noter que ces Rab ont aussi un lien avec des troubles d'origine mentale, Rab8 étant impliquée dans un modèle Drosophile pour la Démence Fronto-Temporale et des mutations perte de fonction dans le gène Rab39b conduisent à une maladie neurodégénérative caractérisée par un retard mental et un parkinsonisme juvénile (Giannandrea *et al.*, 2010; West *et al.*, 2015; Vandal *et al.*, 2018).

## II. L'autophagie

### A. Mécanismes généraux

Le terme autophagie, du grec « se manger soi-même », fut défini en 1963 par le Prof. Christian de Duve, médecin et biochimiste belge découvreur des lysosomes et peroxysomes, pour décrire la dégradation de mitochondries et d'autres organelles intracellulaires induite par le glucagon dans des lysosomes de foie de rat (de DUVE, 1983). Ce travail a permis de mettre en évidence l'équilibre très strict entre la synthèse de protéines et la biogénèse d'organelles, et leur dégradation et recyclage, qui est essentiel pour assurer la croissance, le développement et l'homéostasie corrects d'un organisme. Il existe ainsi deux mécanismes principaux de catabolisme : la dégradation par le protéasome et la dégradation par autophagie, qui peut éliminer des composants cellulaires trop massifs pour le protéasome, comme des pathogènes ayant pénétré dans la cellule, des agrégats de protéines ou des organelles dysfonctionnels (Glick *et al.*, 2010). Ce mécanisme est conservé de la levure à l'Homme et est essentiel pour éliminer des structures toxiques (par exemple bactéries,

organelles altérés, agrégats de protéines), mais aussi pour fournir de l'énergie à la cellule en recyclant des composants cellulaires. L'autophagie est donc essentielle pour la différenciation cellulaire, peut agir en tant que suppresseur de tumeurs et joue un rôle majeur dans l'immunité en dégradant les agents pathogènes capables de pénétrer dans les cellules. Il existe 3 formes majeures d'autophagie qui sont décrites ci-dessous (figure 7).

### *1. L'autophagie médiée par les protéines chaperones*

L'autophagie médiée par les protéines chaperones (CMA) est une forme d'autophagie sélective, qui permet le transport du matériel à dégrader jusqu'au lysosome par le biais de la protéine chaperone hsc70 (« heat shock cognate protein 70 »). Celle-ci reconnaît et interagit avec une séquence consensus KFERQ située sur les protéines cibles à dégrader, ce qui conduit au transport de ces protéines à la membrane du lysosome où Hsc70 se fixe à la partie extralysosomale de la protéine LAMP2 (« Lysosome Associated Membrane Protein type 2A »). La protéine à dégrader est dépliée puis transférée dans le lysosome à travers la membrane via un complexe formé par des protéines LAMP2 multimérisées et associées à d'autres protéines membranaires (Cuervo and Wong, 2013; Hayat, 2017; Tekirdag and Cuervo, 2018).

Le motif consensus KFERQ est présent dans une trentaine de protéines humaines (entre autres la ribonucléase A, la kinase TTK ou la Purine phosphorylase), mais des séquences dégénérées sont présentes dans 20 à 30 % des protéines exprimées chez les mammifères, ce qui rend ces protéines candidates à la dégradation par CMA. Contrairement à la macro-autophagie ou la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperones ne concerne que des protéines, et non des organelles ou des pathogènes qui sont trop

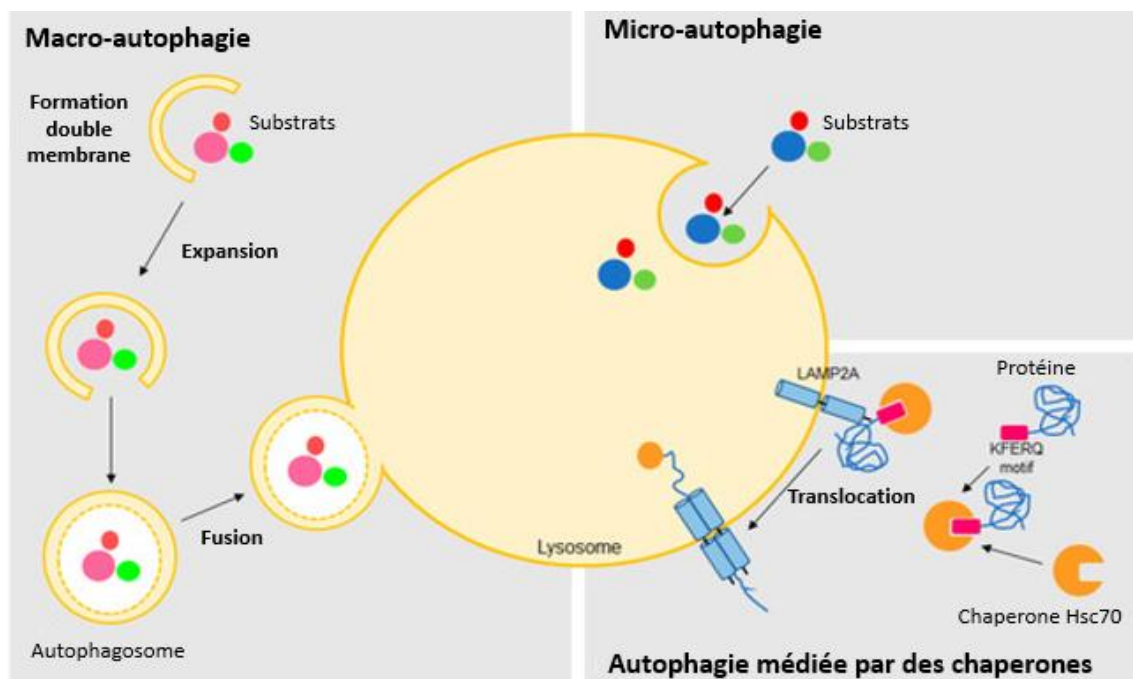


Figure 7 : Différentes formes d'autophagie (d'après Gomes *et al.* 2017).

1) Micro-autophagie : le substrat est «englouti» par réarrangement de la membrane lysosomale. 2) Autophagie médiée par des chaperones : les protéines porteuses du motif KFERQ sont escortées par des chaperones comme Hsc70 et transloquées à travers la membrane lysosomale. 3) Macro-autophagie : formation d'une double membrane (autophagosome) autour du substrat, migration et fusion de l'autophagosome au lysosome.

volumineux pour être transférés par les protéines LAMP2 à travers la membrane du lysosome. De plus, il faut que les protéines à dégrader soient dépliées, sans quoi elles ne peuvent pas entrer dans le lysosome (Salvador, 2000; Tekirdag and Cuervo, 2018).

## 2. *La micro-autophagie*

Le terme « micro-autophagie » s'applique aux protéines ou organelles qui sont directement capturées et « englouties » sur place par le lysosome via une invagination ou protrusion de sa membrane. La micro-autophagie est mise en place lors de conditions de privation en énergie des cellules. Elle est régulée par les complexes EGO et mTOR, probablement activés par le manque de glutamine et d'acide glutamique (Butow and Avadhani, 2004; Dubouloz *et al.*, 2005). La micro-autophagie pourrait aussi permettre de compenser la formation de membranes requise lors de la macro-autophagie et permettrait ainsi de maintenir la taille de différentes organelles et la composition de leur membranes (Hayat, 2017).

## 3. *La macro-autophagie*

La macro-autophagie est le mécanisme autophagique principal des cellules et, de ce fait, est le plus souvent abrégé en « autophagie ». Ce mécanisme est divisé en plusieurs étapes. L'initiation débute par la formation d'une double membrane, s'ensuit l'étape d'élongation, où la membrane commence à s'allonger autour d'une partie du contenu cytoplasmique et finit par former une vésicule, appelée l'autophagosome, composée d'une double membrane séquestrant du matériel à dégrader. Cet autophagosome subit une étape de maturation et est

transporté au lysosome, avec lequel il fusionne, formant une nouvelle structure nommée l'autolysosome. Enfin, lors de la dégradation, le contenu de l'autolysosome est digéré par des hydrolases acides provenant du lysosome. Ces différentes étapes d'initiation, élongation, transport et fusion au lysosome sont régulées par diverses Rab GTPases, elles-mêmes régulées par des facteurs d'échange GDP/GTP spécifiques, dont le complexe C9ORF72/SMCR8 (*cf.* Résultats Partie 1).

Il existe deux mécanismes permettant d'activer la macro-autophagie : la carence en nutriments et en énergie, conduisant à une autophagie non spécifique et la poly-ubiquitinylation en lysine 63 des protéines à dégrader, qui conduit à une macro-autophagie spécifique.

- L'autophagie non spécifique est induite par une carence en nutriments (par exemple en glucose ou acides aminés), qui active la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) qui phosphoryle alors les kinases mTOR et ULK1 (Kim *et al.*, 2011; Egan *et al.*, 2015). Le complexe mTOR normalement phosphoryle et inhibe la kinase ULK1, mais la phosphorylation de mTOR par AMPK abolit cette inhibition et active donc le complexe ULK1/ATG13/ATG101/FIP200. De plus, AMPK activée est aussi capable de phosphoryler et activer directement ce complexe ULK1, qui phosphoryle alors différentes protéines initiant l'autophagie, comme la Becline-1 (BECN1) (Nazio *et al.*, 2013; Russell *et al.*, 2013; Egan *et al.*, 2015). BECN1 appartient à un complexe comprenant les protéines ATG14L, VPS34 (aussi nommé PIK3C3) et VPS15 (PIK3R4). Ce complexe phosphoryle les phosphoinositides PtdIns en Phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns3P) au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique pour former la structure pré-autophagosomale. La liaison des protéines DFCP1 et WIPI2 aux PtdIns3P permet la formation de la double membrane et l'élongation de l'autophagosome. En effet, WIPI2 recrute

la protéine ATG16L, faisant partie du complexe ATG5/ATG12/ATG16L, conduisant à la conjugaison des protéines de la famille LC3 (MAP1LC3A, MAP1LC3B, MAP1LC3C, GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2) à une phosphatidyléthanolamine, conduisant aux formes lipidées LC3-II qui sont ancrées à la membrane de l'autophagosome (Dooley *et al.*, 2014). Une fois refermé, l'autophagosome est transporté par les microtubules vers les lysosomes. L'autophagosome fusionne alors avec un lysosome, formant l'autolysosome, où les constituants sont dégradés par des protéases acides lysosomales. Les acides aminés et autres produits obtenus après dégradation peuvent ensuite être réutilisés par la cellule (figure 8).

- La macro-autophagie spécifique est induite par la poly-ubiquitinylation en lysine 63 de protéines faisant partie, entre autres, d'organelles dysfonctionnelles, d'agents pathogènes intracellulaires, ou d'agrégats de protéines à dégrader (Xie and Klionsky, 2007; Kirkin *et al.*, 2009). La sélectivité de cette dégradation repose sur des protéines adaptatrices qui permettent de faire le lien entre les chaînes poly-ubiquitines fixées en lysine 63 aux protéines à dégrader et l'autophagosome via les protéines LC3-II. Ces protéines adaptatrices, aussi appelées récepteurs autophagiques sont multiples, et reconnaissent chacune spécifiquement un substrat à dégrader et/ou sont exprimées dans différents tissus. Ainsi, les protéines p62 et TAXBP1 sont principalement impliquées dans la dégradation des agrégats protéiques (agrégophagie), l'optineurine dans la dégradation des mitochondries altérées (mitophagie) et NDP52 jouerait plutôt un rôle dans la dégradation des bactéries intracellulaires (xénophagie) (Johnson *et al.*, 2012). De plus, la macro-autophagie sélective est activée par l'autophosphorylation de la protéine kinase TBK1 (« TANK-Binding Kinase 1 ») recrutée au site de formation de l'autophagosome par l'optineurine et, dans une moindre mesure, par p62 et NDP52 (Kachaner, 2012; Maruyama and Kawakami, 2013). TBK1 activée phosphoryle alors

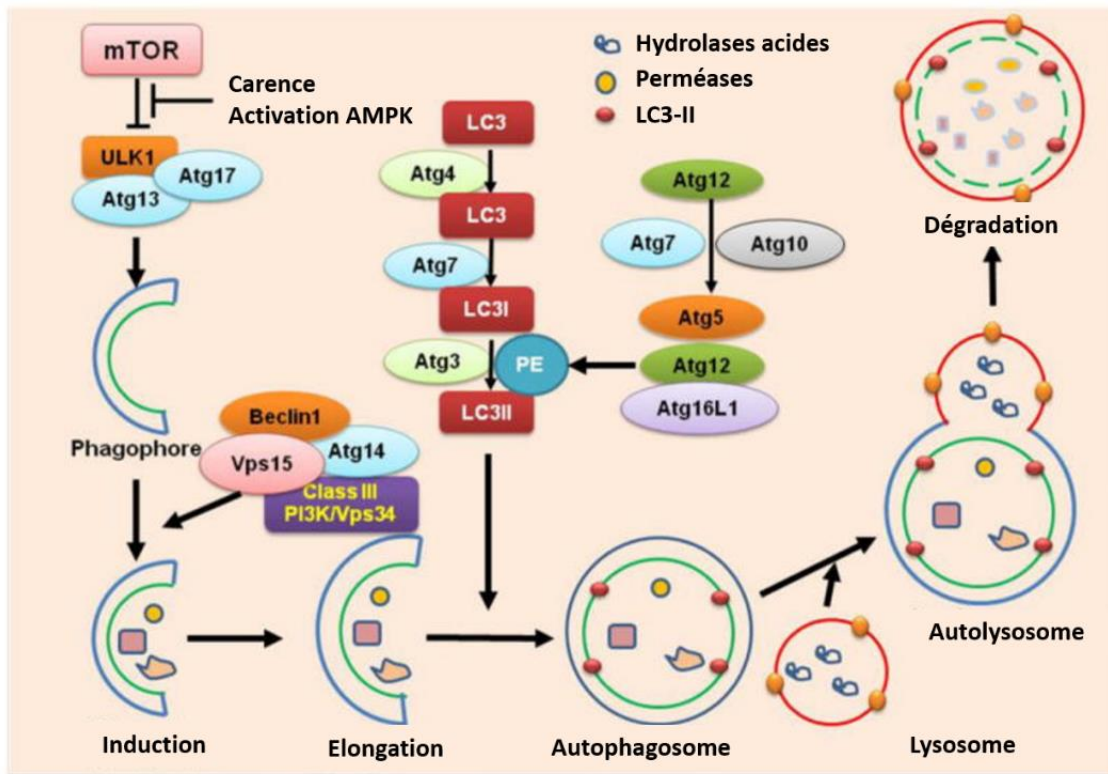


Figure 8 : Mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de l'autophagie (d'après Mei *et al.* 2015)

Un état de carence ou l'activation de l'AMPK inhibe mTOR, engendrant l'activation du complexe ULK1, qui stimule la formation du phagophore et active le complexe Beclin1. Le complexe Beclin1 engendre l'élongation de la double membrane autour du substrat à dégrader en recrutant la protéine LC3B conjuguée à une phosphatidyléthanolamine par le complexe ATG5-ATG12-ATG16L. L'autophagosome fusionne avec le lysosome pour permettre la dégradation du substrat par des hydrolases acides lysosomales.

de nombreuses protéines comme Rab7 mais aussi l'optineurine et p62, ce qui renforce leur interaction avec les substrats ubiquitinylés à dégrader et les protéines LC3-II. TBK1 joue aussi un rôle lors de la maturation de l'autophagosome en autolysosome permettant la dégradation des récepteurs autophagiques et des substrats poly-ubiquitinylés (Pilli *et al.*, 2012).

## B. Implication de l'autophagie dans la SLA-DFT

Le knock out des gènes ATG5 ou ATG7 régulant l'autophagie démontre que ce mécanisme est primordial pour la survie des neurones chez la souris (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2007). Chez l'Homme, une dysfonction de l'autophagie est identifiée dans de nombreuses maladies neurodégénératives, y compris la SLA et la DFT. Ainsi, la protéine TDP-43, dont les inclusions cytoplasmiques sont caractéristiques des zones atteintes chez la majorité des patients atteints de SLA et plus de la moitié des patients atteints de DFT, est une protéine connue pour s'agréger facilement et être alors éliminée par autophagie (Ju *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). De plus, des agrégats cytoplasmiques des protéines p62 et LC3-II, retrouvés à la membrane des autophagosomes, ont été identifiés dans les motoneurones de patients atteints de SLA sporadique (Sasaki, 2011). Cette accumulation d'agrégats protéiques laisse penser que les patients atteints de SLA et/ou de DFT présentent une dysfonction des mécanismes de dégradation des protéines, et notamment de l'autophagie. Enfin, plusieurs gènes impliqués dans les mécanismes de dégradation protéique sont aussi impliqués dans le développement d'une SLA pure ou de SLA-DFT lorsqu'ils sont mutés. Cela est le cas pour les gènes UBQLN2 et VCP, codant pour les protéines ubiquilin-2 et VCP, qui jouent un rôle dans la reconnaissance des protéines ubiquitinyllées (Johnson *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2011). De

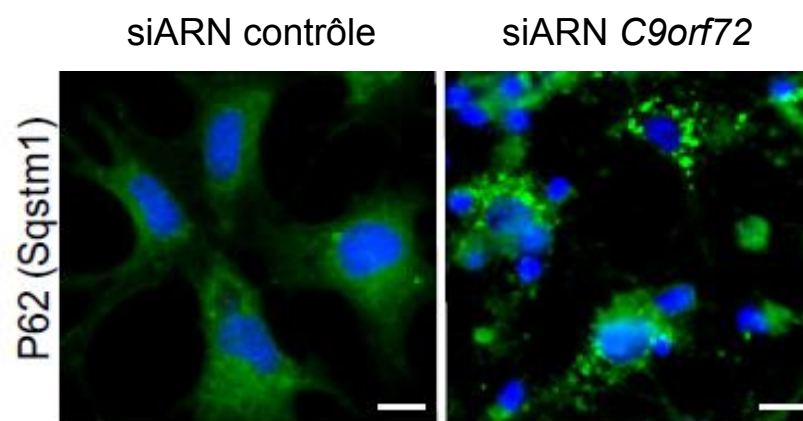


Figure 9 : Implication de la protéine C9ORF72 dans l'autophagie (d'après Sellier *et al.*, 2016)

Immunofluorescence dirigée contre la protéine p62 en cellules GT1.7 transfectées avec du siARN contrôle ou siARN dirigé contre *CORF72*.

même, des mutations dans les gènes codant pour les récepteurs autophagiques p62 et optineurine ou TBK1, la kinase régulant ces récepteurs autophagiques, sont impliqués dans des cas de SLA et de SLA-DFT (Le Ber *et al.*, 2013; Cirulli *et al.*, 2015; Freischmidt *et al.*, 2015; Kovacs *et al.*, 2016). Enfin, comme nous le verrons dans la première partie des résultats concernant mes travaux de thèse, l'expansion de répétitions GGGGCC dans le gène *C9ORF72* qui est la cause principale de SLA ou de SLA-DFT conduit à une diminution d'expression de la protéine C9ORF72 qui régule l'autophagie. En effet, une déplétion de *C9ORF72* par siARN dans des cultures primaires de neurones conduit à une inhibition de la lipidation de LC3B-I en LC3B-II intégré à la membrane de l'autophagosome ainsi qu'à une accumulation d'agrégats de protéine p62 (Sellier *et al.*, 2016) (figure 9). Ces résultats suggèrent un rôle de C9ORF72 et de l'autophagie dans le développement pathologique de la SLA et de la DFT.

En parallèle de l'étude de la fonction de C9ORF72, une grande partie de mes travaux de thèse s'est concentrée sur des souris knock out pour le gène *C9orf72*. Ces souris présentant un phénotype inflammatoire sévère, la troisième partie de cette introduction bibliographique sera consacrée aux mécanismes et cellules acteurs des réponses immunitaires.

### III. Les acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative

Le système immunitaire a pour rôles majeurs de protéger l'organisme contre des infections dues à des pathogènes ou contre la transformation tumorale. L'immunité se compose de deux systèmes de défense chez les vertébrés, une réponse immunitaire innée et une réponse immunitaire adaptative plus spécifique et dotée de mémoire. Les vertébrés

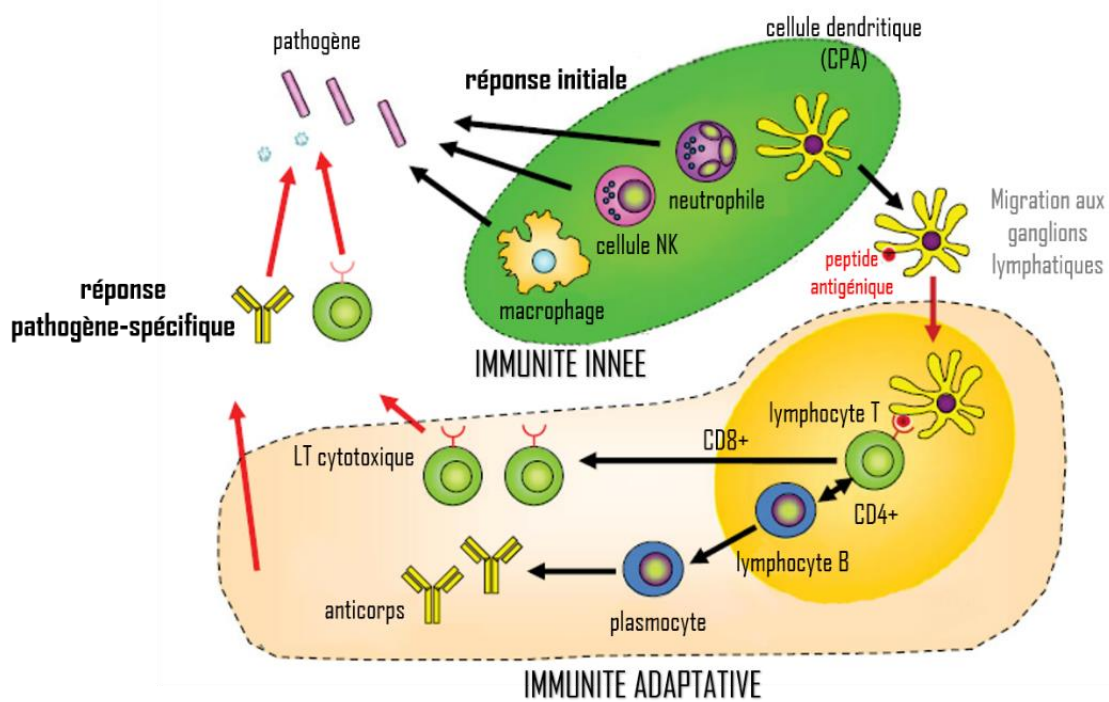
disposent aussi d'une première ligne de défense avant la mise en place des réponses immunitaires innée et adaptative, nommée anté-immunité.

- L'anté-immunité est composée d'une part des barrières physiques de l'organisme, parmi lesquelles on retrouve la peau, composée de couches de cellules épithéliales reliées entre elles par des jonctions serrées ; les sécrétions qui recouvrent les muqueuses, épithéliums du système respiratoire ou gastrointestinal ; et les cellules ciliées qui permettent le mouvement de ces sécrétions ayant été en contact avec diverses particules inhalées ou ingérées (Chaplin, 2010). Il existe aussi des barrières chimiques, qui possèdent des propriétés microbicides ou permettent d'empêcher la croissance microbienne. On retrouve dans cette catégorie différentes enzymes, comme le lysozyme sécrété dans les larmes et la salive, ou encore le pH acide de certains organes comme la peau (pH moyen de 4,7 pour l'Homme) ou l'estomac (pH moyen de 1,5) (Janeway *et al.*, 2001; Lambers *et al.*, 2006; Beasley *et al.*, 2015). Enfin, une flore bactérienne non pathogène est souvent associée aux surfaces épithéliales comme la peau ou le système digestif. Ces bactéries sont en compétition avec les autres microorganismes pour les nutriments présents dans l'organisme et certaines sont aussi capables de produire des substances antimicrobiennes permettant d'empêcher la colonisation par des pathogènes (par exemple les colicines produites par *E. coli* dans la flore intestinale humaine) (Janeway *et al.*, 2001).

- Le système immunitaire inné est conservé depuis les organismes multicellulaires les plus simples, soulignant ainsi son importance dans les mécanismes de défense et de survie. Il se caractérise par une réponse rapide de l'organisme face aux pathogènes, mais dont la spécificité est restreinte à des grandes classes de signaux appelés MAMPs (Microbes-Associated Molecular Pattern) ou DAMPs (Danger-Associated Molecular Pattern). Ces signaux

sont reconnus par des récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition Receptor). La seconde ligne de défense est composée des phagocytes tels que les macrophages et des mastocytes. Leur activation permet d'induire l'inflammation, le recrutement de nouvelles cellules telles que les neutrophiles qui participeront alors à la phagocytose. L'activation de cellules spécialisées telles que les cellules Natural Killer (NK) et les sécrétions de cytokines antivirales telles que les interférons (IFN) de type I, peuvent aussi être sollicitées lors de certaines inflammations. Les cellules dendritiques (DC) présentes dans les tissus, peuvent capturer des antigènes, migrer vers les organes lymphoïdes secondaires en condition inflammatoire et ainsi initier la réponse immunitaire adaptative par la présentation antigénique (Cota and Midwinter, 2012; Medina, 2016).

- Le système immunitaire adaptatif se forme tout au long de la vie de l'organisme, et permet une réponse immunitaire coordonnée et spécifique déclenchée après l'activation de l'immunité innée. Ces réponses adaptatives sont basées sur la reconnaissance des antigènes par des récepteurs variables à l'antigène, générés de manière aléatoire dans les organes lymphoïdes primaires, exprimés à la surface des lymphocytes T et des lymphocytes B (Huston, 1997). La réponse immunitaire adaptative nécessite l'action des cellules présentatrices d'antigène pour se mettre en place. Les cellules dendritiques présentes dans les tissus capturent des pathogènes, qui sont alors clivés en peptides, couplés à des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'antigène est présenté aux lymphocytes T helper (Th), ce qui induit l'activation et la différenciation des lymphocytes spécifiques de cet antigène (Janeway *et al.*, 2001; Yatim and Lakkis, 2015). La réponse effectrice se met alors en place, notamment via la relocalisation des lymphocytes T activés au site où a été rencontré



**Figure 10 : Interactions entre immunité innée et adaptative (d'après Akira, 2011)**

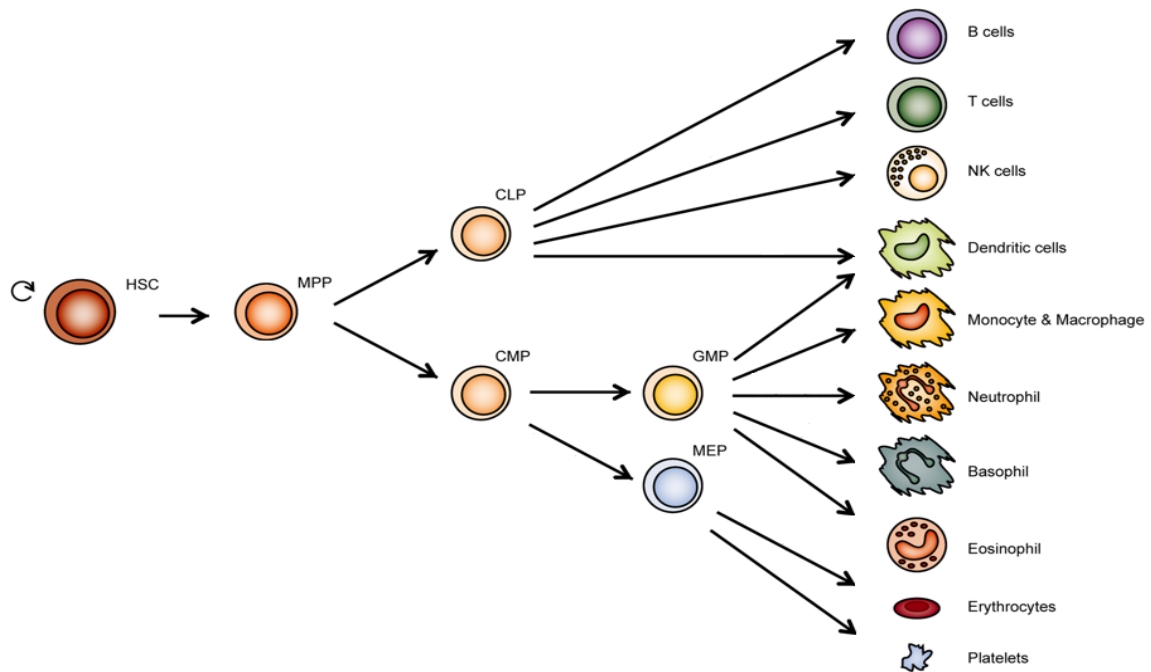
Après une invasion pathogène, le système immunitaire inné est activé en premier et participe à la réponse initiale contre les pathogènes. Les cellules dendritiques phagocytent des antigènes du pathogène et migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques pour présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes T. Le système immunitaire adaptatif est activé, les lymphocytes T CD4+ permettent l'activation des lymphocytes B, leur différenciation en plasmocytes et la production d'anticorps. Les anticorps et les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques constituent une réponse immunitaire spécifique au pathogène.

l'antigène et par la sécrétion d'anticorps par les plasmocytes issus de la différenciation des lymphocytes B activés (Parkin and Cohen, 2001). De plus, l'une des grandes caractéristiques du système immunitaire adaptatif est sa mémoire, qui permet une réponse plus rapide et plus forte quand l'organisme rencontre à nouveau un antigène, grâce à la survie à long terme et l'activation de lymphocytes mémoires.

Une synergie entre ces deux mécanismes est nécessaire et essentielle pour obtenir une réponse immunitaire efficace (Chaplin, 2010; Medina, 2016)(figure 10). En effet, les systèmes immunitaires inné et adaptatif interagissent en continu, par exemple via les cellules dendritiques qui, comme mentionné plus haut, présentent des antigènes et activent les lymphocytes. Réciproquement, les lymphocytes peuvent aussi recruter des éléments du système immunitaire inné afin d'éliminer des pathogènes. Les macrophages sont ainsi capables d'interagir avec les lymphocytes T Helper 1 (Th1) afin d'être plus compétents pour la dégradation de pathogènes (*cf.* paragraphe Introduction III.B.1).

## A. L'hématopoïèse

Les cellules du système sanguin, parmi lesquelles l'on retrouve les cellules impliquées dans le système immunitaire, se différencient toutes à partir de cellules progénitrices communes, les cellules souches hématopoïétiques (HSC), par le biais du procédé nommé hématopoïèse. Les cellules souches hématopoïétiques sont capables de se différencier en toutes les cellules du système sanguin (érythrocytes, leucocytes...) et ont aussi la capacité de s'auto-renouveler (Orkin, 2000; Orkin and Zon, 2008). Après la naissance, l'hématopoïèse a lieu uniquement dans la moelle osseuse, qui doit renouveler continuellement les cellules afin



**Figure 11 : Hématopoïèse** (d'après Jost and Höckendorf, 2019)

HSC : cellule souche hématopoïétique

MPP : progéniteur multipotent

CLP : précurseur lymphoïde commun

CMP : précurseur myéloïde commun

MEP : progéniteur commun mégacaryocytaire érythroblastique

GMP : progéniteur commun granulocytaire monocyttaire

de maintenir leur nombre dans l'organisme : un adulte produit ainsi environ 200 milliards d'érythrocytes quotidiennement (Fliedner *et al.*, 2004 ; Bouhassira, 2012) (figure 11).

Durant l'hématopoïèse, certaines des cellules souches pluripotentes se différencient en cellules précurseurs de la lignée myéloïde ou lymphoïde, puis en cellules progénitrices, qui sont alors destinées à une lignée cellulaire ciblée et perdent alors la capacité de se renouveler. La lignée lymphoïde engendre les progéniteurs des lymphocytes T et B ainsi que des cellules lymphoïdes innées comme les Natural Killers, tandis que la lignée myéloïde génère des progéniteurs pour les autres types cellulaires, incluant les érythrocytes, les mégacaryocytes et les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) ; les monocytes et macrophages ; les cellules dendritiques. La différenciation de ces progéniteurs est dépendante de leur environnement, notamment des quantités et des types de facteurs de croissance et cytokines présents et des cellules stromales (Orkin, 2000; Orkin and Zon, 2008).

Je vais à présent m'attacher à décrire quelques grands acteurs de la réponse immunitaire innée puis adaptative autour desquels ont gravité mes recherches de thèse. Mes travaux s'étant principalement concentrés autour des cellules dendritiques plasmacytoïdes, je m'attarderai plus particulièrement sur ces cellules.

## B. Cellules clés de l'immunité innée

### 1. Les macrophages

Les macrophages ont une fonction essentielle dans l'immunité innée. Au cours de la vie embryonnaire ou en conditions inflammatoires, des macrophages se différencient à partir des

monocytes circulant dans le sang, qui grossissent peu à peu pour atteindre de 2 à 4 fois leur taille initiale. Après environ 8h de circulation dans le système sanguin, les macrophages migrent dans les tissus vers les sites de rencontre les plus probables d'antigènes, se différenciant alors en macrophages tissu-spécifiques (Medina, 2016). Chez l'adulte, il existe aussi des macrophages résidents dans les tissus. Ils sont, eux, issus de précurseurs du sac vitellin, et sont capables de s'auto-renouveler (Gomez Perdiguero *et al.*, 2014).

L'une des fonctions majeures des macrophages est l'internalisation et la dégradation de pathogènes par phagocytose, forme d'endocytose spécialisée dépendante de l'activité lysosomale. Les macrophages sont aussi capables de phagocyter des cellules lésées, nécrotiques ou apoptotiques, notamment aux sites d'infection, limitant ainsi les réponses inflammatoires ou autoimmunes par relargage de DAMPs ou d'autoantigènes (Abbas *et al.*, 2018).

Les macrophages activés produisent aussi les protéines inflammatoires telles que l'Interleukine-1 (IL-1), l'Interleukine 6 (IL-6) et Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) qui permettent le recrutement de neutrophiles sur le site de l'infection et déclenche l'expression des gènes codant pour les protéines de phase aiguë dans le foie (Parkin and Cohen, 2001; Medina, 2016). Les macrophages peuvent aussi assurer une fonction de cellule présentatrice d'antigène (CPA), en condition d'infection par des pathogènes. Contrairement aux cellules dendritiques, cette fonction n'est alors pas utilisée pour initier une réponse du système adaptatif, mais pour améliorer la capacité des macrophages à se débarrasser des microorganismes. Les macrophages ont besoin de deux signaux afin d'être activés, CD40 ligand (CD40L), ainsi que l'interféron-gamma. Ce dernier peut être produit par différentes cellules comme les NK, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou les lymphocytes Th1 activés, qui ont la capacité de délivrer les deux

signaux nécessaires pour l'activation. Les macrophages présentant des antigènes couplés au CMH de classe 2 sont reconnus par les Th1, qui induisent en réponse de l'interféron-gamma et le contact entre ces deux cellules permet l'interaction de CD40 sur le macrophage avec CD40L sur le Th1, générant ainsi les deux signaux nécessaires à l'activation du macrophage (Janeway *et al.*, 2001; Leopold Wager and Wormley Jr, 2014).

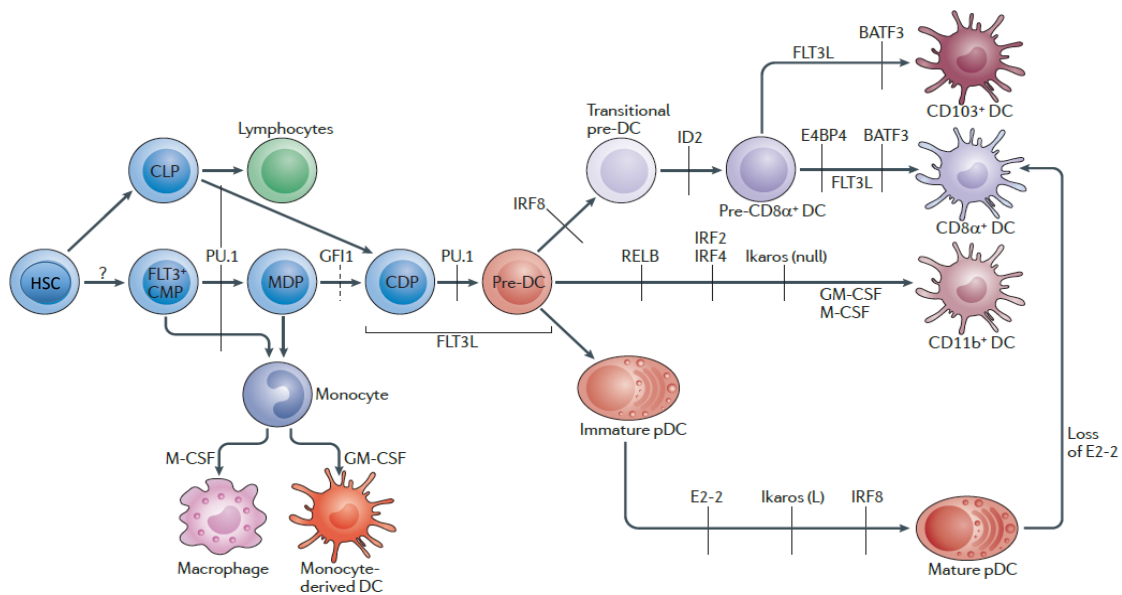
## 2. Les cellules dendritiques

### a) Cellules dendritiques conventionnelles

Les cellules dendritiques conventionnelles, sont des cellules à capacité migratoire qui représentent environ 1% des cellules des organes lymphoïdes secondaires. Elles possèdent de multiples prolongements cytoplasmiques, les dendrites, qu'elles peuvent étendre dans tous les interstices tissulaires ce qui leur permet de repérer aisément des pathogènes, des antigènes tumoraux ou des DAMPs. Ce sont des CPA, qui jouent donc le rôle de sentinelles pour repérer des infections, des antigènes tumoraux ou des dommages tissulaires dans l'organisme, et leur rôle essentiel permet le lien entre l'immunité innée dont elles font partie et le déclenchement de la réponse adaptative (Ardavín *et al.*, 2001; Liu and Nussenzweig, 2010; Abbas *et al.*, 2018) (Abbas *et al.*, 2017).

#### (1) Ontogénie

Les cellules dendritiques se différencient depuis les cellules souches hématopoïétiques (figure 11). Le développement des cellules dendritiques, comme des monocytes, nécessite une



**Figure 12 : Ontogénie des cellules dendritiques et facteurs de transcription mis en jeu** (adapté d'après Belz *et al.* 2012)

Les cellules dendritiques se différencient à partir des HSC en CMP puis MDP, CDP et pré-DC en présence des facteurs PU.1 et GF1 puis Flt3-L. la différenciation en différents sous-groupes de cellules dendritiques en présence de ID2, Flt3-L et BATF3 pour les DC CD103+ et CD8α+, ou de RELB, IRF2 et 4 et Ikaros pour les DC CD11b+. La différenciation en pDC nécessite les facteurs E2-2, Ikaros et IRF8.

grande concentration du facteur de transcription PU.1, qui régule l'expression de Flt3 (fms like tyrosine kinase 3), M-CSFR (macrophage colony stimulating factor receptor) et GM-CSFR (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor). PU.1 permet la transition des précurseurs myéloïdes communs (CMP) aux précurseurs de monocytes et cellules dendritiques (MDP), puis aux précurseurs dendritiques communs (CDP) en présence de GFI1. La différenciation en cellules dendritiques pré-conventionnelles (pré-DC) nécessite l'expression de Flt3-ligand (Flt3-L). Le développement des cellules dendritiques conventionnelles dépend ensuite de plusieurs facteurs (notamment IRF8, ID2, BATF3 et Flt3L pour les cellules dendritiques CD8a+ et CD103+ ou RELB, IRF2, IRF4 et Ikaros pour les cellules dendritiques CD11b+). Concernant la différenciation des pré-DC en pDC, elle nécessite un faible niveau de PU.1 et l'expression de IRF8, Flt3L, E2-2 et Ikaros (Belz and Nutt, 2012)(figure 12).

## (2) Rôle

Les cellules dendritiques expriment des PRR qui reconnaissent des MAMPs et DAMPs spécifiques et induisent la sécrétion de cytokines inflammatoires conduisant au recrutement des cellules immunitaires au site de l'infection (Abbas *et al.*, 2018). De plus, les cellules dendritiques sont aussi capables de capturer par phagocytose ou pinocytose des antigènes, qui sont alors clivés en peptides, couplés à des protéines du CMH et présentés aux lymphocytes T (Yatim and Lakkis, 2015; Castell-Rodríguez *et al.*, 2017). Comme les lymphocytes T résident principalement dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules dendritiques doivent les rejoindre depuis leur site de capture d'antigène en se déplaçant dans les vaisseaux sanguins. Enfin, les cellules dendritiques produisent des signaux qui stimulent la

prolifération et la différenciation des lymphocytes T (Zhu and Chen, 2009). L'activation des lymphocytes T par la CPA nécessite deux signaux, le premier correspondant à la liaison entre le récepteur TCR sur le lymphocyte et le peptide qui y correspond, couplé au CMH sur la CPA (CMH de classe 1 pour lymphocytes T cytotoxiques CD8+ ou le récepteur pour le CMH de classe 2 pour les lymphocytes T helper CD4+). Le second signal provient de la liaison du récepteur de co-stimulation CD28 exprimé constitutivement par les lymphocytes T naïfs et la protéine B7 (composée des protéines CD80 et CD86) de la CPA. C'est ce deuxième signal qui engendre la réponse du lymphocyte T à l'antigène, sans lui le lymphocyte T ne réagit pas à l'antigène et devient plus difficile à stimuler par la suite (Zhu and Chen, 2009; Beyersdorf *et al.*, 2015). Les cellules dendritiques jouent donc un rôle crucial dans l'activation des lymphocytes T et l'initiation de la réponse immunitaire adaptative.

#### *b) Cellules dendritiques plasmacytoïdes*

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ont été nommées d'après leur morphologie semblable à celle des plasmocytes, c'est-à-dire des lymphocytes B activés qui produisent les anticorps. Comme les plasmocytes, elles ont une forme ronde, avec un noyau large et présentent une grande quantité de réticulum endoplasmique (Soumelis and Liu, 2006; Guiducci *et al.*, 2009). Ces cellules pDC ont une durée de vie courte de quelques jours (Zhan *et al.*, 2016). Les pDC sont produites dans la moelle osseuse mais terminent leur maturation dans les organes périphériques, où elles représentent 0,1 à 0,5% des cellules nucléées (Reizis, 2019). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes expriment le récepteur à cytokine Flt3 et leur développement est très fortement influencé par la présence du ligand de Flt3, qui est

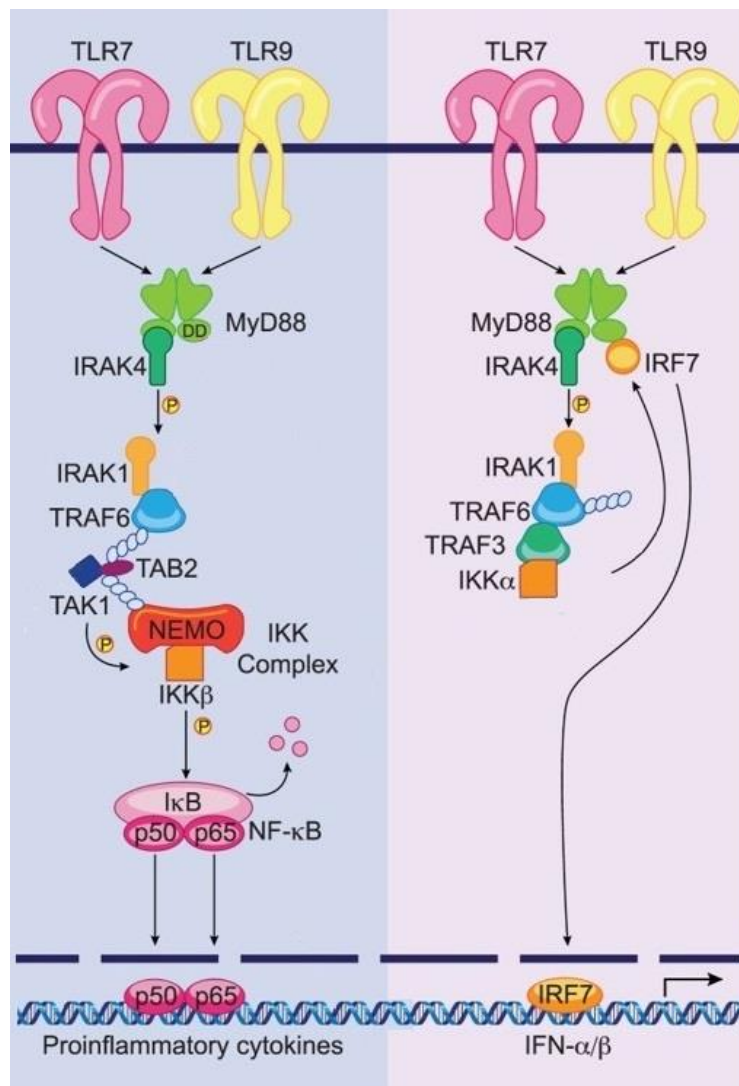
nécessaire et suffisante pour conduire le développement des précurseurs myéloïdes et lymphoïdes en pDC (Sathe *et al.*, 2014).

#### (1) Rôle

Les pDC jouent un rôle important dans le système immunitaire inné en participant activement à la défense de l'organisme contre les virus. En effet, ces cellules sont spécialisées dans la reconnaissance d'acides nucléiques viraux, ARN simple brin ou ADN contenant des îlots CpG non méthylés par le biais de leurs récepteurs TLR7 et TLR9 (Lui *et al.*, 2009; Reizis, 2019). Les cellules pDC produisent alors des quantités massives d'interféron de type 1, notamment l'interféron- $\beta$  et la majorité des interférons- $\alpha$ . Ces cellules peuvent aussi produire d'autres cytokines inflammatoires, comme l'IL-6 et le TNF $\alpha$ . Cette production massive et rapide d'interféron est à l'origine du premier nom attribué à ces cellules : « natural interferon producing cells ». Enfin, bien que les pDC présentent une faible capacité de capture d'antigènes, il semble qu'elles soient aussi capables d'assurer une fonction de cellules présentatrices d'antigène pour les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Villadangos and Young, 2008; Lui *et al.*, 2009).

#### (2) Activation

L'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes débute par la reconnaissance d'acides nucléiques viraux par les récepteurs TLR7 et TLR9. Toutefois, cette reconnaissance n'est pas séquence spécifique et pose donc la question du risque d'autoimmunité si ces TLR



**Figure 13 : Voies de signalisation des TLR intracellulaires dans les pDC** (d'après Blasius and Beutler, 2010)

A gauche : MyD88 recrute IRAK4. IRAK4 phosphoryle TRAF6, qui poly-ubiquitine NEMO et lui-même, ainsi que TAK1. TAB2 associée à TAK1 maintient TRAF6 et NEMO proches l'une de l'autre. TAK1 phosphoryle IKK $\gamma$ , menant à la dégradation de I $\kappa$ B. Ceci active NF- $\kappa$ B et permet transcription des gènes codant pour des cytokines inflammatoires.

A droite : L'activation de TLR7 ou TLR9 permet le recrutement de MyD88 et IRAK4, qui interagissent avec IRAK1, TRAF6, TRAF3, IKK $\alpha$  et IRF7. IRAK1 et/ou IKK $\alpha$  phosphorylent IRF7, engendrant la transcription des gènes codant pour l'interféron de type 1.

réagissent à des acides nucléiques du « soi » (Marshak-Rothstein, 2006). Un dysfonctionnement des pDC a ainsi été impliqué dans différentes pathologies autoimmunes, notamment le lupus érythémateux systémique (SLE), l'arthrite rhumatoïde ou le psoriasis. Les pDC peuvent par exemple être recrutées depuis les vaisseaux sanguins périphériques et s'accumulent dans la peau d'où elles sont normalement absentes pour générer des réponses immunitaires locales. Plusieurs études montrent que les pDC peuvent aggraver le développement des maladies autoimmunes, par exemple par la surproduction d'IFN de type I dans le SLE (Li *et al.*, 2017).

Les pDC doivent donc faire la distinction entre acides nucléiques étrangers de ceux de l'organisme. Pour cela, les récepteurs TLR7 et TLR9 sont localisés dans des compartiments intracellulaires, où les acides nucléiques propres à l'organisme sont normalement absents (Latz *et al.*, 2004; Blasius and Beutler, 2010). En effet, TLR7 et TLR9 sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique avant de migrer dans les endolysosomes, via l'appareil de Golgi (Ewald *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008). Une fois dans les endolysosomes, les ectodomains de TLR7 et TLR9 sont clivés par des cathepsines, activant ainsi ces récepteurs qui peuvent alors reconnaître les acides nucléiques des virus endocytés (Ewald *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008; Bao and Liu, 2013). Les formes clivées de TLR7 et TLR9 liées aux acides nucléiques recrutent alors la protéine adaptatrice MyD88, qui recrute IRAK4, qui phosphoryle IRAK1, qui active TRAF3, TRAF6 et la kinase IKK $\alpha$  qui phosphoryle IRF7, conduisant à la translocation de ce facteur de transcription dans le noyau où il induit l'expression d'interféron de classe 1 (Kawai *et al.*, 2004; Honda *et al.*, 2005; Ewald *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008; Kawasaki and Kawai, 2014). De plus, l'activation de la voie MyD88/IRAK4/TRAF6 permet aussi une production de cytokines inflammatoires telles que TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-12. Cette voie est dépendante de NF- $\kappa$ B,

via l'ubiquitinylation de la protéine IKK $\gamma$  (NEMO), reconnue par la protéine TAB2, associée à TAK1 (Blasius and Beutler, 2010) (Figure 13).

## C. Les lymphocytes B et T, cellules clés de l'immunité adaptative

### 1. *Ontogénie des lymphocytes B et T*

Les lymphocytes B et T se différencient à partir d'un progéniteur lymphoïde commun situé dans la moelle osseuse. Les LB restent dans la moelle osseuse durant leur développement tandis que les LT migrent dans le thymus où ils sont appelés thymocytes. La différenciation des LB et des LT se fait conjointement à la recombinaison VDJ du BCR (B cell receptor) et du TCR (T cell receptor). Les gènes V, D et J qui codent pour ces récepteurs sont en fait composés de plusieurs segments de ces gènes (jusqu'à des dizaines) à la suite. Pendant la recombinaison VDJ, un seul segment de chacun des gènes est gardé de façon aléatoire, tandis que les autres segments sont clivés. C'est cet appariement aléatoire de différents segments V, D et J qui permet de créer des milliards de récepteurs à antigènes possibles (Chaplin, 2010; Janeway *et al.*, 2001).

Une partie des progéniteurs lymphoïdes communs se différencie donc en pro-LB, où ils commencent le réarrangement de la chaîne lourde de leur BCR, puis en pré-LB où a lieu de réarrangement des chaînes légères, et enfin en LB immature. Après une étape de sélection pour ne garder que les LB qui expriment des récepteurs qui ne reconnaissent pas le soi, les LB alors matures. Ils expriment à leur surface des IgM et IgD en plus du BCR et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (Hentges, 1994).

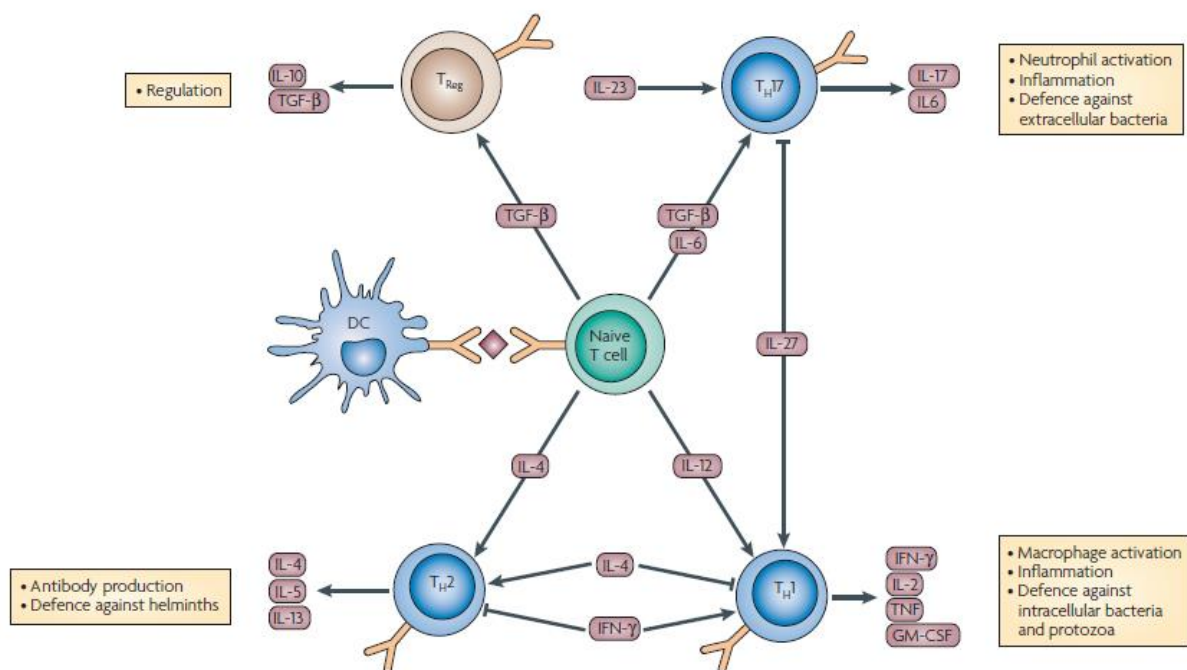
L'autre partie des progéniteurs lymphoïdes communs réalisent leurs étapes de différenciation dans le thymus, où ils migrent depuis la moelle osseuse par la circulation sanguine (Huston, 1997). Au stade pro-LT, les thymocytes commencent à réarranger leur TCR. Ils subissent ensuite deux étapes de sélection pour s'assurer que les thymocytes reconnaissent des molécules de CMH couplé à un peptide et ne réagissent qu'aux peptides correspondant au non-soi. Les thymocytes n'expriment plus qu'un cluster de différenciation CD4 ou CD8 en fonction de la classe de CMH à laquelle ils peuvent se lier (CD8 s'ils reconnaissent le CMH de classe 1 et CD4 s'ils reconnaissent le CMH de classe 2). Les thymocytes matures naïfs migrent ensuite du thymus jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires où ils pourront être activés par une CPA (*cf.* Introduction III.B.2) (Wilson, 1991).

## *2. Différenciation des cellules effectrices LT CD8+ et CD4+*

Après activation par une CPA, les LT CD8+ cytotoxiques se rendent sur le site d'où provient l'antigène présenté et peuvent induire la mort de cellules cibles en relâchant des perforines, capables de faire des pores dans la membrane et des sérine-estérases qui induisent l'apoptose (Zhang and Bevan, 2011; Medina, 2016).

Les LT CD4+ peuvent se différencier en plusieurs sous catégories dont je ne citerai que les majoritaires : les lymphocytes T helper (Th) ou les lymphocytes T régulateurs (Treg). Le type de Th en lequel vont se différencier les LT dépend principalement des cytokines présentes dans leur environnement lors de la présentation antigénique (Zhu and Paul, 2010).

Les Th1 et Th2 correspondant à deux groupes majeurs de LT CD4+ et la multiplication de l'un des phénotypes engendre l'inhibition du développement de l'autre. Les Th1 sécrètent de



**Figure 14 : Différentes sous-populations de LT CD4+ (d'après Kaufmann, 2007)**

Quatre populations principales sont montrées ici. Les Treg régulent les réponses immunitaires excessives. Les Th1 contrôlent l'immunité cellulaire (activation des macrophages) en sécrétant majoritairement IFN- $\gamma$  et IL-2. Les Th2 ont un rôle clé dans la production d'anticorps par les LB et la défense contre les parasites extracellulaires, et sécrètent de l'IL-4 et IL-5. Les Th17 sont impliqués dans la défense contre les bactéries extracellulaires en activant les neutrophiles.

l'IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha/\beta$  et IL-2, et sont capables d'activer des macrophages afin de renforcer leur efficacité comme nous l'avons en paragraphe III.B.1. Les Th1 sont aussi impliqués dans des maladies autoimmunes. Les Th2 sécrètent majoritairement IL-4, IL-5 et IL-13, et initient l'immunité humorale en menant à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes qui sécrètent des anticorps. La production d'IL-5 permet la production d'IgE et le recrutement des éosinophiles, ce qui se révèle efficace pour lutter contre des parasites extracellulaires mais favorise en contrepartie les allergies.

Les Th17 sont générés en présence d'IL-23, et sécrètent de l'IL-17 et IL-22 et permettent l'activation de neutrophiles pour la défense contre les bactéries extracellulaires. Ils sont aussi impliqués dans plusieurs maladies auto-immunes.

Les Treg correspondent à 1-2% de la population de LT CD4+. Ils sont responsables de l'homéostasie dans l'organisme en régulant les autres lymphocytes CD4+ ou CD8+. Ils engendrent ainsi une tolérance envers les antigènes du soi ou ceux qui sont non dangereux pour l'organisme et permettent de limiter les réactions autoimmunes (Kaufmann, 2007; Zhu and Paul, 2010; Santarlasci *et al.*, 2013) (figure 14).

## OBJECTIFS

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie caractérisée par une dégénérescence des motoneurones supérieurs et inférieurs se manifestant par une faiblesse et une atrophie musculaire menant à la paralysie. En évoluant, la maladie peut atteindre les muscles nécessaires à la respiration et dans plus de la moitié des cas, les patients atteints de SLA décèdent entre 3 à 5 ans après le début des symptômes, le plus souvent d'une insuffisance respiratoire. En 2011, il a été établi que la cause la plus fréquente de SLA était une expansion de répétitions (entre 400 et 1600) d'hexanucléotides GGGGCC dans le gène (DeJesus-Hernandez et al., 2011 ; Renton et al., 2011). Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer comment cette expansion de répétitions GGGGCC pouvait conduire à une SLA, parmi lesquels une hyperméthylation des CpG en amont des expansions de répétitions, qui entraîne une diminution de la transcription du gène C9ORF72 (Xi et al., 2013 ; Belzil et al., 2014) et ainsi une haploinsuffisance de la protéine C9ORF72 (Waite et al., 2014 ; Xiao et al., 2015).

Comme il n'y avait que très peu d'informations disponibles sur C9ORF72 quand j'ai commencé ma thèse en 2016, j'ai tout d'abord travaillé sur l'étude des fonctions moléculaires et cellulaires de C9ORF72 avec le Dr. Chantal Sellier. Afin mieux définir le rôle de cette protéine, nous avons tout d'abord recherché ses interactants puis nous avons étudié sa fonction *in vitro* dans des cultures de cellules neuronales.

Différentes études ont confirmé une diminution de l'expression de C9ORF72 dans le sang (Davidson et al., 2014), le cortex (Fratta et al., 2013 ; Belzil et al., 2013), le cervelet (Belzil et al., 2013 ; Donnelly et al., 2013) et la moelle épinière (Donnelly et al., 2013) de patients

portant des expansions GGGGCC dans le gène C9ORF72. Nous avons donc généré un modèle murin KO pour *C9orf72* afin d'étudier les conséquences de sa perte *in vivo*. Nous avons ensuite phénotypé notre modèle murin pour déterminer s'il présentait des symptômes associables à une SLA.

Contrairement à nos attentes, ce modèle murin ne présentait pas de phénotype semblable à une SLA, mais un désordre immunitaire sévère, menant *in fine* à la mort prématurée de nos animaux. Ces constatations nous ont conduits à explorer un nouvel axe de recherche afin de mieux comprendre le rôle de C9ORF72 : l'identification de la population cellulaire responsable de ce désordre immunitaire. Pour répondre à cette question, nous avons généré de nouveaux modèles murins présentant un KO de *C9orf72* cellule spécifique dans quatre lignées cellulaires majeurs impliquées dans la réponse immunitaire. Nous avons par la suite immunophénotypé la lignée cellulaire qui était selon nous impliquée dans le désordre immunitaire puis cherché à reproduire les résultats obtenus lors de l'immunophénotypage en culture cellulaire.

Enfin, comme la première partie de mes travaux de thèse avec le Dr. Chantal Sellier a permis d'établir que C9ORF72 forme un complexe avec la protéine SMCR8 dont la fonction était encore inconnue, nous avons étudié sa fonction moléculaire et cellulaire en cultures de cellules neuronales et généré un modèle murin *Smcr8* KO. Ce dernier présentant lui aussi un désordre immunitaire sévère, nous avons cherché à définir si cette inflammation était due à la même population cellulaire que dans nos modèles *C9orf72* KO.

En conclusion, l'objectif de ce projet de thèse était de mieux évaluer les fonctions moléculaires et cellulaires de C9ORF72 et SMCR8 dans la SLA ou encore dans d'autres mécanismes liés à l'inflammation.

# **MATERIELS ET METHODES**

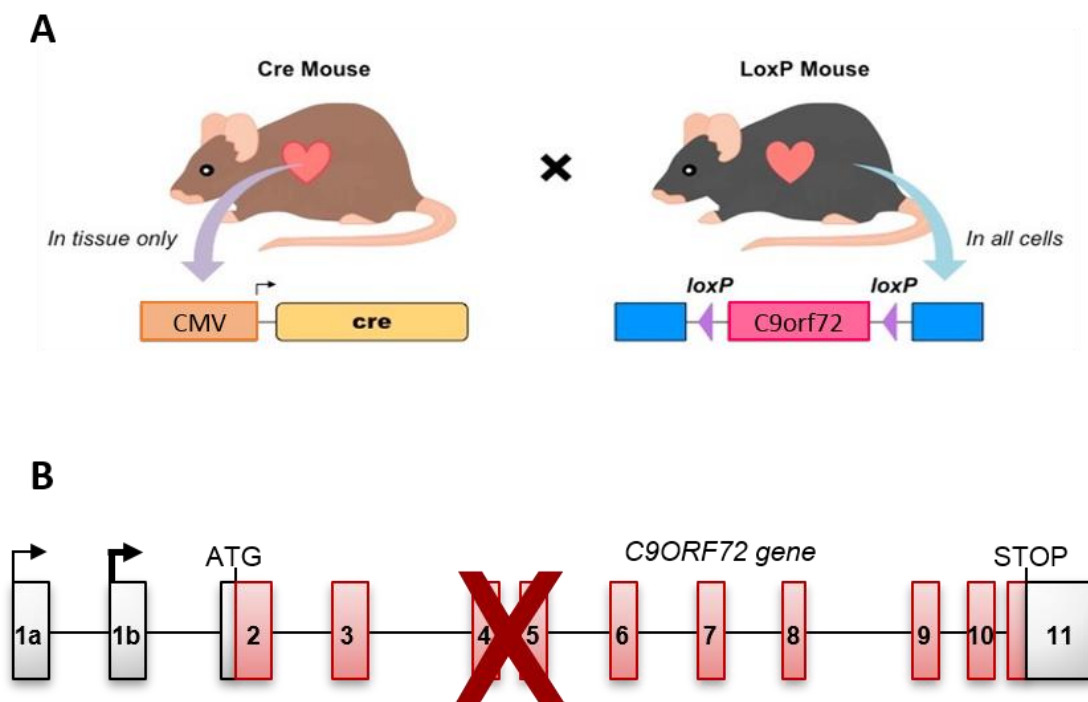


Figure 15 : Génération du modèle murin C9orf72 flox x CMV Cre

A) Croisement de souris exprimant la Recombinase Cre sous contrôle du promoteur CMV et de souris où le gène C9orf72 est flanqué de deux séquences loxP.

B) Les exons 4 et 5 du gène C9orf72 ont été floxés pour générer un knock out dans nos modèles murins.

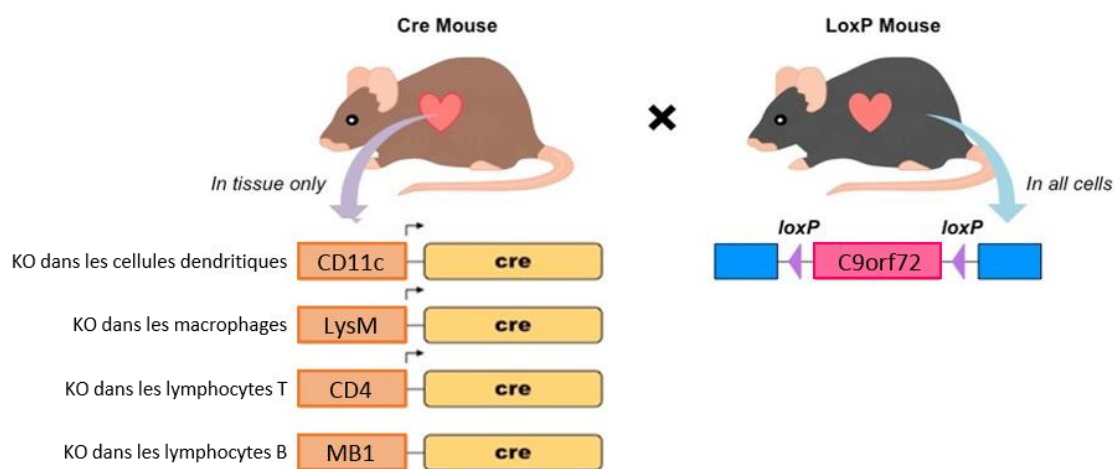
# MATERIELS ET METHODES

Cette partie ne détaille que les matériels et méthodes qui ne sont pas présentés dans la publication en partie 1 des Résultats.

## I. Modèles murins

### A. Génération de souris *C9orf72* KO

Des cellules ES de souris *C9orf72* avec les exons 5 et 6 floxés ont été générées par recombinaison homologue à l'Institut Clinique de la Souris, puis ces cellules ES ont été injectées à des blastocytes et implantées pour obtenir des souris chimères qui ont permis d'obtenir une lignée murine mutante dont les exons 5 et 6 du gène *C9orf72* sont entourés de sites *LoxP* (allèle *C9orf72* floxé). Des individus hétérozygotes pour l'allèle *C9orf72* délété (*C9orf72*<sup>wild type/-</sup>) ont alors été obtenus en croisant des souris mâles *C9orf72*<sup>flox/+</sup> avec des souris femelles transgéniques C57BL/6-Tg(CMV-Cre) (figure 15). Ces souris CMV Cre expriment la *Cre* recombinase de façon ubiquitaire à partir du stade embryonnaire 2 cellules, sous contrôle du promoteur minimal du cytomégalovirus (CMV) humain. Les individus homozygotes *C9orf72*<sup>-/-</sup> ont été obtenus selon les protocoles de croisement standards. Tous les protocoles et procédures expérimentaux ont été validés et réalisés avec l'accord du comité local d'éthique (Com'Eth, Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale IGBMC-ICS). Les souris adultes ont été sacrifiées pour des expérimentations par intoxication au CO<sub>2</sub>.



**Figure 16 : Génération du modèle murin C9orf72 KO dans différentes populations cellulaires**

Croisement de souris exprimant la Recombinase Cre sous contrôle du promoteur CD11c (KO dans les cellules dendritiques), LysM (KO dans les macrophages), CD4 (KO dans les lymphocytes T) ou MB1 (KO dans les lymphocytes B) et de souris où le gène C9orf72 est flanqué de deux séquences loxP.

## B. Génération des souris présentant un KO C9orf72 spécifique

Quatre lignées murines présentant un KO spécifique pour le gène C9orf72 dans les lymphocytes B, les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les macrophages ont été générées à l'Institut Clinique de la Souris en croisant des souris mâles C9orf72<sup>flox/+</sup> avec des souris femelles transgéniques des lignées suivantes (figure 16) :

- C57BL/6-Tg(CD11c-Cre). Ces souris expriment la *Cre* recombinaise sous contrôle des promoteur et enhancers du gène de l'intégrine alpha X (*Itgax* ou *CD11c*). Ces souris CD11c Cre engendrent une délétion de séquences floxées dans les cellules dendritiques CD8- et CD8+, ainsi que les cellules dendritiques plasmacytoïdes.

- C57BL/6-Tg(MB1-Cre). Ces souris expriment la *Cre* recombinaise sous contrôle des promoteurs et enhancers du gène *CD79a*. L'expression de la *Cre* recombinaise est dirigée à partir des stades précoces et tout au long du développement et de la différenciation des lymphocytes B. Ces souris MB1 Cre permettent donc de générer des mutations conditionnelles dans les lymphocytes B.

- C57BL/6-Tg(CD4-Cre). Ces souris expriment la *Cre* recombinaise sous contrôle des enhancers, promoteur et silenciers du gène *CD4*. Ces souris DC4 Cre permettent de générer des mutations conditionnelles dans les tissus exprimant *CD4*, et par conséquent dans les lymphocytes T *CD4+*.

- C57BL/6-Tg(LysM-Cre). Ces souris expriment la *Cre* recombinaise sous contrôle des promoteur et enhancers du gène *Lysozyme 2* (*Lyz2*). Les souris *LysM* Cre permettent une délétion de séquences floxées dans des cellules de la lignée myéloïde : les monocytes, les macrophages et les granulocytes.

Des individus homozygotes *C9orf72* loxP/loxP x Cre tissu spécifique ont par la suite été obtenus selon les protocoles de croisement standards. Tous les protocoles et procédures expérimentaux ont été validés et réalisés avec l'accord du comité local d'éthique (Com'Eth, Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale IGBMC-ICS). Les souris adultes ont été sacrifiées pour des expérimentations par intoxication au CO<sub>2</sub>.

### C. Génération des souris *Smcr8* KO

Les souris *Smcr8* KO ont été obtenues auprès du consortium IMPC (« International Mouse Phenotyping Consortium »). Ces animaux ont été obtenus par le biais de l'insertion d'une cassette LacZ à la place du gène *Smcr8* par recombinaison homologue. En effet, un plasmide portant le gène LacZ entouré des séquences bordant le gène *Smcr8* et couplé à un gène de résistance à la néomycine a été introduit dans des cellules souches embryonnaires (ES) de souris par électroporation. Les cellules ES ayant réalisé une recombinaison homologue afin de remplacer *Smcr8* par le gène *LacZ* ont été sélectionnées en présence de néomycine, puis injectées dans des blastocystes ensuite réimplantés dans une mère porteuse. Les individus mosaïques exprimant le gène *LacZ* dans les cellules germinales ont été croisés avec des souris wild type C57BL/6 afin d'obtenir des souris hétérozygotes KO pour le gène *Smcr8*. Les individus homozygotes *Smcr8* KO ont enfin été obtenus par croisement des hétérozygotes selon des protocoles de croisement standards. Tous les protocoles et procédures expérimentaux ont été validés et réalisés avec l'accord du comité local d'éthique (Com'Eth, Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale IGBMC-ICS). Les souris adultes ont été sacrifiées pour des expérimentations par intoxication au CO<sub>2</sub>.

## II. Phénotypage des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre

Les souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre ont été phénotypées par l'Institut Clinique de la Souris, Illkirch, France. Les tests ont été réalisés sur 12 animaux mâles *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et 9 animaux mâles wild type.

Activité locomotrice : les animaux ont été placés dans une cage et l'activité des animaux a été suivie sur une période de 35h, avec des cycles jour-nuit alternés toutes les 12h. Il est possible de calculer la distance totale parcourue par les animaux, le nombre total de redressements ainsi que le temps qu'ils ont passé au centre de la cage.

Test d'agrippement : les animaux ont été tenus par la queue et passés sur une grille couplée à un tensiomètre. Ce test permet de mesurer la force maximale d'agrippement dans les pattes postérieures des animaux.

Rotarod : les souris ont été placées sur un cylindre en rotation dont la vitesse augmente progressivement de 4 à 40 rotations/min. Il est possible de mesurer le temps avant la chute des animaux.

Catwalk : ce test permet de comparer les démarches des animaux en fonction de trois paramètres. Le Swing correspond au temps où la patte est levée lors de la marche, le Stance le temps où la patte est posée sur le sol et le Stride correspond au temps total entre deux placements de la patte, soit Swing+Stance.

Test de réflexe acoustique : les animaux ont été placés dans une cage spéciale avec des senseurs de mouvement. Après un stimulus sonore bruyant (à 70, 75, 80, 85 et 90 décibels pendant 10ms), les souris présentent un réflexe de sursaut caractérisé par une contraction

rapide des muscles faciaux et squelettiques. Il est possible de mesurer la magnitude et le temps de latence de la réponse après stimulus.

Test de mémoire spatiale à court terme : les souris ont été placées dans un labyrinthe composé de trois branches disposées en forme de Y, et l'on note les différentes branches successives empruntées par les souris. Ce test est basé sur la préférence des rongeurs d'aller visiter une nouvelle branche plutôt que retourner dans la branche qu'ils ont visitée précédemment. Il est possible de compter le nombre d'entrées dans les branches et de calculer le pourcentage d'alternance entre les branches.

Test d'exploration d'objet : Lors d'une première session, les animaux ont été placés dans une enceinte en présence de deux objets identiques que les animaux peuvent explorer librement. Le jour du test, l'un des objets a été remplacé par un nouvel objet. Les rongeurs préférant la nouveauté, ils explorent plus longuement le nouvel objet que l'objet familier.

### III. Analyse du sérum des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre

Des analyses de sérum des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre ont été réalisées par l'Institut Clinique de la Souris, Illkirch, France afin de déterminer la concentration d'immunoglobulines libres dans le sang des animaux. Les analyses ont été réalisées sur 6 animaux mâles *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et 6 animaux mâles wild type.

## IV. ImmunoHistoChimie

Les souris ont été perfusées par voie intracardiaque avec du paraformaldéhyde 4X dans du PBS 1X. Les tissus récupérés ont été inclus en paraffine et découpés en sections de 5µm d'épaisseur qui ont ensuite été montées sur des lames SuperFrost Plus. Pour les analyses ImmunoHistoChimiques, les coupes ont été dé-paraffinées dans de l'Histosol (CML France) 2 x 5min et réhydratées dans des bains d'éthanol de concentration décroissante (100% 2 x 1min, 90% 2x1min, 70% 1min, H<sub>2</sub>O 1min). Les coupes ont été ensuite humidifiées avec une solution de PSB 1X, 0,02% Thimerosal puis incubées avec un tampon citrate (Citrates de sodium 8,2mM, acide citrique 1,8mM, pH6) au bain marie à 80°C pendant 20 min et les lames refroidies sur glace 5min. Les peroxydases endogènes ont été neutralisées en incubant les coupes de tissus dans une solution de PBS 1X, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 15 min à température ambiante. Afin de réduire d'autres signaux non spécifiques, les lames ont été immergées dans un tampon de saturation composé de PBS 1X, 0,5% Triton, 5% horse serum, pH 7,4, pendant 30 minutes à température ambiante puis incubées sur la nuit à température ambiante dans une chambre humide avec les anticorps primaires (CD45R/B220, abcam, ab64100, 1/100<sup>e</sup>; CD79B, abcam, ab134147, 1/100<sup>e</sup>; Sybdecane-1 (CD138), abcam, ab128936, 1/100<sup>e</sup>; IgM, abcam, ab97230, 1/100<sup>e</sup>) dilués dans du PBS 1X, 0,5% Triton. Après trois lavages de 10 min dans du PBS 1X, 0,1% Triton. Les coupes ont été incubées avec un anticorps secondaire conjugué à la biotine (anti-mouse : Jackson ImmunoResearch, 715-066-150, 1/500<sup>e</sup> ; anti-goat : Jackson ImmunoResearch, 705-066-147, 1/500<sup>e</sup> ; anti rabbit : Jackson ImmunoResearch, 711-066-152, 1/500<sup>e</sup> ; anti rat : Jackson ImmunoResearch, 712-066-153, 1/500<sup>e</sup>) dilué dans du PBS 1X, 0,1% Triton pendant 1h30 à température ambiante. Les interactions antigène-anticorps ont été révélées avec le kit VECTASTAIN ABC (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) et du DAB

(Sigma 3,3-diaminobenzidine tétrahydrochloride). Les lames ont été séchées puis montées dans de l'Aqua-Poly/Mount (Polyscience, Inc.). Les images des lames en bright field ont été acquises avec un scanner NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu) et le logiciel NDP NanoZoomer Digital Pathology.

## V. Immunophénotypage

### A. Préparation des échantillons

Des souris wild type, C9orf72 KO (CMV Cre et CD11c Cre) et Smcr8 KO ont été sacrifiées par intoxication au CO<sub>2</sub>, puis la rate et les hanches, fémurs, tibias et sternum des souris ont été récupérés dans du PBS 1X 0,5% BSA. A partir de ce moment, toutes les manipulations ont été réalisées sur glace et les centrifugations à 4°C.

Les os ont été broyés dans un mortier rugueux avec 5mL de PBS 1X, 0,5% BSA pour en extraire la moëlle osseuse et les suspensions cellulaires passées sur un filtre 70µm. Deux lavages du mortier ont été réalisés avec 5mL de PBS 1X, 0,5% BSA et le liquide passé sur le filtre 70µm. Les rates ont été écrasées entre les extrémités rugueuses de deux lames de microscope dans 2mL de PBS 1X, 0,5% BSA, et les suspensions cellulaires passées sur un filtre 70µm. De même, deux lavages avec 2mL de PBS 1X, 0,5% BSA ont été réalisés.

Les suspensions de moelle osseuse et de rate ont ensuite été centrifugées 10 min à 1200rpm. Les culots cellulaires ont été repris dans 1mL de chlorure d'ammonium et incubés 3 min à température ambiante pour lyser les érythrocytes. La réaction a été neutralisée par l'ajout de 10mL de PBS 1X, 0,5% BSA. Les échantillons ont été centrifugés 10 min à 1200rpm.

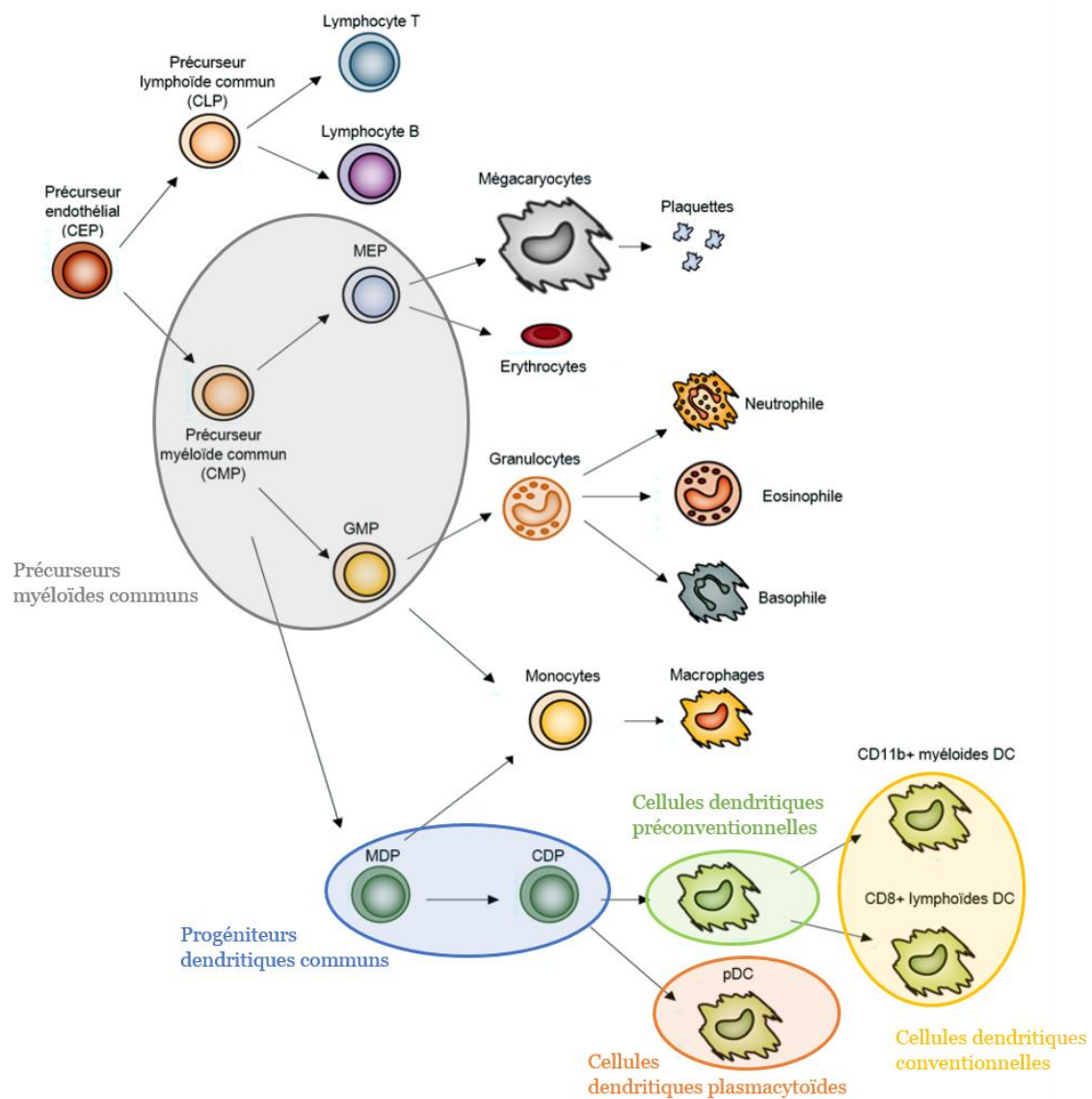
Les culots cellulaires ont été repris dans 1mL de PBS 1X, 0,5% BSA puis les tubes lavés avec 2 x 2mL de PBS 1X, 0,5% BSA pour un volume total de 5mL et les échantillons à nouveau passés sur des filtres 70µm.

Le nombre de cellules dans chaque échantillon a été compté à une dilution de 1/50<sup>ème</sup> dans une solution de Bleu Trypan au 1/50<sup>ème</sup> sur une Cellule de Bauer. Les échantillons ont à nouveau été centrifugés 10 min à 1200rpm puis repris dans 1mL de PBS 1X, 0,5% BSA. 5 millions de cellules de moelle osseuse ont été déposées dans chaque puits d'une plaque 96 puits à fond en U pour procéder aux marquages. Pour la rate, 2 millions de cellules ont été déposées dans les puits.

## B. Marquage extracellulaire

Nous avons étudié les précurseurs myéloïdes communs (représentés par la suite en gris), les précurseurs myéloïdes dendritiques et des progéniteurs dendritiques communs (en bleu), les cellules dendritiques préconventionnelles (en vert), les cellules dendritiques conventionnelles (en jaune) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (en orange) (figure 17).

Les cellules ont été incubées 5 min dans 15µL PBS 1X, 0,5% BSA contenant l'anticorps CD16/32 qui permet de bloquer les liaisons aspécifiques avec les FcR. Pour les conditions où des anticorps couplés à la biotine ont été utilisés, les cellules ont ensuite été incubées 15 min avec ces anticorps dilués au 1/100<sup>e</sup> dans du PBS 1X, 0,5% BSA. Les cellules ont été lavées avec du PBS 1X, 0,5% BSA et centrifugées 2 min à 1200rpm deux fois. Les cellules ont ensuite été incubées 15 min dans du PBS 1X, 0,5% BSA dans lequel ont été dilués les autres anticorps et



**Figure 17 : Immunophénotypage des cellules dendritiques et de leurs précurseurs cellulaires**

Cinq groupes de marquages ont été réalisés : en gris, les précurseurs myéloïdes communs ; en bleu les progéniteurs dendritiques communs ; en vert, les cellules dendritiques pré-conventionnelles ; en jaunes les cellules dendritiques conventionnelles ; en orange, les cellules dendritiques plasmacytoïdes.

l'avidine couplés à des fluorochromes, puis lavées avec du PBS 1X, 0,5% BSA et centrifugées 2 min à 1200rpm deux fois. Les cellules ont finalement été reprises dans 100µL de PBS 1X, 0,5% BSA + 200µL de lavage du puits au PBS 1X, 0,5% BSA, filtrées et transférées dans des tubes 5mL adaptés pour des analyses sur un cytomètre LSR II (BD Biosciences).

Les différents mix d'anticorps utilisés pour les immunophénotypages sont indiqués en Tables 1 à 6.

*Table 8 Marquage Précurseurs Myéloïdes Communs*

| Anticorps             | Clone    | Concentration | Fournisseur | Référence  |
|-----------------------|----------|---------------|-------------|------------|
| <b>CD3-bio</b>        | 145-2C11 | 1/100         | Ebioscience | 13-0031-86 |
| <b>CD4-bio</b>        | GK1.5    | 1/100         | BioLegend   | BLE100404  |
| <b>CD11b-bio</b>      | M1/70.15 | 1/100         | BioLegend   | BLE101204  |
| <b>CD11c-bio</b>      | N418     | 1/100         | Ebioscience | 13-0114-82 |
| <b>CD19-bio</b>       | 1D3      | 1/100         | BioLegend   | BLE115504  |
| <b>B220-bio</b>       | RA3-6B2  | 1/100         | BioLegend   | BLE103204  |
| <b>Gr1-bio</b>        | RB6-8C5  | 1/100         | BioLegend   | BLE108404  |
| <b>CD49b-bio</b>      | GK1.5    | 1/100         | BioLegend   | BLE108904  |
| <b>Ter119-bio</b>     | Ter119   | 1/100         | BioLegend   | BLE116204  |
| <b>CD8-bio</b>        | 53.6.7   | 1/100         | BioLegend   | BLE100704  |
| <b>Sca-1-bio</b>      | D7       | 1/100         | Ebioscience | 13-5981-85 |
| <b>Av-Alexa 405</b>   |          | 1/100         | Invitrogen  | S32351     |
| <b>CD34-PE</b>        | MEC14.7  | 1/100         | BioLegend   | BLE119307  |
| <b>cKit-APC</b>       | 2B8      | 1/100         | BioLegend   | BLE105812  |
| <b>CD16/32-PE-Cy7</b> | 93       | 1/100         | BioLegend   | BLE101318  |

Table 9 Marquage Précurseurs Myéloïdes Dendritiques et des Progéniteurs Dendritiques Communs

| Anticorps           | Clone    | Concentration | Fournisseur | Référence  |
|---------------------|----------|---------------|-------------|------------|
| <b>CD16/32</b>      | 93       | 1/100         | BioLegend   | BLE101302  |
| <b>CD3-bio</b>      | 145-2C11 | 1/100         | Ebioscience | 13-0031-86 |
| <b>CD4-bio</b>      | GK1.5    | 1/100         | BioLegend   | BLE100404  |
| <b>CD11b-bio</b>    | M1/70.15 | 1/100         | BioLegend   | BLE101204  |
| <b>CD19-bio</b>     | 1D3      | 1/100         | BioLegend   | BLE115504  |
| <b>Gr1-bio</b>      | RB6-8C5  | 1/100         | BioLegend   | BLE108404  |
| <b>CD49b-bio</b>    | GK1.5    | 1/100         | BioLegend   | BLE108904  |
| <b>Ter119-bio</b>   | Ter119   | 1/100         | BioLegend   | BLE116204  |
| <b>CD8-bio</b>      | 53.6.7   | 1/100         | BioLegend   | BLE100704  |
| <b>Sca-1-bio</b>    | D7       | 1/100         | Ebioscience | 13-5981-85 |
| <b>Av-Alexa 405</b> |          | 1/100         | Invitrogen  | S32351     |
| <b>Flt3-PE</b>      | A2F10    | 1/100         | Ebioscience | 12-1351-82 |
| <b>cKit-APC-Cy7</b> | 2B8      | 1/100         | BD Pharm    | BLE105826  |
| <b>CD115-APC</b>    | AFS98    | 1/100         | Ebioscience | 17-1152-82 |

Table 10 Marquage Cellules Dendritiques Préconventionnelles

| Anticorps           | Clone       | Concentration | Fournisseur | Référence   |
|---------------------|-------------|---------------|-------------|-------------|
| <b>CD16/32</b>      | 93          | 1/100         | BioLegend   | BLE101302   |
| <b>B220-bio</b>     | RA3-6B2     | 1/100         | BioLegend   | BLE103204   |
| <b>CD3-bio</b>      | 145-2C11    | 1/100         | Ebioscience | 13-0031-86  |
| <b>CD49b-bio</b>    | GK1.5       | 1/100         | BioLegend   | BLE108904   |
| <b>Ter119-bio</b>   | Ter119      | 1/100         | BioLegend   | BLE116204   |
| <b>Av-Alexa 488</b> |             | 1/100         | Invitrogen  | 016-540-084 |
| <b>CD172a-APC</b>   | P84         | 1/100         | BD Pharm    | 560106      |
| <b>CD11c-AF700</b>  | N418        | 1/100         | BD Pharm    | 56-0114-82  |
| <b>MHCII-PE-Cy5</b> | M5/114.15.2 | 1/100         | Ebioscience | 15-5321-82  |
| <b>Flt3-PE</b>      | A2F10       | 1/100         | Ebioscience | 12-1351-82  |

Table 11 Marquage Cellules Dendritiques Conventionnelles

| Anticorps                 | Clone       | Concentration | Fournisseur | Référence  |
|---------------------------|-------------|---------------|-------------|------------|
| <b>CD16/32</b>            | 93          | 1/100         | BioLegend   | BLE101302  |
| <b>CD11c-bio</b>          | HL3         | 1/100         | Ebioscience | 13-0114-82 |
| <b>Av-Alexa Fluor 405</b> |             | 1/100         | Invitrogen  | S32351     |
| <b>CD11b-PE</b>           | M1/70.15    | 1/100         | BD Pharm    | BLE101208  |
| <b>CD8-eFluor780</b>      | 53-6.7      | 1/100         | Ebioscience | 47-0081-82 |
| <b>MHCII-PE-Cy5</b>       | M5/114.15.2 | 1/100         | Ebioscience | 15-5321-82 |
| <b>CD24-eFluor605</b>     | M1/69       | 1/100         | Ebioscience | 93-0242-41 |

Table 12 Marquage Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes

| Anticorps               | Clone    | Concentration | Fournisseur      | Référence  |
|-------------------------|----------|---------------|------------------|------------|
| <b>CD16/32</b>          | 93       | 1/100         | BioLegend        | BLE101302  |
| <b>CD11b-bio</b>        | M1/70.15 | 1/100         | BioLegend        | BLE101204  |
| <b>Av-APC-Cy7</b>       |          | 1/100         | Novus Bioscience | SA1014     |
| <b>SiglecH-PE</b>       | P84      | 1/100         | BD Pharm         | BLE129606  |
| <b>CD11c-APC</b>        | HL3      | 1/100         | BioLegend        | BLE117310  |
| <b>CCR9-PE-Cy7</b>      | CW-1.2   | 1/100         | Ebioscience      | 25-1991-82 |
| <b>120-G8-eFluor450</b> | ebio927  | 1/100         | Ebioscience      | 48-3172-82 |

Table 13 Marquage pour le phénotypage des pDC et cDC

| Condition 1 | Anticorps        | Clone    | Concentration | Fournisseur         | Référence  |
|-------------|------------------|----------|---------------|---------------------|------------|
|             | CD16/32          | 93       | 1/100         | BioLegend           | BLE101302  |
|             | CD11b-bio        | M1/70.15 | 1/100         | BioLegend           | BLE101204  |
|             | Av-APC-Cy7       |          | 1/100         | Novus Bioscience    | SA1014     |
|             | SiglecH-PE       | P84      | 1/100         | BD Pharm            | BLE129606  |
|             | CD11c-APC        | HL3      | 1/100         | BD Pharm            | BLE117310  |
|             | CCR9-PE-Cy7      | CW-1.2   | 1/100         | Ebioscience         | 25-1991-82 |
|             | 120-G8-eFluor450 | ebio927  | 1/100         | Ebioscience         | 48-3172-82 |
|             |                  |          |               |                     |            |
| Condition 2 | Anticorps        | Clone    | Concentration | Fournisseur         | Référence  |
|             | CD16/32          | 93       | 1/100         | BioLegend           | BLE101302  |
|             | CD80-bio         |          | 1/100         | BD Becton Dickinson | 553767     |
|             | Av-APC-Cy7       |          | 1/100         | Novus Bioscience    | SA1014     |
|             | CCR5-PE          |          | 1/100         | BD Becton Dickinson | 559923     |
|             | CD11c-APC        | HL3      | 1/100         | BioLegend           | BLE117310  |
|             | CD86-FITC        |          | 1/100         | Clinisciences       | 11-0862-81 |
|             | 120-G8-eFluor450 | ebio927  | 1/100         | Ebioscience         | 48-3172-82 |
|             |                  |          |               |                     |            |
| Condition 3 | Anticorps        | Clone    | Concentration | Fournisseur         | Référence  |
|             | CD16/32          | 93       | 1/100         | BioLegend           | BLE101302  |
|             | CD9-bio          |          | 1/100         | Biolegend           | BLE124804  |
|             | Av-APC-Cy7       |          | 1/100         | Novus Bioscience    | SA1014     |
|             | Ly49Q-PE         | 2E6      | 1/100         | Clinisciences       | D160-5     |
|             | CD11c-APC        | HL3      | 1/100         | BioLegend           | BLE117310  |
|             | B220-PE-CF594    |          | 1/100         | BD Becton Dickinson | 562313     |
|             | 120-G8-eFluor450 | ebio927  | 1/100         | Ebioscience         | 48-3172-82 |
|             | CD62L-FITC       |          | 1/100         | BD Becton Dickinson | 561917     |

### C. Marquage intracellulaire

En cas de marquage intracellulaire, les cellules mises en plaque 96 puits et précédemment marquées avec des anticorps extracellulaires (CD11c-APC, 1/100<sup>e</sup>, BLE117310, BD Pharm ; B220-PE-Cy7, 1/100<sup>e</sup>, BLE103202, BioLegend ; CD317-Alexa 488, 1/100<sup>e</sup>, 53-3172-82, Ebioscience) ont été incubées 20 min à température ambiante dans du paraformaldéhyde 1X puis lavées dans du tampon de perméabilisation (PBS 1X, 2% FCS, 0,2% NaN<sub>3</sub>, 0,1% Saponine) et centrifugées 2 min à 1200rpm. Les cellules ont ensuite été incubées 30 min avec les anticorps intracellulaires TLR9-PE (1/100<sup>e</sup>, 565640, BD Pharm), TLR7-PE (1/100<sup>e</sup>, MA5-16249, Invitrogen), Isotype mouse IgG1k-PE (1/100<sup>e</sup>, 550617, BD Pharm) ou C9ORF72 (1/25<sup>e</sup>, 1C1, monoclonal souris produit à l'IGBMC) dilués dans du tampon de perméabilisation, lavées une fois avec le tampon de perméabilisation puis avec du PBS 1X, 0,5% BSA et centrifugées 2 min à 1200rpm deux fois. Pour l'anticorps C9ORF72, une nouvelle incubation de 30 minutes avec l'anticorps secondaire anti-mouse IgG-PE (1/100<sup>e</sup>, BD Pharma) a été réalisée, suivie de deux étapes de lavages. Les cellules ont finalement été reprises dans 100µL de PBS 1X, 0,5% BSA + 200µL de lavage du puits au PBS 1X, 0,5% BSA, filtrées et transférées dans des tubes 5mL adaptés pour être analysées sur un cytomètre LSR II (BD Biosciences).

## VI. Cultures de BMpDC

### A. Préparation des échantillons

Des souris wild type et C9orf72 KO (CMV Cre et CD11c Cre) ont été sacrifiées par intoxication au CO<sub>2</sub>, puis la rate et les hanches, fémurs, tibias et sternum des souris ont été

récupérés dans du milieu de préparation (RPMI 1640, 10% inactivated FCS, 25mM Hepes, 1% Pénicilline/Streptomycine/Gentamycine). A partir de ce moment, toutes les manipulations ont été réalisées en milieu stérile et à température ambiante.

Les os ont été broyés dans un mortier rugueux avec 5mL de milieu de préparation pour en extraire la moelle osseuse et les suspensions cellulaires passées sur un filtre 70µm. Deux lavages du mortier ont été réalisés avec 5mL de milieu de préparation et le liquide passé sur le filtre 70µm. Les suspensions de moelle osseuse ont ensuite été centrifugées 10 min à 1200rpm. Les culots cellulaires ont été repris dans 1mL de chlorure d'ammonium et incubés 3 min à température ambiante pour lyser les érythrocytes. La réaction a été neutralisée par l'ajout de 10mL de milieu de préparation. Les échantillons ont été centrifugés 10 min à 1200rpm. Les culots cellulaires ont été repris dans 1mL de milieu de préparation auquel ont été ajoutés 2,5µg de Fungizone et incubés 10 minutes. Les échantillons ont ensuite à nouveau été centrifugés 10 min à 1200rpm. Les culots cellulaires ont été repris dans 1mL de milieu de préparation puis les tubes ont été lavés avec 2 x 2mL de milieu de culture (RPMI 1640, 10% inactivated FCS, 20mM Hepes, 1% Pénicilline/Streptomycine/Gentamycine, 2mM Pyruvate de Sodium, 2mM L-Glutamine, Minimum Essential Medium 1X, 0,05mM β-mercapto-éthanol) pour un volume total de 5mL et les échantillons ont été à nouveau passés sur des filtres 70µm.

Le nombre de cellules dans chaque échantillon a été compté à une dilution de 1/50<sup>ème</sup> dans une solution de Bleu Trypan au 1/50<sup>ème</sup> sur une Cellule de Bauer.

## B. Mise en culture et différenciation en BMpDC

50µL de milieu contenant du Flt3 ligand (BL6/Flt3L) ont été ajoutés au milieu de culture. 50 millions de cellules ont été déposés dans une plaque de culture de diamètre 10cm et du milieu de culture a été ajouté jusqu'à obtenir un volume final de 25mL, pour obtenir une culture avec une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Les plaques Ø10cm ont ensuite été placées en incubateur à 37,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> pendant quatre jours.

Après quatre jours, les milieux de culture de chaque plaque Ø10cm ont été récupérés et centrifugés à température ambiante 10 min à 1200rpm. Les culots cellulaires ont été repris dans 25mL de milieu de culture supplémenté en Flt3L, et replacés dans les plaques Ø10cm. Les plaques ont ensuite été placées en incubateur à 37,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> pendant quatre jours.

## C. Tri des cellules mises en culture

Les cellules des plaques Ø10cm ont été récupérées et transférées dans un tube Falcon® 50mL, puis la plaque a été lavée avec 25mL de milieu de préparation. Les étapes suivantes ont été réalisées sur glace et les centrifugations à 4°C. Les cellules ont été centrifugées 10 min à 1200rpm puis reprises dans 3mL de milieu de préparation. Le nombre de cellules dans chaque échantillon a été compté à une dilution de 1/50<sup>ème</sup> dans une solution de Bleu Trypan au 1/50<sup>ème</sup> sur une Cellule de Bauer. Les cellules ont à nouveau été centrifugées 10 min à 1200rpm puis reprises à une concentration de 50 millions de cellules/mL dans du milieu de préparation pour procéder au marquage des pDCs avec les anticorps suivants dilués au 1/100<sup>e</sup> : CD317-FITC (127008, BioLegends), CD11c-APC (117310, BioLegends) et CD11b-PE

(101208, BioLegends). Les échantillons ont été incubés 15 min avec les anticorps puis lavés avec 10mL de PBS 1X, 0,5% de BSA et centrifugés 10 min à 1200rpm. Les culots cellulaires ont ensuite été repris dans 2 x 1mL de PBS 1X, 0,5% de BSA et passés sur un filtre 70µm. 2µL de DAPI (1µg/µL) ont été ajoutés aux échantillons avant d'être triés avec un FACS ARIA FUSION (BD Biosciences). Les BMpDC sont récupérées dans des tubes eppendorf à 4°C contenant le même milieu que lors de la culture.

#### D. Induction des BMpDC

Une fois triées, un nombre identique de BMpDC est placé dans des tubes eppendorf pour chaque échantillon, nombre correspondant à la quantité limitante de BMpDC recueillies lors de l'expérience. Les tubes sont centrifugés 10 min à 1200rpm à température ambiante et les culots cellulaires repris dans 180µL de milieu de culture. 45µL de milieu contenant des cellules ont été placés dans les puits d'une plaque 96 puits à fond plat. 45µL de milieu de culture ont été ajoutés à chaque puits, dans lesquels ont été rajoutés 2,5µM de CpG (ODN 1585, Invivogen tlr1-1585), de contrôle négatif (ODN 1585 control, Invivogen, tlr1-1585c) ou 1µg/mL d'imiquimod (R837, Invivogen, tlr1-imqs). Les cellules ont été laissées en incubation à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> pendant 16h. Les cellules sont ensuite récupérées en tubes eppendorf et centrifugées 10 min à 1200rpm.

## VII.Extraction d'ARN

Les extractions d'ARN ont été réalisées avec le kit Macherey-Nagel XS RNA extraction, conformément aux instructions données dans le protocole fourni par Macherey-Nagel. Les quantités d'ARN obtenues ont été dosées par Nanodrop et les ARN stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

## VIII. RTqPCR

Les reverse transcriptions ont été réalisées sur 100ng d'ARN en raison des petites quantités d'ARN récupérées lors des extractions. A ces 100ng d'ARN ont été ajoutés 2µL de random primer N7 à 0,2µg/µL et de l'eau pour un volume final de 13µL dans un eppendorf. Les tubes ont été incubés 10 min à 65°C. Y ont ensuite été ajoutés du tampon pour reverse transcriptase 1X (Roche), du dNTP 2mM et 20U de reverse transcriptase (Roche) pour un volume total de 20µL. Les tubes ont ensuite été incubés 10 min à 25°C, 30 min à 55°C et 5 min à 85°C. L'ADNc obtenu a été conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Les quantifications par qPCR ont été réalisées avec du SybrGreen master mix (Roche) selon les indications du fournisseur et 3µM de chaque primer selon les programmes indiqués pour chaque couple de primers ci-dessous . Les qPCR ont été réalisées sur des triplicats d'ADNc avec un Light-Cycler 480 (Roche). L'expression relative des différents gènes a été calculée en utilisant l'ubiquitine comme gène de référence et la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Les primers utilisés pour réaliser les qPCR ainsi que les programmes utilisés avec le Light-Cycler sont en Table 7.

Table 14 Primers et protocole Light-Cycler utilisés pour les qPCR

|                   | Primers                                                                                 | Dénaturation  | Nb cycles | Dénaturation | Hybridation | Elongation  |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------|--------------|-------------|-------------|
| <b>C9ORF72</b>    | Sens:<br>5'-ATGGAGCTGCTTGCATCTATG-3'<br>Antisens:<br>5'-AAGCCTTCGTGACAGCTGTCACC-3'      | 95°C<br>10min | 50        | 95°C<br>10s  | 58°C<br>15s | 72°C<br>20s |
| <b>IFN</b>        | Sens:<br>5'-CCTGCTGGCTGTGAGGAAATA-3'<br>Antisens:<br>5'-GCACAGGGGGCTGTGTTTCT-3'         | 95°C<br>15min | 50        | 95°C<br>10s  | 66°C<br>30s | 72°C<br>15s |
| <b>Ubiquitine</b> | Sens:<br>5'-TGGCTATTAATTATTCGGTCTGCAT-3'<br>Antisens:<br>5'-GCAAGTGGCTAGAGTGCAGAGTAA-3' | 95°C<br>10min | 50        | 95°C<br>10s  | 58°C<br>15s | 72°C<br>20s |

## IX. Cultures cellulaires

Les cellules GT1.7, qui sont des cellules immortalisées à partir de neurones hypothalamiques de souris, ont été cultivées dans des flasques T75 à 37,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> avec 20mL de milieu DMEM 4,5g/L glucose supplémenté avec 10% FCS 96 et 1% Pénicilline/Streptomycine.

## X. Protocole de transfection

Pour les immunofluorescences, des lamelles rondes en verre de diamètre 14mm ont été incubées 2h dans 400µL de poly-L-lysine (P-9155, Sigma Chimie) à 37°C, puis lavées à l'eau, séchées et placées dans les puits d'une plaque de culture 24 puits. 1µL de siARN luciférase ou de siARN dirigé contre *Smcr8* (100µM) sont placés dans 100µL d'OPTI-MEM (Life Technologie), auxquels

sont ajoutés 5,5µL de lipofectamine® 2000 (Invitrogen) pour les cellules GT1.7. Les tubes ont été incubés 10 min à température ambiante et leur contenu ensuite déposé goutte à goutte dans les 500µL de milieu de transfection (DMEM 4,5g/L glucose avec 0.1% FCS) par puits d'une plaque 24 puits contenant  $3 \times 10^5$  neurones d'embryons de souris ou  $1 \times 10^5$  de cellules GT1.7. Les plaques ont été placées 24h à 37,5°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

## XI. Co-Immunofluorescence

Les lamelles sur lesquelles sont attachées les cellules ont été incubées 10min dans du PBS 1X contenant 4% de paraformaldéhyde, lavées avec du PBS puis incubées 10min dans du PBS 1X contenant 0,5% de Triton 100X. Les lamelles ont alors été lavées trois fois avec du PBS 1X puis incubées une heure avec l'anticorps primaire contre P62/Sqstm1 (1/100<sup>ème</sup>, ab56416, Abcam). Après deux lavages au PBS 1X, les lamelles ont été incubées avec l'anticorps secondaire Donkey anti-mouse conjugué au Cy3 (1/500<sup>ème</sup>, 715-165-150, Interchim SA) pendant 1h. Les lamelles ont été à nouveau lavées au PBS 1h, incubées 2min dans du PBS 1x, DAPI (0,1µg/mL), rincées au PBS avant d'être montées sur lames dans du Prolong (Molecular Probes) et examinées au microscope à épifluorescence.

## XII. Isolation cellulaire par billes magnétiques

Des souris wild type et C9orf72 loxP/loxP x CMV Cre ont été sacrifiées afin d'isoler les lymphocytes T, lymphocytes B, macrophages et cellules dendritiques. Pour récupérer les macrophages, le péritoine des animaux a été exposé en décollant la peau de l'abdomen et

5mL de PBS 1X ont été introduits à l'aide d'une seringue dans la cavité abdominale. Le péritoine a été massé afin de décoller les macrophages y étant accrochés et le PBS 1X a été récupéré par une aspiration délicate du liquide de la cavité abdominale en évitant les organes. Les lymphocytes et les cellules dendritiques ont été récupérés à partir de la rate des animaux. Les rates ont été écrasées entre les extrémités rugueuses de deux lames de microscope dans 2mL de PBS 1X, 0,5% BSA, et les suspensions cellulaires passées sur un filtre 70µm, suivi de deux lavages avec 2mL de PBS 1X, 0,5% BSA. Les cellules dendritiques ont été récupérées avec le kit CD11c microbeads (Miltenyi Biotec, 130-108-338), les lymphocytes T avec le kit Pan T cell Isolation (Miltenyi Biotec, 130-095-130), les lymphocytes B avec le kit CD19 microbeads (Miltenyi Biotec, 130-052-201) et les macrophages avec le kit Macrophages Isolation (Miltenyi Biotec 130-110-434), selon les indications fournies dans les protocoles pour chaque kit.

### XIII. Immunoblots

Les immunoblots ont été réalisés sur 10µg d'extraits protéiques issus d'organes de souris ou de cultures cellulaires lysés dans du tampon de lyse (10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0,5mM EDTA, 0,5% NP-40) 30min et centrifugés 15min à 13000rpm à 4°C. La concentration protéique des surnageants a été dosée par test de Bradford (Bio-Rad, Protein Assay Dye Reagent Concentrate) et 10µg de protéines ont été séparés par SDS-PAGE (Invitrogen Life Technologies, NuPage 4-12% ou 12% Bis-Tri Gel) et transférés sur des membranes de nitrocellulose (GE Healthcare Life Sciences, Protan Nitrocellulose 0,45 µm) en suivant les protocoles standards. Les membranes ont été saturées avec 5% de lait écrémé dans du TBS-T 0,1% (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20) pendant 1h. Les membranes ont

été ensuite incubées à 4°C pendant la nuit avec l'anticorps primaire (SMCR8, 1/200<sup>ème</sup>, 1D2 ; C9ORF72, 1/1000<sup>ème</sup>, 22637-1-AP, ProteinTech ; C9ORF72, 1/1000<sup>ème</sup>, GT779, Genetex ; GAPDH, 1/1000<sup>ème</sup>, sc-32233, SantaCruz Biotechnology ;  $\beta$ -actin, 1/1000<sup>ème</sup>, ab8224, Abcam ; p62, 1/1000<sup>ème</sup>, Ab56416, Abcam ; Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ , 1/1000<sup>ème</sup>, 2859, Cell Signaling ; NF- $\kappa$ B p65, 1/1000<sup>ème</sup>, 8242, Cell Signaling ; Phospho NF- $\kappa$ B (Ser536), 1/1000<sup>ème</sup>3033, Cell Signaling ; TBK1, 1/1000<sup>ème</sup> ; 3013, Cell Signaling ; AIM2, 1/500<sup>ème</sup>, sc-137967, Santa Cruz Biotechnology ; ASC, 1/500<sup>ème</sup>, AG-25B-0006, AdipoGen ; LC3B, 1/1000<sup>ème</sup>, ab51520, Abcam ; Traf3, 1/500<sup>ème</sup>, 4729, Cell Signaling ; Traf6, 1/1000<sup>ème</sup>, ab33915, Abcam ; TLR9, 1/1000<sup>ème</sup>, ab52967, Abcam) dans du TBS-T 0,1% à 5% de lait écrémé. Après 3 lavages de 20 min dans du TBS-T 0,1%, les membranes ont été incubées 45min avec l'anticorps secondaire conjugué à la horseradish peroxydase (Anti-mouse : 7076, Cell Signaling ; Anti-rabbit : 70784, Cell Signaling) dilué au 1/3000<sup>ème</sup> dans du TBS-T 0,1%. Après 3 lavages de 20min dans du TBS-T 0,1%, les membranes ont été révélées par une incubation de quelques secondes dans le révélateur chemiluminescent (Substrat HRP Immobilon Western, Millipore) puis visualisées avec un Imager 600 (Life Sciences).

# **RESULTATS**

## **Partie 1**

**Caractérisation des fonctions  
moléculaires et cellulaires de C9ORF72**

# RESULTATS PARTIE 1

## Caractérisation des fonctions moléculaires et cellulaires de C9ORF72

Une expansion de répétitions des nucléotides GGGGCC dans le gène *C9ORF72* est la cause principale de SLA et de DFT. Comme ces répétitions conduisent à une diminution partielle de l'expression de la protéine C9ORF72, nous avons cherché à identifier les fonctions moléculaires et cellulaires de cette protéine. Avec l'aide du Dr. Chantal Sellier, nous avons montré par des expériences d'immunoprécipitation suivies d'analyse par spectrométrie de masse que la protéine C9ORF72 forme un complexe stable avec deux autres protéines SMCR8 et WDR41. De plus, ce complexe interagit avec diverses Rab GTPases, notamment Rab8a et Rab39b, qui sont impliquées dans l'autophagie. Nous avons alors montré qu'une diminution d'expression de C9ORF72 par siARN dans des cellules neuronales conduisait à une autophagie sous optimale. Toutefois, la diminution d'expression de C9ORF72 ne conduit pas à elle seule à la mort neuronale, mais sensibilise les neurones à un second stress. Ainsi, la diminution d'expression de C9ORF72 dans des cultures de neurones de souris favorise l'accumulation et la toxicité de protéines ayant tendance à s'agréger et qui doivent donc être éliminées par autophagie, comme l'Ataxine 2 mutée qui présente une expansion de polyglutamines. Ces résultats ont été confirmés dans le poisson zèbre par l'équipe du Dr. Edor Kabashi, et ont conduit à une publication dont je suis co-auteur (Sellier *et al.*, 2016). Nous nous sommes alors demandé quelles pouvaient être les conséquences de la perte d'expression de la protéine C9orf72 *in vivo*, et avons par conséquent généré un modèle murin knock out pour ce gène. La

description du phénotype de ce modèle murin a constitué la majeure partie de ma thèse et est décrite dans la partie 2 des Résultats.

# Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death

Chantal Sellier<sup>1,\*</sup>, Maria-Letizia Campanari<sup>2</sup>, Camille Julie Corbier<sup>1</sup>, Angeline Gaucherot<sup>1</sup>, Isabelle Kolb-Cheyne<sup>1</sup>, Mustapha Oulad-Abdelghani<sup>1</sup>, Frank Ruffenach<sup>1</sup>, Adeline Page<sup>1</sup>, Sorana Ciura<sup>2</sup>, Edor Kabashi<sup>2</sup> & Nicolas Charlet-Berguerand<sup>1,\*\*</sup>

## Abstract

An intronic expansion of GGGGCC repeats within the C9ORF72 gene is the most common genetic cause of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia (ALS-FTD). Ataxin-2 with intermediate length of polyglutamine expansions (Ataxin-2 Q30x) is a genetic modifier of the disease. Here, we found that C9ORF72 forms a complex with the WDR41 and SMCR8 proteins to act as a GDP/GTP exchange factor for RAB8a and RAB39b and to thereby control autophagic flux. Depletion of C9orf72 in neurons partly impairs autophagy and leads to accumulation of aggregates of TDP-43 and P62 proteins, which are histopathological hallmarks of ALS-FTD. SMCR8 is phosphorylated by TBK1 and depletion of TBK1 can be rescued by phosphomimetic mutants of SMCR8 or by constitutively active RAB39b, suggesting that TBK1, SMCR8, C9ORF72, and RAB39b belong to a common pathway regulating autophagy. While depletion of C9ORF72 only has a partial deleterious effect on neuron survival, it synergizes with Ataxin-2 Q30x toxicity to induce motor neuron dysfunction and neuronal cell death. These results indicate that partial loss of function of C9ORF72 is not deleterious by itself but synergizes with Ataxin-2 toxicity, suggesting a double-hit pathological mechanism in ALS-FTD.

**Keywords** C9ORF72; autophagy; neurodegeneration; ALS-FTD

**Subject Categories** Neuroscience

**DOI** 10.15252/embj.201593350 | Received 23 October 2015 | Revised 14 March 2016 | Accepted 15 March 2016

## Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a motor neuron degenerative disease, and frontotemporal dementia (FTD), a presenile dementia affecting frontal and temporal brain regions, share clinical, genetic,

and pathological overlap and are now considered in some cases as manifestations of a similar disease continuum (Lomen-Hoerth *et al*, 2002; Ringholz *et al*, 2005; Neumann *et al*, 2006). A notion that is emphasized by the identification of expanded GGGGCC repeats within the first intron of the C9ORF72 gene as the most common inherited cause for both ALS and FTD (DeJesus-Hernandez *et al*, 2011; Renton *et al*, 2011; Gijselinck *et al*, 2012; Majounie *et al*, 2012).

Three non-exclusive mechanisms by which expanded GGGGCC repeats cause neuron degeneration have been proposed. First, sense and antisense transcripts containing expanded GGGGCC repeats accumulate in nuclear RNA aggregates, which recruit specific RNA-binding proteins, thereby potentially inhibiting their functions (Almeida *et al*, 2013; Donnelly *et al*, 2013; Lagier-Tourenne *et al*, 2013; Mizielinska *et al*, 2013). Various proteins have been reported to bind to GGGGCC RNA repeats, but their roles in pathogenesis are, yet, to be determined (Lee *et al*, 2013; Mori *et al*, 2013a; Cooper-Knock *et al*, 2014; Haeusler *et al*, 2014). The second potential mechanism for neurotoxicity of CCGGGG expansions is a form of non-canonical protein translation termed repeat-associated non-ATG (RAN) translation (Zu *et al*, 2013). Indeed, expanded GGGGCC repeats are RAN-translated in all six sense and antisense frames, resulting in expression of five different dipeptide repeats containing proteins (DPRs or DRPs, also named C9RANT), which form inclusions throughout the brain of patients with C9-ALS/FTD (Ash *et al*, 2013; Gendron *et al*, 2013; Mori *et al*, 2013b; Zu *et al*, 2013), as well as in mice expressing expanded CCGGGG repeats (Chew *et al*, 2015; O'Rourke *et al*, 2015; Peters *et al*, 2015). These DPRs were recently shown to be toxic in neuronal cell cultures and in *Drosophila* models through alteration of the nucleocytoplasmic transport (Kwon *et al*, 2014; May *et al*, 2014; Mizielinska *et al*, 2014; Wen *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2014, 2015; Freibaum *et al*, 2015; Jovičić *et al*, 2015; Tao *et al*, 2015). Third, decreased expression of C9ORF72 mRNA expression levels in C9-ALS/FTD patients (DeJesus-Hernandez *et al*, 2011; Gijselinck *et al*, 2012; Almeida

1 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U964, CNRS UMR7104, Strasbourg University, Illkirch, France

2 Sorbonne Université, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Université de Paris 06, Unité Mixte 75, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 1127, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unité Mixte de Recherche 7225, Institut du Cerveau et de la Moelle Épinrière (ICM), 75013 Paris, France

\*Corresponding author. Tel: +33 388 653 309; Fax: +33 388 653 201; E-mail: sellier@igbmc.fr

\*\*Corresponding author. Tel: +33 388 653 309; Fax: +33 388 653 201; E-mail: ncharlet@igbmc.fr

*et al*, 2013; Waite *et al*, 2014; van Blitterswijk *et al*, 2015), as well as motor deficit caused by knockdown of *C9orf72* in zebrafish (Ciura *et al*, 2013), suggests that haploinsufficiency of C9ORF72 may participate in neuronal degeneration. However, the absence of neuronal phenotypes in mouse depleted of *C9orf72* expression in brain or in neurons (Lagier-Tourenne *et al*, 2013; Koppers *et al*, 2015), as well as the absence of ALS/FTD patients with null alleles or missense mutations in *C9ORF72*, strongly argues against a sole loss of function of C9ORF72 as the cause of ALS-FTD.

Despite these advances, little is known about the normal molecular and cellular functions of C9ORF72. Bioinformatics analysis predicts that C9ORF72 contains DENN (Differentially Expressed in Normal and Neoplastic cells) domains characteristic of Rab GDP/GTP exchange factors (GEFs) (Levine *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2012). Rab GTPases are monomeric guanine nucleotide-binding proteins that switch between two conformational states, an inactive form bound to GDP and an active form bound to GTP. GEF proteins catalyze the conversion of Rab proteins from GDP-bound to GTP-bound form, thereby activating Rab functions. Rab GTPases regulate many steps of membrane traffic, including vesicle formation, vesicle movement, and membrane fusion. Consistent with a function of C9ORF72 as a GEF protein, C9ORF72 was reported to interact with Rab1, Rab5, Rab7, and Rab11 and its depletions leads to endocytosis and autophagy dysfunctions (Farg *et al*, 2014).

Macroautophagy, named autophagy thereafter, is a catabolic process that engulfs cytoplasmic constituents within a double-membrane vesicle named autophagosome, which is directed to the lysosome for degradation and recycling. Hence, autophagy plays an essential role in homeostasis by providing energy and recycling cellular components, but also by facilitating lysosomal degradation of intracellular pathogens, defective organelles, and aggregates of misfolded proteins. In that aspect, autophagy is crucial for normal brain function (Hara *et al*, 2006; Komatsu *et al*, 2006), and autophagy dysfunction has been reported in various neurodegenerative diseases, including Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases, as well as ALS and FTD (review in Wong & Cuervo, 2010; Nixon, 2013).

A better comprehension of C9ORF72 functions is essential to understand its possible implication in ALS-FTD. Here, we found that C9ORF72 forms a complex with WDR41 and SMCR8, a DENN protein previously identified within the interactome of autophagy (Behrends *et al*, 2010). We found that the complex formed by C9ORF72, SMCR8, and WDR41 interacts and acts as a GDP/GTP exchange factor for RAB8a and RAB39b, which are Rab GTPases involved in vesicle trafficking and autophagy (Pilli *et al*, 2012; Seto *et al*, 2013; Sato *et al*, 2014).

Next, we found that decreased expression of C9ORF72 partly inhibits autophagy and leads to accumulation of cytoplasmic aggregates of P62/SQSTM1 and of TDP-43, thus recapitulating two histopathological hallmarks of ALS-FTD patients (Neumann *et al*, 2006; Al-Sarraj *et al*, 2011). Also, SMCR8, but not C9ORF72 or WDR41, is phosphorylated by ULK1 or TBK1, which are kinases regulating autophagy (Chan *et al*, 2007; Hara *et al*, 2008; Thurston *et al*, 2009; Wild *et al*, 2011; Pilli *et al*, 2012; Matsumoto *et al*, 2015; Heo *et al*, 2015; Lazarou *et al*, 2015). Importantly, either a mutant of SMCR8 mimicking a constitutive TBK1-dependent phosphorylation or a constitutively active mutant of RAB39b that does not require GEF activity can correct alteration of autophagy caused

by depletion of TBK1 or C9ORF72. These results suggest that TBK1, C9ORF72 complex, and RAB39b belong to a common pathway regulating autophagy in neurons.

Finally, we found that decreased expression of C9ORF72 potentiates the aggregation and toxicity of Ataxin-2 with intermediate length of polyglutamine expansions (Ataxin-2 Q30x) but not of Ataxin-2 with normal polyQ length (Ataxin-2 Q22x). This is relevant as intermediate size of polyglutamine expansions in Ataxin-2 is a genetic modifier of ALS-FTD (Elden *et al*, 2010; Daoud *et al*, 2011; Ross *et al*, 2011; Van Damme *et al*, 2011; Lattante *et al*, 2014).

In conclusion, these results provide a molecular and cellular function for C9ORF72 as a GEF protein regulating autophagy, but also support a double-hit mechanism in ALS-FTD, where the sole haploinsufficiency of *C9ORF72* might not be sufficient to cause neuronal cell death but may synergize the neurodegeneration caused by accumulation of toxic proteins, including Ataxin-2 with intermediate polyQ length.

## Results

### C9ORF72 forms a complex with the WDR41 and SMCR8 proteins

To better characterize the function of C9ORF72, we performed a proteomic analysis to identify potential interactants of C9ORF72. Of technical interest, transfection of Flag-tagged human C9ORF72 cDNA resulted in low expression of C9ORF72 protein. Bioinformatics analysis indicated that mRNA sequences of human or mouse *C9ORF72* present an excess of rare codons and negative RNA *cis* element that would impair expression of C9ORF72. Thus, we cloned an optimized sequence of human *C9ORF72* cDNA expressing the exact same amino acid sequence, but in which codon usage was optimized and negative RNA *cis* elements were removed. Neuronal N2A mouse cells were transfected with HA-Flag-tagged optimized C9ORF72 and tandem-tag purification followed by nano-LC-MS/MS analysis identified various proteins, including Rab8a, Rab39b, Smcr8, Wdr41, P62, Hsc70, Hsp90, and Bag3 (Fig 1A and Table EV1). Bioinformatics analysis of this putative C9ORF72 interactome using the DAVID database (NIAID, NIH) predicted a potential association with ALS disease ( $P$ -value of  $4.3 \times 10^{-2}$ ), and analysis of KEGG, GO, and Reactome biological pathways using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, Broad institute) revealed significant enrichment for adaptive immune system (FDR  $q$ -value,  $2.6 \times 10^{-6}$ ), activation of NF- $\kappa$ B (FDR  $q$ -value,  $9.8 \times 10^{-5}$ ), formation of phagosome and autophagosome (FDR  $q$ -values of  $8.8 \times 10^{-5}$  and  $1.4 \times 10^{-4}$ , respectively), vesicle-mediated transport (FDR  $q$ -value,  $6.7 \times 10^{-3}$ ), and proteasome (FDR  $q$ -value,  $6.3 \times 10^{-3}$ ).

Western blotting on tandem-tag-purified proteins confirmed association of endogenous Rab8a, Rab39b, Smcr8, Wdr41, P62, Hsc70, and Bag3 with transfected HA-Flag-tagged C9ORF72 (Fig EV1A). RAB8 and RAB39 are Rab GTPases involved in vesicle trafficking and autophagy (Pilli *et al*, 2012; Seto *et al*, 2013; Sato *et al*, 2014). WDR41 is a 52-kDa protein of unknown function that contains a protein–protein interaction domain consisting of six WD40 repeats. Smith–Magenis syndrome chromosome region candidate 8 (SMCR8) is a 105-kDa protein that, similar to C9ORF72, contains a divergent Differentially Expressed in Normal and Neoplasia (DENN) domain (Zhang *et al*, 2012; Levine *et al*, 2013). Interestingly, SMCR8 has

**Figure 1. C9ORF72 in complex with SMCR8 and WDR41 is a GEF for RAB8 and RAB39.**

- A Silver staining of proteins extracted from N2A mouse neuronal cells expressing Flag-HA-tagged C9ORF72 and captured through consecutive anti-Flag and anti-HA affinity purification steps.
- B Immunoblot analysis of HA-immunoprecipitated proteins and lysate of HEK293 cells co-expressing HA-tagged C9ORF72 and/or Flag-tagged SMCR8 and/or Flag-tagged WDR41.
- C Coomassie blue staining of Nickel-NTA affinity purification of HIS-C9ORF72, SMCR8, and WDR41 co-expressed in baculovirus-infected insect cells.
- D Immunoblot analysis of HA-immunoprecipitated proteins and lysate of HEK293 cells co-expressing HA-tagged C9ORF72 and HA-tagged SMCR8 with various Flag-tagged Rab GTPases.
- E Immunoblot against endogenous C9orf72, Wdr41, Rab8a, Rab39b, Rab5, and Rab7 of control (IgG alone) or endogenous Smcr8 immunoprecipitated from adult mouse brain.
- F  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-radiolabelled GDP release from GST-tagged purified RAB8a as a function of increased concentration of either recombinant purified C9ORF72 alone or in complex with SMCR8 and WDR41.
- G Identical GDP release assay as in (F) but using recombinant purified GST-tagged RAB39b instead of RAB8a.
- H Schematic representation of the C9ORF72 complex acting as a Rab-guanine nucleotide exchange factor.

Data information: Error bars indicate SEM. Experiments were repeated 3 times ( $n = 3$ ).

Source data are available online for this figure.

been found to interact with the ULK1 kinase complex, which initiates autophagy (Behrends *et al*, 2010). P62, encoded by the *SQSTM1* gene, binds to poly-ubiquitinated proteins and targets these proteins for autophagy degradation. Finally, HSC70, encoded by the *HSPA8* gene, is a constitutively expressed heat-shock protein that among various functions interacts with BAG3 (BCL2-associated athanogene 3) and the ubiquitin ligase STUB1 (also known as CHIP) to initiate aggrephagy, also named chaperone-assisted selective autophagy (CASA), which is the selective autophagy of chaperone-bound misfolded or aggregated proteins (Gamerding *et al*, 2009; Arndt *et al*, 2010). In contrast, we found no interaction of C9ORF72 with other putative candidates identified by proteomic analysis, such as Senataxin, TDP-43, IQGAP, and the proteasome proteins PSMD4, PSMD8, PSMD10, while some other proteins were not tested (DCTN, NSF, SNX, STX17, VPS16, SEC22, etc.).

Next, we confirmed by cell transfection and co-immunoprecipitation experiments that HA-tagged C9ORF72 interacts with Flag-tagged SMCR8 and that the presence of both SMCR8 and C9ORF72 is required to recruit Flag-tagged WDR41 (Fig 1B). The association of C9ORF72 with SMCR8 and WDR41 is direct since HIS-tagged C9ORF72 was able to pull down both recombinant SMCR8 and WDR41 expressed in baculovirus-infected insect cells (Fig 1C). Of technical interest, we noted that the interaction of C9ORF72 with SMCR8 stabilizes and increases expression of both C9ORF72 and SMCR8. C9ORF72 also encodes a putative shorter splicing form of ~30 kDa, but co-immunoprecipitation assays demonstrated that this putative short C9ORF72 isoform does not interact with SMCR8 or WDR41 (Fig EV1B). Co-immunoprecipitation experiments also indicated that C9ORF72 and SMCR8 bind to HSC70, but not to BAG3 (Fig EV1C), suggesting that BAG3 recruitment is not direct but mediated by HSC70. Whether C9ORF72 is a client or a regulator of the HSC70 and BAG3 pathway remains to be determined.

#### **C9ORF72 in complex with SMCR8 and WDR41 interacts with RAB8a and RAB39b**

Proteomic analysis revealed association of C9ORF72 with Rab8a and Rab39b (Fig EV1A). However, C9ORF72 was reported to interact with Rab1, Rab5, Rab7, and Rab11 (Farg *et al*, 2014). Since our proteomic analysis was performed using Neuro-2A cell lysate that may incompletely represent the proteomic complexity of a tissue, we tested the association of C9ORF72 with various other Rab

GTPases. Among the Rab proteins tested, we confirmed that the C9ORF72 complex interacts with RAB8a and weakly with RAB39b, as well as, but in a lesser extent, with their paralogs RAB8b and RAB39a (Fig 1D). Of interest, RAB8 is involved in a *Drosophila* model of FTD (West *et al*, 2015) and interacts with OPTN and TBK1 that are mutated in ALS (Maruyama *et al*, 2010; Cirulli *et al*, 2015; Freischmidt *et al*, 2015). Also, mutations in the X-linked *RAB39b* gene lead to intellectual disability associated with autism, epilepsy, and early-onset parkinsonism (Giannandrea *et al*, 2010; Wilson *et al*, 2014). Among other Rab tested, the C9ORF72 complex presents also some weak interaction with RAB6a, RAB12, RAB25, RAB33a, and RAB38 (Fig 1D). In contrast, C9ORF72 alone or in complex with SMCR8 present no or very little interaction with RAB1, RAB5, RAB7, and RAB11 (Fig 1D). Similarly, we found no interaction of RAGA/D or RALB GTPases with C9ORF72 alone or in complex with SMCR8. Of technical interest, co-transfection of WDR41 abolished expression of various Rab cDNAs; thus, co-immunoprecipitations were performed with the C9ORF72 and SMCR8 proteins (Fig 1D). Interactions between RAB8a or RAB39b and the C9ORF72, SMCR8, and WDR41 complex were not inhibited by mutations locking Rab proteins in a constitutive GDP-bound inactive or a constitutively GTP-bound active form. Further co-immunoprecipitation assays indicated that the interaction between C9ORF72 complex and RAB8a or RAB39b is mainly dependent on the presence of SMCR8 since C9ORF72 or WDR41 alone immunoprecipitated little RAB8a or no RAB39b (Fig EV1D). In that aspect, SMCR8 expressed alone immunoprecipitated RAB8a and RAB39b but also some other Rab GTPases, including RAB24, RAB32, and RAB7L1, which is also known as RAB29 (Fig EV1E). These interactions were lost when SMCR8 was in complex with C9ORF72, suggesting that the specificity of SMCR8 toward Rab GTPase proteins may change according to the SMCR8 partners.

Since these experiments were performed in transfected cells, we next tested whether the endogenous C9ORF72 complex may immunoprecipitate endogenous RAB8a and RAB39b. Taking advantage of the recombinant HIS-tagged C9ORF72, SMCR8, and WDR41 complex purified from baculovirus-infected insect cells, we immunized mice, but failed to obtain antibodies specific to C9ORF72 despite many attempts. In contrast, we successfully developed a monoclonal antibody (1D2) against SMCR8. Immunoblotting indicated that Smcr8, Rab8a, and Rab39b are all expressed in mouse brain as well as in cultures of primary E18 cortical mouse neurons

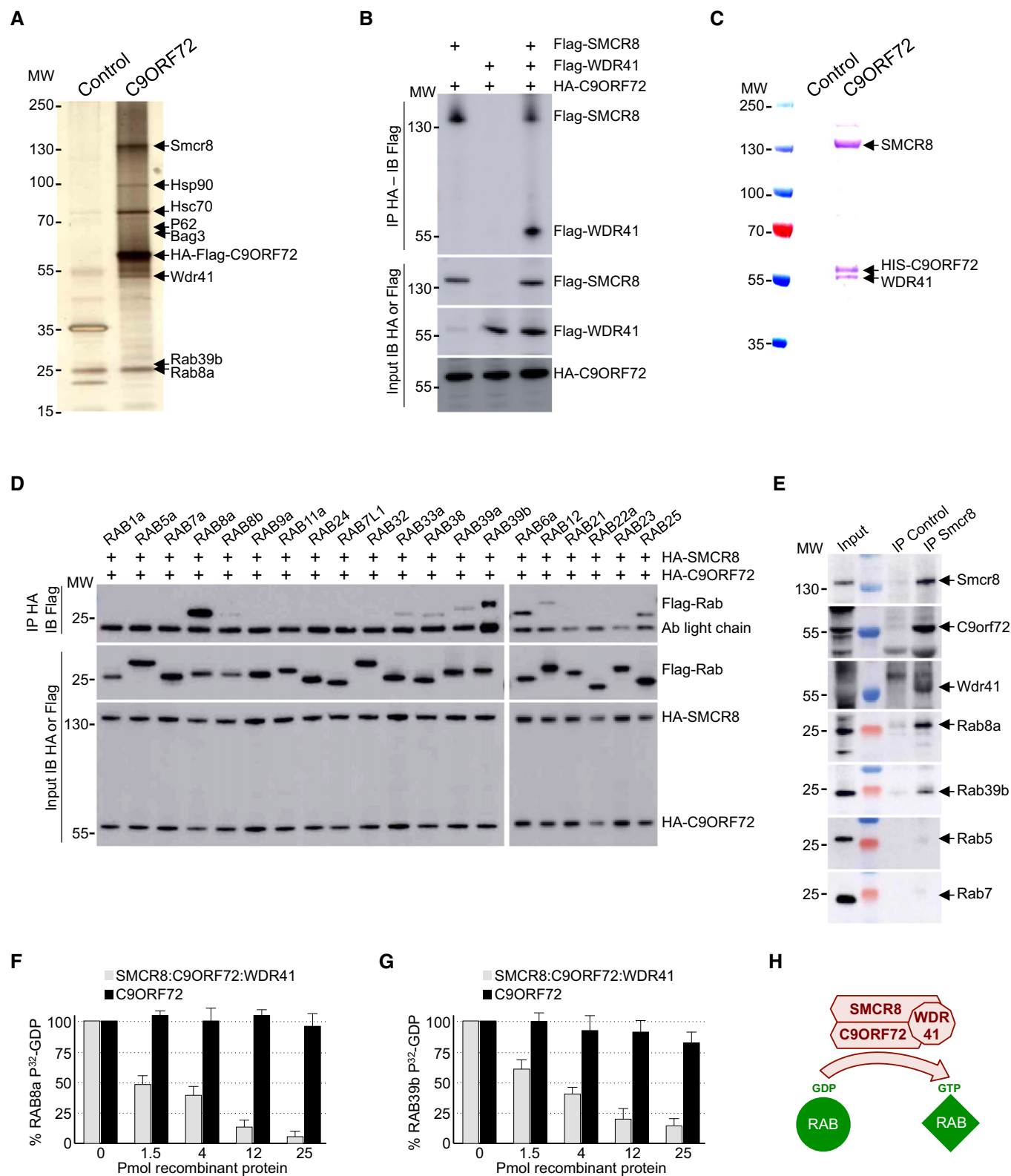


Figure 1.

(Fig EV1F). We were not able to test expression of endogenous C9orf72 and Wdr41 due to the poor quality of the commercial antibodies tested, but expression of C9orf72 in mouse brain had been

reported previously (Suzuki *et al*, 2013). Importantly, immunoprecipitation of endogenous Smcr8 from total mouse brain lysate successfully pulled down Smcr8, but also endogenous C9orf72 and

Wdr41, as well as Rab8a and Rab39b (Fig 1E). In contrast, we did not detect endogenous Rab5 or Rab7 in Smcr8 immunoprecipitation (Fig 1E), thus confirming our transfection experiments.

#### C9ORF72 in complex with SMCR8 and WDR41 is a GEF for Rab GTPase

Both C9ORF72 and SMCR8 contain DENN domains characteristic of Rab-guanine nucleotide exchange factors (Zhang *et al*, 2012; Levine *et al*, 2013). Thus, we tested whether the complex composed of C9ORF72, SMCR8, and WDR41 presents any GEF activity. Purified recombinant GST-tagged RAB8a was preloaded with  $^{32}$ P-labeled GDP, and nucleotide release was monitored in the presence of increasing amount of C9ORF72 recombinant complex purified from baculovirus-infected insect cells. The complex formed by C9ORF72, SMCR8, and WDR41 stimulated GDP release since more than 90% of 40 pmol of RAB8a released its associated GDP in the presence of 25 pmol of C9ORF72, SMCR8, and WDR41 complex (Fig 1F). In contrast, addition of recombinant purified C9ORF72 alone had no or very little effect, suggesting that C9ORF72 is active only when in complex with SMCR8 (Fig 1F). As the C9ORF72 complex also interacts with RAB39b, we tested its GEF activity and found that, similar to RAB8a, the complex composed of C9ORF72, SMCR8, and WDR41 activated GDP release from recombinant purified GST-RAB39b (Fig 1G). In contrast, addition of recombinant purified C9ORF72 alone had no or little effect (Fig 1G). As control, the complex formed by C9ORF72, SMCR8, and WDR41, which does not interact with RAB32 or RAB29, presented no or very little GEF activity toward these Rab GTPases (Fig EV1G). Overall, these results demonstrate that C9ORF72 forms a specific complex with SMCR8 and WDR41, which acts as a GEF effector for at least RAB8a and RAB39b (Fig 1H).

#### RAB8a and RAB39b interact with the autophagy receptors P62

Proteomic analysis identified that C9ORF72 potentially interacts with P62, which is encoded by the *SQSTM1* gene and targets polyubiquitinated proteins for autophagy degradation (Table EV1). Co-immunoprecipitation experiments confirmed that the complex formed by C9ORF72, SMCR8, and WDR41 interacts weakly with P62, but also with OPTN that is alike P62, an autophagy receptor. Further co-immunoprecipitation assays pinpointed that among the proteins of the C9ORF72 complex, P62 mainly interacts with WDR41 and SMCR8 (Fig EV2A), while OPTN mainly interacts with

WDR41 (Fig EV2B). Of interest, mutations in *SQSTM1* or *OPTN* cause ALS (Maruyama *et al*, 2010; Fecto *et al*, 2011), and *OPTN* is a potential modifier gene for FTD (Pottier *et al*, 2015). We noted that the quantities of P62 or OPTN immunoprecipitated by the C9ORF72 complex were low, suggesting a potential indirect association. Since OPTN interacts with RAB8 (Hattula & Peränen, 2000; Pilli *et al*, 2012), we tested whether interaction of the C9ORF72 complex with P62 would be mediated by intermediate proteins, namely RAB8 or RAB39. Indeed, both HA-tagged RAB8a and RAB39b readily immunoprecipitated Flag-tagged P62 (Fig EV2C).

#### Decreased expression of C9ORF72 alters autophagy

C9ORF72 is interacting with various proteins connected to autophagy (Table EV1; Behrends *et al*, 2010; Farg *et al*, 2014). Thus, we tested whether depletion of C9ORF72 expression modifies autophagy in neuronal cells. First, we evaluated the formation of vesicles containing LC3B, a protein encoded by the *MAP1LC3B* gene, which is specifically lipidated and localized to autophagic vesicles. Expression of double-tagged GFP-RFP-LC3B in primary cultures of embryonic mouse cortical neurons shows diffuse cytoplasmic localization and rare punctuate structures. In contrast, treatment with torin, which inhibits the autophagic-inhibitory mTOR pathway, induces formation of LC3B puncta (Fig 2A). Importantly, shRNA-mediated depletion of *C9orf72* abolishes this activation of autophagy (Fig 2A). GFP-RFP-LC3B expression in primary neuronal cultures revealed no differences in the GFP/RFP ratio. This ratio reflects the rate of formation of autophagosome relative to their fusion to lysosome, suggesting that C9ORF72 acts on the formation of autophagosome rather than on their degradation by the lysosome. Similar inhibitory effect of *C9orf72* siRNA on autophagy activation was observed with primary neuronal cultures treated with rapamycin instead of torin, or when GT1-7 cells, a transformed murine neuronal cell line expressing similar level of *C9orf72* compared to primary neuronal cell cultures, were tested (Fig EV2D). Next, we confirmed these results by investigating the ratio of lipidated LC3B. Western blotting analysis revealed that the level of phosphatidylethanolamine-linked LC3B-II was slightly decreased in primary cultures of embryonic mouse cortical neurons transduced with lentivirus expressing shRNAs against *C9orf72* in basal condition (Fig 2B). This inhibitory effect was much more evident in torin-treated neurons since activation of the lipidation of LC3B was abolished by shRNA-mediated depletion of C9orf72 (Fig 2B). Identical results were observed in neurons treated with rapamycin instead of torin, or in GT1-7

#### Figure 2. Reduced expression of C9ORF72 partly impairs autophagy.

- A Left panel, representative images of organotypic cultures of E18 mouse cortical neurons transfected with GFP-RFP-LC3B and transduced with lentivirus expressing either control shRNA or shRNA targeting *C9orf72* mRNA and treated or not with Torin. Right panel, quantification of LC3B puncta.
- B Upper panel, immunoblot analysis of endogenous LC3B (Map1lc3b), C9orf72, and control actin of E18 mouse cortical neurons transduced with lentivirus expressing either control shRNA or shRNA targeting *C9orf72* mRNA and treated or not with Torin. Lower panel, real-time RT-qPCR quantification of endogenous *C9orf72* mRNA expression relative to *Rplp0* mRNA.
- C Left panel, representative images of immunofluorescence labeling of endogenous P62 (Sqstm1) on organotypic cultures of E18 mouse cortical neurons transduced with lentiviral particles expressing either control shRNA or shRNA targeting *C9orf72*. Right panel, quantification of P62 aggregates.
- D Left panel, representative images of immunofluorescence labeling of transfected constructs (green) and endogenous P62 (Sqstm1, red) on GT1-7 neuronal cells transfected with siRNA targeting *C9orf72* and plasmids expressing control GFP, and HA-tagged wild-type or mutant RAB39b (CA, Q68L or CN, S22N), RAB8a, or RAB7. Right panel, quantification of P62 aggregates.

Data information: Scale bars, 10  $\mu$ m. Nuclei were counterstained with DAPI. Error bars indicate SEM. Student's t-test, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 3$ .

Source data are available online for this figure.

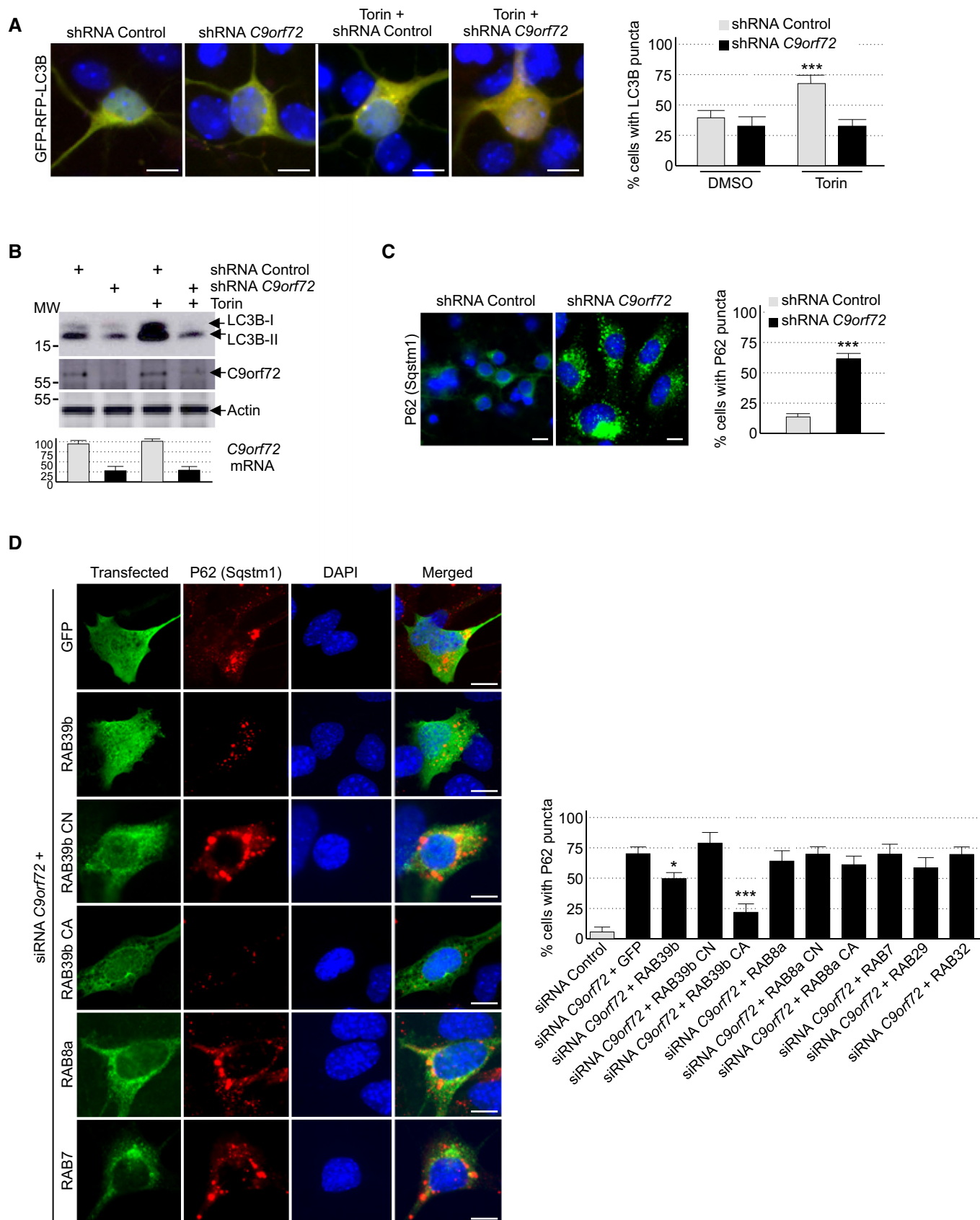


Figure 2.

neuronal cells (Fig EV2E). Depletion of at least 50% of C9orf72 expression was confirmed by Western blotting and, due to the poor quality of the commercial antibodies used, further confirmed by RT-qPCR (Figs 2B and EV2E). Also, we found that decreased expression of C9orf72 reduced but not totally abolished accumulation of LC3B-II in neuronal cells treated with bafilomycin A1, an inhibitor of autophagosome degradation (Fig EV2E). Overall, these data suggest that depletion of C9ORF72 has a partial deleterious effect on autophagy.

Autophagy is a crucial mechanism to clear misfolded or aggregated proteins. Thus, we tested whether depletion of C9ORF72 had any effect on the degradation of protein aggregate. The P62 protein, which is encoded by the *SQSTM1* gene, bridges aggregates of polyubiquitinated proteins to LC3B, thereby targeting these proteins toward autophagy. Furthermore, P62-positive aggregates are a histological hallmark of ALS-FTD patients with expansion of GGGGCC repeats in *C9ORF72* (Al-Sarraj et al, 2011). Immunofluorescence labeling of P62 indicated an accumulation of unresolved P62 aggregates upon depletion of *C9orf72* in primary cultures of embryonic mouse cortical neurons (Fig 2C). Identical results were obtained for GT1-7 neuronal cells or when partners of C9orf72, namely Smcr8 and Wdr41, were siRNA-depleted (Fig EV2F). As control, expression of optimized HA-tagged C9ORF72, which has a nucleotide sequence resistant to the siRNAs targeting endogenous mouse *C9orf72* mRNA, fully rescued autophagy dysfunction caused by siRNA-mediated depletion of C9orf72 (Fig EV2G). Of interest, while the long isoform of C9ORF72 rescued autophagy dysfunction, the short form of C9ORF72 was inactive in that respect (Fig EV2G). These results suggest that the short isoform of C9ORF72 is either a null variant or possesses a cellular function unrelated to autophagy.

### RAB39b corrects autophagy dysfunction caused by depletion of C9ORF72

Depletion of C9ORF72 alters autophagy, and C9ORF72 in complex with SMCR8 interacts and promotes GDP/GTP exchange of RAB8a and RAB39b, which are two Rab GTPases involved in autophagy (Pilli et al, 2012; Seto et al, 2013). This questions the relevance of the interaction of C9ORF72 with RAB8a or RAB39b, notably to control autophagy. Importantly, expression of a constitutively active (Q68L, mutant CA) form of RAB39b, which is locked in its GTP conformation and consequently does not require any GEF activity,

fully corrected autophagy alteration caused by a decreased expression of C9orf72 (Fig 2D). Expression of wild-type HA-tagged RAB39b had only a partial effect on autophagy rescue, while a GDP-locked constitutively negative (S22N, mutant CN) RAB39b did not rescue autophagy alterations caused by siRNA-mediated depletion of C9orf72. As control of RAB39b specificity, expression of RAB7, RAB29, RAB32, or wild-type, constitutively active or inactive RAB8A did not rescue autophagy alteration caused by C9orf72 depletion (Fig 2D). These results suggest that the GEF activity of the C9ORF72 complex toward RAB39b is important to control autophagy in neuronal cells.

### TBK1 phosphorylates SMCR8

Tandem-tag purification of C9ORF72 identified a putative weak interaction with TANK-Binding Kinase 1 (TBK1) (Table EV1). Of interest, mutations in *TBK1* lead to ALS (Cirulli et al, 2015; Freischmidt et al, 2015), and RAB8, which interacts with the C9ORF72 complex, is involved in the autophagic elimination of intracellular pathogens through the kinase TBK1 (Pilli et al, 2012). Thus, we tested whether the C9ORF72 complex would interact with the TBK1 kinase complex. Co-immunoprecipitation experiments indicated that the complex formed by C9ORF72 and SMCR8 did not bind to TBK1 directly, but interacted with all three TBK1 adaptor proteins (Fig 3A), namely TANK, SINTBAD (*TBKBP1*), and NAP1 (*AZI2*). These adaptor proteins are essential to direct TBK1 toward specific cellular compartments and functions, notably autophagy (Goncalves et al, 2011). These interactions question whether TBK1 phosphorylates C9ORF72. *In vitro* kinase assay demonstrated that TBK1 phosphorylates SMCR8, but not C9ORF72 or WDR41 (Fig 3B). We repeated that experiment using purified TBK1 overexpressed from HEK293 cells and recombinant HIS-C9ORF72, SMCR8, and WDR41 complex purified from baculovirus-infected insect cells. Mass spectrometry analysis identified SMCR8 serine 402 and threonine 796 as TBK1 phosphorylation sites (Fig 3C). Consistent with the consensus motif identified in other substrates of TBK1 (Ma et al, 2012), both SMCR8 serine 402 and threonine 796 are followed by a leucine.

### TBK1 phosphorylation of SMCR8 is important for autophagy

We constructed TBK1 phospho-dead (S402A, T796A) and phosphomimetic (S402D, T796D) mutants of SMCR8 and noted that these

#### Figure 3. SMCR8 is phosphorylated by TBK1.

- Immunoblot analysis of HA-immunoprecipitated proteins and lysate of HEK293 cells co-expressing HA-tagged C9ORF72 and HA-tagged SMCR8 with Flag-tagged TBK1, NAP1, TANK, or SINTBAD.
- Immunoprecipitated HA-tagged C9ORF72, HA-tagged SMCR8, and HA-tagged WDR41 expressed in HEK293 were subjected to *in vitro* TBK1 kinase assay in the presence of  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-radiolabelled ATP. Proteins were separated by SDS-PAGE migration and phosphorylation was detected by autoradiography (upper panel), while expression was detected by Western blotting (lower panel).
- Mass spectrometry identification of SMCR8 phosphorylation sites by *in vitro* TBK1 kinase assay of HIS-tagged C9ORF72:SMCR8:WDR41 complex purified from baculovirus-infected insect cells.
- Upper panel, representative images of immunofluorescence labeling of transfected constructs (green) and endogenous P62 (Sqstm1, red) on GT1-7 neuronal cells transfected with siRNA targeting the 3'UTR of *Smcr8* mRNA and plasmids expressing control GFP and HA-tagged wild-type or mutant SMCR8 (TA, S402A and T796A; TD, S402D and T796D; UD, S400D, S492D, S562D, and T666D). Lower panel, quantification of P62 aggregates.
- Upper panel, representative images of immunofluorescence labeling of transfected constructs (green) and endogenous P62 (Sqstm1, red) on GT1-7 neuronal cells transfected with siRNA targeting *Tbk1* and plasmids expressing control GFP and HA-tagged wild-type or mutant SMCR8 or RAB39b. Lower panel, quantification of P62 aggregates.

Data information: Scale bars, 10  $\mu$ m. Nuclei were counterstained with DAPI. Error bars indicate SEM. Student's *t*-test, \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001, *n* = 3.

Source data are available online for this figure.

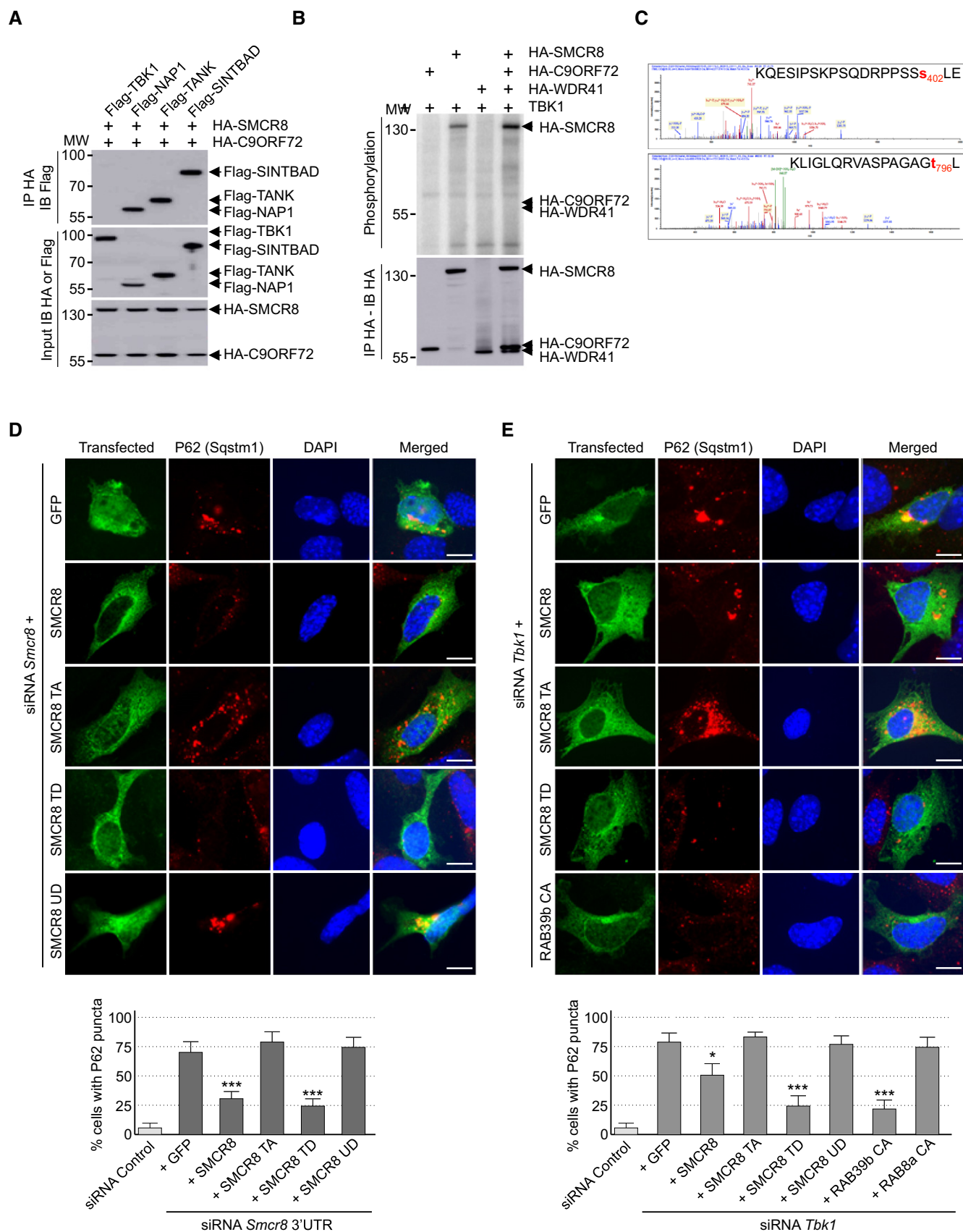


Figure 3.

mutants were normally localized and expressed in transfected neuronal cells. Also, phospho-dead and phosphomimetic mutants of SMCR8 immunoprecipitated C9ORF72 and WDR41 as well as wild-type SMCR8, suggesting that mutation of SMCR8 S402 and T796 did not alter expression, stability, structure, and ability of SMCR8 to form a complex. Next, we tested whether SMCR8 phosphorylation was important for its cellular function. Depletion of Smcr8 altered autophagy as illustrated by accumulation of P62 aggregates in neuronal GT1-7 cells transfected with a siRNA targeting the 3'UTR of *Smcr8* mRNA (Fig 3D). Depletion of endogenous Smcr8 expression was confirmed by immunoblotting (Fig EV3A). As control, co-transfection of a siRNA-resistant HA-tagged SMCR8 cDNA corrected autophagy dysfunction due to reduced expression of Smcr8 (Fig 3D). Importantly, expression of HA-tagged S402D and T796D double mutant of SMCR8 (mutant TD), which mimics a constitutive TBK1 phosphorylation of SMCR8, also corrected autophagy dysfunction caused by siRNA-mediated depletion of Smcr8 (Fig 3D). In contrast, a phospho-dead (S402A, T796A; mutant TA) SMCR8 was unable to rescue autophagy alteration (Fig 3D), demonstrating importance of SMCR8 phosphorylation for its function. As a further control, a phosphomimetic mutant of SMCR8 unrelated to TBK1 (SMCR8 S400D, S492D, S562D, T666D; mutant UD) did not correct autophagy alteration caused by siRNA-mediated depletion of Smcr8 (Fig 3D).

We then investigated whether SMCR8 phosphorylation was important for TBK1 cellular function. siRNA-mediated depletion of Tbk1 promoted accumulation of P62 aggregates in neuronal GT1-7 cells (Fig 3E). Decreased expression of Tbk1 was confirmed by immunoblotting (Fig EV3B). Of interest, expression of wild-type HA-tagged SMCR8 rescued only partially the dysfunction of autophagy caused by Tbk1 depletion (Fig 3E). In contrast, transfection of the S402D and T796D mutants of SMCR8 (mutant TD), which mimics a constitutive TBK1 phosphorylation, fully corrected autophagy alteration caused by Tbk1 depletion (Fig 3E). As controls, a phospho-dead (S402A, T796A; mutant TA) as well as a phosphomimetic mutant of SMCR8 unrelated to TBK1 (SMCR8 S400D, S492D, S562D, T666D; mutant UD) was unable to rescue autophagy alteration caused by siRNA-mediated depletion of Tbk1 (Fig 3E). Importantly, depletion of Tbk1 was also corrected by expression of constitutively active GTP-locked HA-tagged RAB39b, but not by constitutively active RAB8A (Fig 3E). Overall, these results suggest that phosphorylation of SMCR8 by TBK1 is important to control autophagy, but also that TBK1, C9ORF72 complex, and RAB39b belong to a common pathway regulating autophagy in neuronal cells.

### ULK1 phosphorylates SMCR8

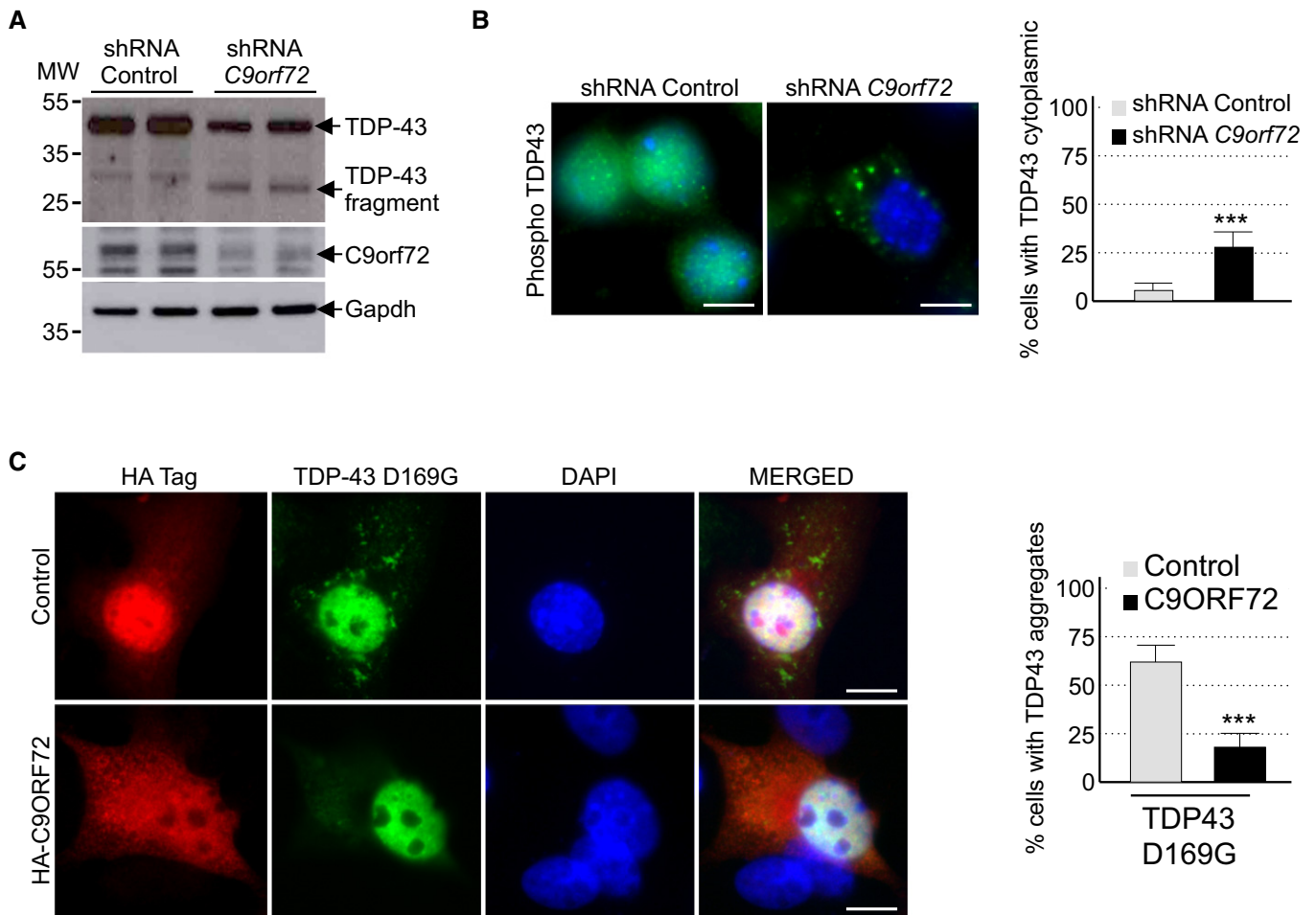
We noted that SMCR8 was initially identified as an interactant of the ULK1 kinase complex, which initiates autophagy (Behrends et al, 2010). Similarly, our tandem-tag purification of C9ORF72 identified a potential weak interaction with a component of the ULK1 kinase complex, namely Fip200, encoded by the *Rb1cc1* gene (Table EV1). Co-immunoprecipitation experiments confirmed that the complex formed by C9ORF72, WDR41, and SMCR8 interacts weakly with ULK1 and that this interaction is mostly dependent on the presence of SMCR8 (Fig EV3C). Similar to TBK1, *in vitro* kinase assay demonstrated that ULK1 phosphorylates SMCR8 alone or in

complex, but not C9ORF72 or WDR41 (Fig EV3D). Mass spectrometry analysis identified SMCR8 serine 400, serine 492, serine 562, and threonine 666 or serine 667 as ULK1 phosphorylation sites (Fig EV3E). However, depletion of Ulk1 or of both Ulk1 and Ulk2 using siRNA in neuronal GT1-7 cells leads to only partial accumulation of P62 aggregates compared to siRNA-mediated depletion of Tbk1 (Fig EV3F). Furthermore, a phosphomimetic mutant of SMCR8 (S400D, S492D, S562D, T666D; mutant UD) simulating constitutive phosphorylation of SMCR8 by the ULK1 kinase did not correct autophagy alteration caused by depletion of Smcr8 (Fig 3D). Overall, these results suggest that in GT1-7 neuronal cells and in the time frame of our study, phosphorylation of SMCR8 by the TBK1 kinase plays a crucial role to regulate autophagy compared to ULK1.

### Decreased expression of C9ORF72 promotes aggregation of TDP-43

Brain sections of ALS-FTD patients are characterized by the presence of neuronal cytoplasmic inclusions containing the TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) that is abnormally ubiquitinated, phosphorylated, and truncated (Arai et al, 2006; Neumann et al, 2006). Since aggregates of TDP-43 are resolved by autophagy (Filimonenko et al, 2007; Ju et al, 2009; Urushitani et al, 2010; Wang et al, 2012; Barmada et al, 2014; Scotter et al, 2014), we tested whether decreased expression of *C9orf72* had any effect on TDP-43. Importantly, Western blotting assays demonstrated that shRNA-mediated depletion of *C9orf72* in mouse embryonic cortical neurons induced the accumulation of a ~30 kDa truncated fragment of Tdp-43 (Fig 4A). Similarly, immunofluorescence analysis against phosphorylated serine 409/410 of Tdp-43 confirmed accumulation of cytoplasmic aggregates of Tdp-43 in neurons depleted of *C9orf72* (Fig 4B). Note that the accumulation of Tdp-43 aggregates was evident in primary neuronal cultures upon 7 days of transduction with *C9orf72* shRNA lentivirus, while we did not detect accumulation of Tdp-43 aggregates in GT1-7 neuronal cells treated with *C9orf72* siRNA for 24 h, suggesting that accumulation of Tdp-43 may be cell or time dependent. Finally, mutations in *TARDBP*, encoding TDP-43, lead to aggregate of TDP-43 proteins and cause ALS-FTD (Gitcho et al, 2008; Kabashi et al, 2008; Rutherford et al, 2008; Sreedharan et al, 2008; Van Deerlin et al, 2008; Yokoseki et al, 2008). We found that overexpression of C9ORF72 reduced the aggregation of the D169G mutant of TDP-43 (Fig 4C). These results are consistent with previous works showing that enhancing autophagy corrects aggregation and toxicity of mutant TDP-43 (Wang et al, 2012; Barmada et al, 2014).

Phosphomimetic mutants of SMCR8 and constitutively active GTP-locked RAB39b correct autophagy alteration due to depletion of Smcr8, *C9orf72*, or Tbk1, suggesting that these proteins belong to the same pathway. Since TDP-43 regulates indirectly autophagy (Bose et al, 2011; Xia et al, 2016), we tested whether C9ORF72 or RAB39b can rescue autophagy misregulation caused by reduced expression of *Tardbp*. Depletion of Tdp-43 partly altered autophagy as illustrated by accumulation of P62 aggregates in neuronal GT1-7 cells transfected with a siRNA targeting *Tardbp* (Fig EV4). However, we found no correction of autophagy upon transfection of C9ORF72, SMCR8, or wild-type or constitutively active RAB8A or RAB39b (Fig EV4). These negative results highlight the specificity of RAB39b toward TBK1 and C9ORF72, but also indicate that while TDP-43



**Figure 4. Reduced expression of C9ORF72 promotes aggregation of TDP-43.**

**A** Immunoblot analysis of endogenous Tdp-43, C9orf72, and control Gapdh of E18 mouse cortical neurons transduced with lentivirus expressing either control shRNA or shRNA targeting *C9orf72* mRNA.

**B** Left panel, representative images of immunofluorescence labeling of endogenous phosphorylated Ser409/410-Tdp-43 on primary cultures of E18 mouse cortical neurons transduced with lentiviral particles expressing either control shRNA or shRNA targeting *C9orf72*. Right panel, quantification of cytoplasmic Tdp-43 aggregates.

**C** Left panel, representative images of immunofluorescence labeling of D169G mutant GFP-tagged TDP-43 on primary cultures of E18 mouse cortical neurons transfected with either HA-tagged control or HA-C9ORF72 plasmid. Right panel, quantification of cells with cytoplasmic aggregates of TDP-43.

Data information: Scale bars, 10  $\mu$ m. Nuclei were counterstained with DAPI. Error bars indicate SEM. Student's *t*-test, \*\*\**P* < 0.001, *n* = 3.

Source data are available online for this figure.

regulates autophagy, this regulation is independent or downstream of the TBK1, C9ORF72, and RAB39b pathway. This is consistent with the recent report that loss of TDP-43 downregulates Dynactin 1 mRNA, which impairs autophagy at the late step of fusion of autophagosomes to lysosomes (Xia *et al*, 2016).

#### Decreased expression of C9ORF72 synergizes Ataxin-2 Q30x toxicity

Since decreased expression of C9ORF72 inhibits autophagy and promotes accumulation of aggregates of TDP-43, we searched for other proteins prone to aggregation that may accumulate upon depletion of C9ORF72. Ataxin-2 (encoded by the gene *ATXN2*) is a cytoplasmic RNA-binding protein that interacts with the

poly(A)-binding protein (PABP) and regulates mRNA stability (Kozlov *et al*, 2001; Yokoshi *et al*, 2014). Abnormal expansion over 34 glutamines in *ATXN2* leads to spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) (Imbert *et al*, 1996; Pulst *et al*, 1996; Sanpei *et al*, 1996), while intermediate expansion of polyQ (27–33 repeats) is an increased risk of ALS-FTD (Elden *et al*, 2010; Daoud *et al*, 2011; Ross *et al*, 2011; Van Damme *et al*, 2011; Lattante *et al*, 2014). We found that both HA-tagged Ataxin-2 with control length (Q22x) and intermediate size (Q30x) of polyQ localized diffusely into the cytoplasm of primary cultures of embryonic mouse cortical neurons (Fig 5A). Importantly, shRNA-mediated decreased expression of C9orf72 promoted accumulation of aggregates of Ataxin-2 with intermediate polyQ length in primary cultures of neurons (Fig 5A). Similar results were observed in GT1-7 neuronal cells or when

partners of C9orf72, namely Smcr8 and Wdr41, were siRNA-depleted (Fig EV5A). As a control, treatment of neuronal cells with bafilomycin A1, a drug that blocks autophagy, also promoted accumulation of Ataxin-2 Q30x aggregates (Fig EV5A). In contrast, depletion of C9orf72, Smcr8, or Wdr41 or bafilomycin treatment had no effect on the diffuse localization of Ataxin-2 with control (Q22x) polyQ size (Figs 5A and EV5A). Immunoblotting confirmed identical expression of HA-tagged Ataxin-2 Q22x upon siRNA-mediated depletion of C9orf72, Smcr8, or Wdr41 or bafilomycin treatment compared to control siRNA (Fig EV5B). Similarly, expression of HA-tagged Ataxin-2 Q30x is identical between control and siRNA-treated C9orf72, Smcr8, or Wdr41, but slightly increased upon bafilomycin A1 treatment (Fig EV5B). Consistent with a previous observation of an increased stability of Ataxin-2 with intermediate size of polyQ (Elden *et al*, 2010), we noted that HA-tagged Ataxin-2 Q30x is expressed at twofold to threefold higher levels than HA-tagged Ataxin-2 Q22x (Fig EV5B and C). As further controls, the effect of C9orf72 loss on aggregation of Ataxin-2 Q30x was specific since we did not observe increased aggregation of mutant SOD1, mutant FUS, huntingtin, or Ataxin-3 with polyQ expansion upon siRNA-mediated depletion of C9orf72 expression, at least in transfected cells and in the time frame of our study (Fig EV5D).

Next, we investigated whether decrease expression of C9ORF72 leads to any reduction in neuronal viability. Consistent with a previous report (Wen *et al*, 2014), neither siRNA- nor shRNA-mediated decreased expression of C9orf72 in neuronal primary cultures induced significant cell death, at least in the conditions and time frame of our study (Fig 5B). Similarly, expression of Ataxin-2 with control (Q22x) or intermediate (Q30x) size of polyQ had little effect on neuronal viability (Fig 5B). In contrast, decreased expression of C9orf72 and simultaneous expression of Ataxin-2 with intermediate size of polyQ (Q30x) induced neuronal cell death (Fig 5B). As a control, siRNA-mediated depletion of C9orf72 with concomitant expression of control Ataxin-2 (Q22x) did not reduce neuronal cell viability (Fig 5B).

To confirm these results *in vivo*, we developed zebrafish models with decreased expression of C9orf72 and which express Ataxin-2 with either normal or intermediate size of polyQ. Of technical interest, we used a reduced quantity (50%) of antisense morpholino oligonucleotides (AMOs) known to block translation of the zebrafish ortholog of C9ORF72 compared to a previous study (Ciura *et al*,

2013). In these conditions, we observed little toxicity and no abnormal motor phenotype associated with a reduction in C9orf72 (Fig 5C). Quantification of endogenous zebrafish C9orf72 mRNA by RT-qPCR confirmed a partial (50–60%) decreased expression of C9orf72 upon antisense AMO injection compared to control conditions (Fig EV5E). We also controlled by RT-qPCR the equal expression of HA-tagged Ataxin-2 Q22x or Q30x in injected zebrafish (Fig EV5F). Consistent with previous results (Elden *et al*, 2010), we noted a higher expression of Ataxin-2 Q30x compared to Ataxin-2 Q22x (Fig EV5F). Importantly, we observed no toxicity associated with the sole expression of Ataxin-2 with normal (Q22x) or intermediate (Q30x) length of polyQ (Fig EV5G). In contrast, the decreased expression of C9orf72 associated with the expression of Ataxin-2 with intermediate size of polyQ (Q30x) resulted in an abnormal motor behavior, specifically a reduced touch-evoked escape response (Fig 5C). Indeed, after stimulation by light touch to the fish tail, swimming distance, average velocity, and maximum velocity were significantly reduced in zebrafish embryos knocked down for C9orf72 and expressing Ataxin-2 with thirty glutamines (Fig 5D–F). As a control, decreased expression of C9orf72 with concomitant expression of Ataxin-2 with control length of polyQ (Q22x) had no significant pathogenic effect on swimming episodes following escape response (Fig 5D–F). Furthermore, the specificity of the phenotype was confirmed by injection of the same concentration of a control mismatch morpholino, which did not cause any locomotor phenotype (Fig EV5G–J). As further controls, expression of Ataxin-2 with either control or intermediate length of polyQ alone or with a mismatch antisense morpholino oligonucleotide also did not cause any locomotor phenotypes (Fig EV5G–J).

Finally, we analyzed the morphology of the axonal projections from spinal motor neurons by immunofluorescence against the synaptic vesicle marker Sv2. Similar to results presented above, knockdown of C9orf72 alone or the sole expression of Ataxin-2 (Q22x or Q30x) had no effect compared to control non-injected or mismatch AMO-injected fish (Fig 5G). Also, knockdown of C9orf72 with concomitant expression of Ataxin-2 with control size (Q22x) of polyQ had no toxic effect (Fig 5G and H). In contrast, the decreased expression of C9orf72 with simultaneous expression of Ataxin-2 with intermediate size of polyQ (Q30x) resulted in disrupted arborization and shortening of the motor neuron axons (Fig 5G and H). Overall, these results indicate that the partial knockdown of C9ORF72 does not induce major neuronal cell death but synergizes

**Figure 5. Reduced expression of C9ORF72 synergizes Ataxin-2 toxicity.**

- A Left panel, representative images of organotypic cultures of E18 mouse cortical neurons co-transfected with HA-tagged ATXN2 with control (Q22x) or intermediate (Q30x) polyQ size and transduced with lentivirus expressing either control shRNA or shRNA targeting C9orf72 mRNA. Right panel, quantification of Ataxin-2 aggregates. Scale bars, 10  $\mu$ m. Nuclei were counterstained with DAPI.
- B Cell viability (tetrazolium assay) of GT1-7 neuronal cells co-transfected with HA-tagged ATXN2 with control (Q22x) or intermediate (Q30x) polyQ size and control siRNA or siRNA targeting C9orf72 mRNA. Error bars indicate SEM,  $n = 3$ .
- C Tracing of the swimming trajectories of 48 h post-fertilization zebrafish larvae following light touch.
- D–F Quantification of the touch-evoked swimming distance (D), average velocity (E), and maximum velocity attained (F) shows significant functional impairment of the zebrafish injected with HA-tagged ATXN2 with intermediate length of polyQ (Q30x) and antisense morpholino oligonucleotides (AMOs) against C9orf72 compared to control HA-tagged ATXN2 (Q22x) or to the sole injection of AMO against C9orf72.
- G Representative images of motor neurons visualized with anti-Sv2 immunohistochemistry show severe axonopathy in fish injected with both ATXN2 Q30x and AMO against C9orf72 compared to zebrafish injected with control ATXN2 Q22x or with AMO against C9orf72 alone.
- H Quantification of the motor neuron axonal length demonstrates a significant decrease in axonal length in 48 h post-fertilization zebrafish larvae injected with both ATXN2 Q30x and AMO against C9orf72 compared to controls.

Data information: Error bars indicate SEM. Student's *t*-test, \*\*\* $P < 0.001$  (A, B) or one-way ANOVA, \*\* $P < 0.01$  (D–F, H),  $n = 3$ .

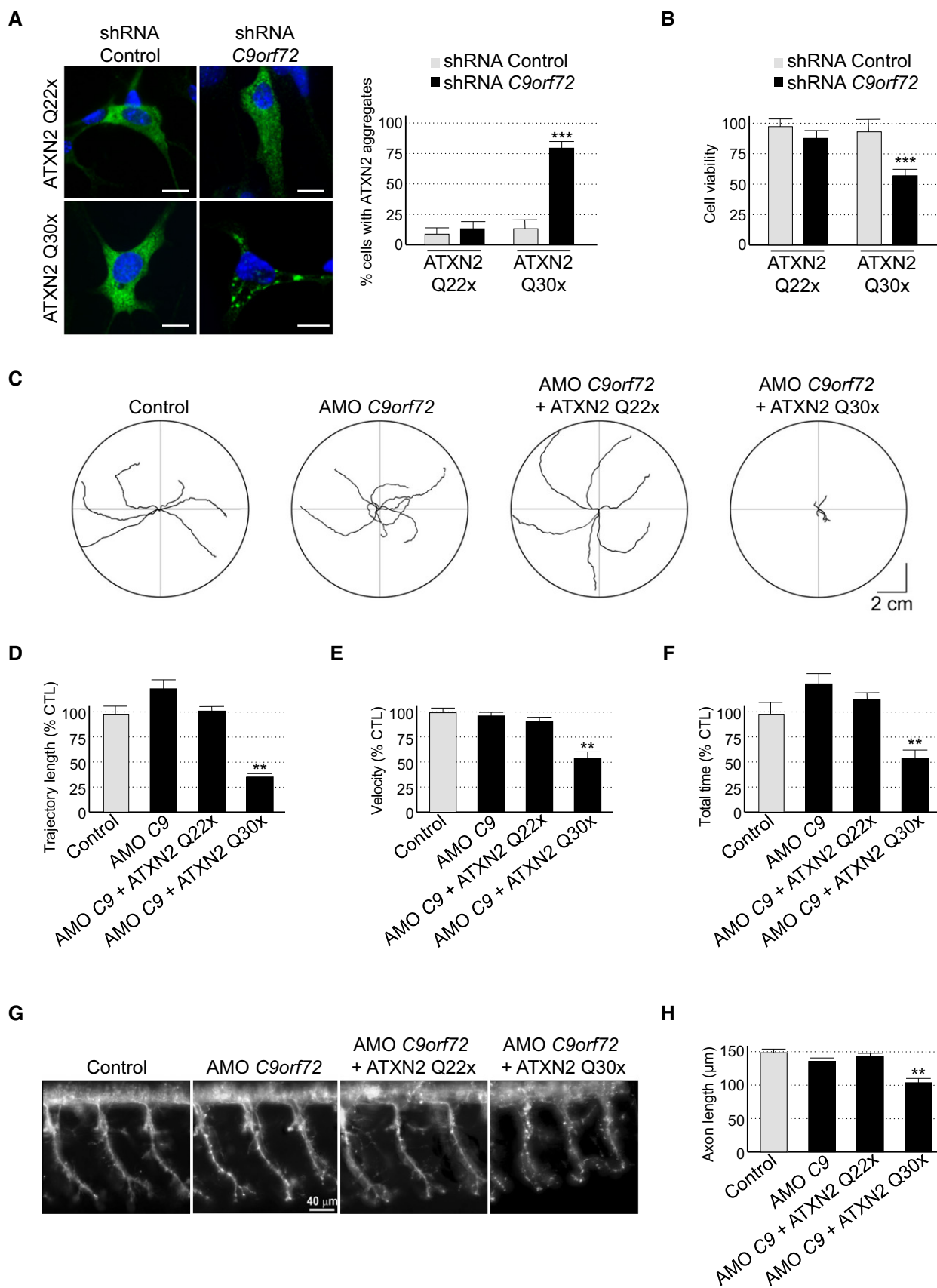


Figure 5.

the toxicity of Ataxin-2 with intermediate length of polyQ, resulting in alterations of the motor neuron and of the locomotor phenotype *in vivo*.

## Discussion

In conclusion, we found that C9ORF72 belongs to a complex containing the SMCR8 and WDR41 proteins. This complex is phosphorylated by TBK1 and ULK1 kinases, is a GDP/GTP exchange factor for RAB8a and RAB39b GTPases, and regulates autophagy (Fig 6). These results are reminiscent of the complex formed by folliculin (FLCN) and the folliculin-interacting protein-1 and folliculin-interacting protein-2 (FNIP1 and FNIP2), which contain divergent DENN modules presenting some homology with SMCR8 and C9ORF72, respectively (Zhang *et al*, 2012; Levine *et al*, 2013). FLCN is a tumor suppressor protein disrupted in various cancers and the Birt-Hogg-Dubé syndrome, which presents GTPase-activating activity for RagC/D regulating mTORC1 activity (Petit *et al*, 2013; Tsun *et al*, 2013). Also and similar to the C9ORF72 complex, FLCN is a GEF for Rab GTPases, is phosphorylated by ULK1, and is involved in the control of autophagy (Nookala *et al*, 2012; Dunlop *et al*, 2014).

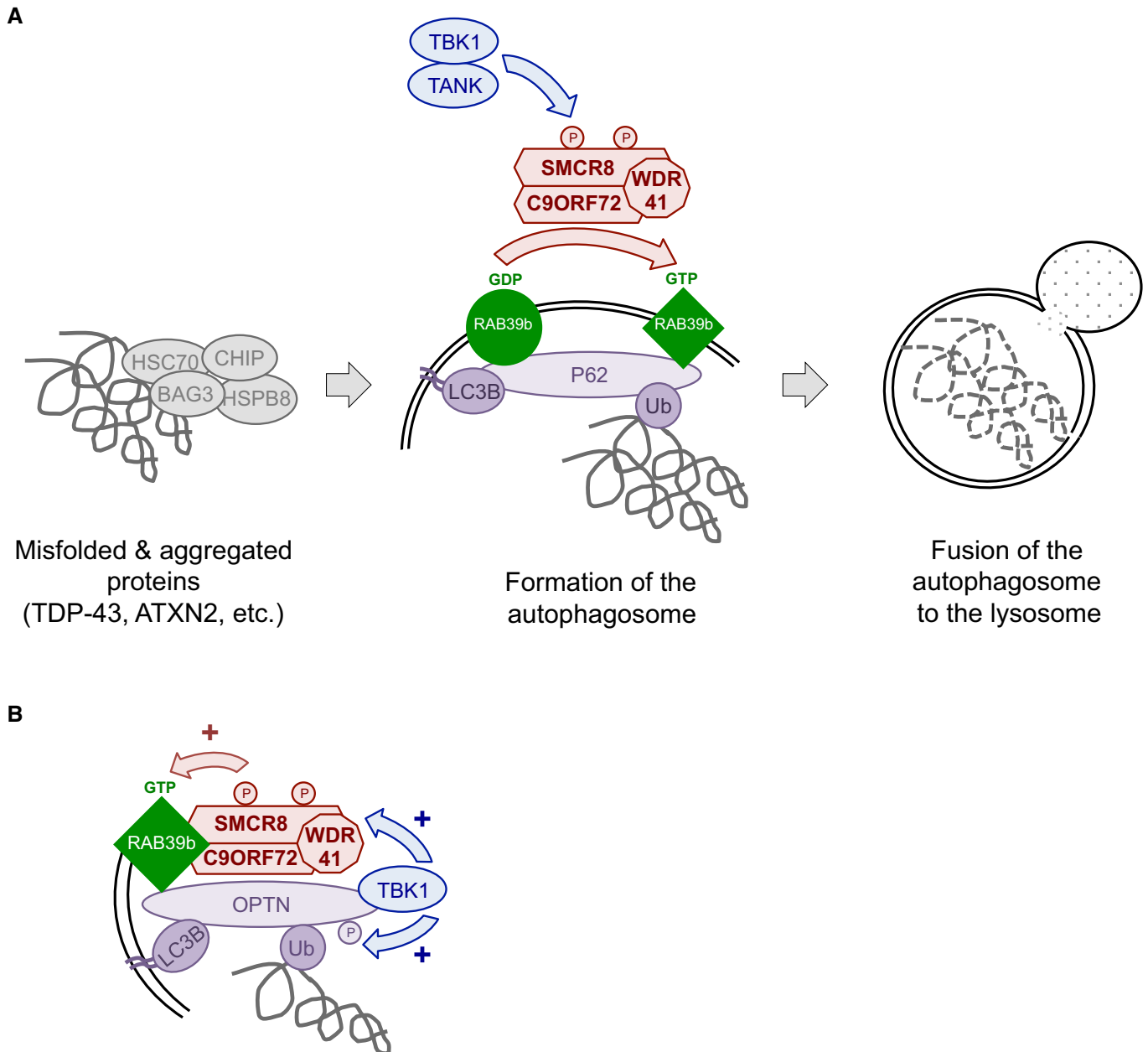
However, our results indicating that C9ORF72 in complex with SMCR8 interacts with RAB8a and RAB39b are different from a previous report where C9ORF72 was found to interact with RAB1, RAB5, RAB7, and RAB11 (Farg *et al*, 2014). These discrepancies are inherent to the different approaches used in these two studies. Notably, we tested C9ORF72 in complex, while Farg and colleagues studied C9ORF72 in isolation. Similarly, composition of the immunoprecipitation washing buffers is different with 50 mM Tris in Farg and colleagues versus 50 mM Tris with 150 mM NaCl in our study. Moreover, we found that commercial antibodies against C9ORF72 were of poor specificity to carry immunoprecipitation of endogenous proteins. A second divergence between these two studies is that Farg and colleagues observed that siRNA-mediated depletion of C9orf72 increases LC3B-II levels in basal condition. In contrast, we observed little effect of siRNA- or shRNA-mediated depletion of C9ORF72 on LC3B in basal condition, but observed a significant inhibition of LC3B lipidation when autophagy flux was investigated. These differences may originate from the different degree of siRNA-mediated depletion of C9ORF72 and/or from the different cells employed (primary E18 cortical neurons and GT1-7 cells in our study versus SH-SY5Y cells in Farg and colleagues) since basal autophagy and LC3B levels are known to vary according to the cell types.

Importantly, a role of C9ORF72 in autophagy is consistent with the increased accumulation of P62 and susceptibility to inhibition of autophagy observed in human neurons derived from C9ORF72 iPS cells (Almeida *et al*, 2013). Similarly, accumulation of TDP-43- and P62-positive protein aggregates upon reduction in C9ORF72 expression is reminiscent of a dysfunction of autophagy and reproduces key histopathological features of ALS-FTD patients (Neumann *et al*, 2006; Al-Sarraj *et al*, 2011). In that aspect, it is also striking to note that various mutations causing ALS-FTD are found in genes involved in protein clearance pathways, including *UBQLN2*, *CHMP2B*, *VCP*, *OPTN*, *SQSTM1*, and *TBK1* (Skibinski *et al*, 2005; Johnson *et al*, 2010; Maruyama *et al*, 2010; Deng *et al*, 2011; Fecto

*et al*, 2011; Cirulli *et al*, 2015; Freischmidt *et al*, 2015). Thus, our work linking decreased expression of C9ORF72 to partial deficient autophagy provides further support to compromised protein clearance mechanisms in ALS-FTD. However, it is important to note that our siRNA approach resulted in loss of 75% or more of *C9orf72* expression, while C9ORF72 levels are reduced by 50% or less in brain of individuals with ALS-FTD. Similarly, mutations in *TBK1* cause disease through a haploinsufficiency mechanism, while our siRNA reduced *Tbk1* expression by nearly 80%. Thus, we can only speculate that partial reduction in C9ORF72 or TBK1 activity in patients may result in a suboptimal autophagy pathway, which in turn may contribute to disease pathogenesis.

A second significant conclusion of this study is that constitutively active GTP-locked RAB39b corrects autophagy alteration caused by either loss of TBK1 or C9ORF72. Thus, we propose that TBK1, C9ORF72 complex, and RAB39b belong to a common pathway regulating autophagy in neuronal cells (Fig 6A). This model is similar to the ULK1-mediated phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor DENND3 that activates Rab12 and promotes autophagy (Xu *et al*, 2015), suggesting that phosphorylation of GDP/GTP exchange factors may be a widespread and novel pathway to activate Rab GTPase in autophagy. Since RAB39b and RAB8a interact with P62 and OPTN, our results also support a model where autophagy receptors, such as P62 or OPTN, function as essential hubs to gather autophagy substrates with LC3B but also with specific Rab GTPases and their GEF effectors and kinase regulators in order to initiate autophagy precisely at the site of protein aggregates, dysfunctional organelles, or intracellular pathogens (Fig 6B). This model is supported by the interaction and phosphorylation of P62 or OPTN by TBK1 in xenophagy (Wild *et al*, 2011; Pilli *et al*, 2012), but also by the recent reports of OPTN and TBK1 importance for the PINK1-Parkin mitophagy pathway, which is altered in Parkinson's disease (Heo *et al*, 2015; Lazarou *et al*, 2015; Matsumoto *et al*, 2015). In that aspect, mutations in the X-linked *RAB39b* gene lead to early-onset Parkinson's disease (Wilson *et al*, 2014), while atypical parkinsonism has been observed in rare cases of individuals with GGGGCC expansion in *C9ORF72* (Wilke *et al*, 2016).

This work also raises several questions. First, we noted that the C9ORF72 complex acts as a GEF toward RAB8a and RAB39b; however, we did not test all existing Rab proteins and the C9ORF72 complex may potentially regulate various other Rab GTPases. Similarly, it is unclear which Rab proteins initiate and regulate autophagy in which tissue, developmental time, or conditions. In that aspect, the precise molecular functions of RAB8 and RAB39 in autophagy remain also to be elucidated. Binding of RAB8a and RAB39b to P62 suggest that these Rab GTPases may act on formation of the autophagosome. However, whether these Rab GTPases can also regulate the transport or fusion of the autophagosome to multivesicular body or lysosome is to be determined. Also, we found that phosphorylation of SMCR8 by TBK1 is important to control autophagy in neuronal cells. However, it remains to test the importance of SMCR8 phosphorylation on the GDP/GTP exchange activity of the C9ORF72 complex. Likewise, the signaling pathways activating TBK1 is yet unclear. Indeed, TBK1 activation may require an upstream kinase (Heo *et al*, 2015), while a second and non-exclusive model proposes that local concentration of TBK1 through its recruitment via OPTN may auto-activate TBK1 through trans-autophosphorylation (Matsumoto *et al*, 2015). Furthermore, SMCR8



**Figure 6. Tentative model of C9ORF72 function.**

- A** C9ORF72 in complex with SMCR8 and WDR41 acts as a GDP/GTP exchange factor for RAB39b GTPase, which interacts with the P62 autophagy receptor. Phosphorylation of SMCR8 by TBK1 potentially promotes C9ORF72 GEF activity and enhances autophagy turnover of proteins such as TDP-43 or Ataxin-2 with intermediate polyQ size. In the absence of C9ORF72, autophagy clearance of these proteins is reduced and TDP-43, P62, or Ataxin-2 with intermediate length of polyQ accumulates into cytoplasmic aggregates.
- B** Autophagy receptors such as P62 or OPTN act as hubs to gather Rab GTPases with their GEF effectors and kinase regulators to initiate autophagy precisely at the site of damaged organelles, protein aggregates, or intracellular pathogens.

is also interacting with proteins of the ULK1, mTOR, and AMPK kinase complexes (Table EV1) and SMCR8 is reported phosphorylated by mTOR (Hsu *et al*, 2011) and AMPK (Hoffman *et al*, 2015; Schaffer *et al*, 2015), but with unknown consequences.

Also intriguing is the accumulation of TDP-43 aggregates upon depletion of C9ORF72 in primary culture of E18 cortical mouse neurons but not in GT1-7 cells. This discrepancy may originate from

the reduced time frame (24–48 h) of analysis in GT1-7 cells compared to primary neuronal culture transduced with shRNA lentivirus for 7 days. In support of our work, a causal link between altered autophagy and accumulation of cytoplasmic aggregates of TDP-43 is long established (Filimonenko *et al*, 2007; Ju *et al*, 2009; Urushitani *et al*, 2010; Wang *et al*, 2012; Barmada *et al*, 2014; Scotter *et al*, 2014) and is consistent with the TDP-43-positive

neuronal inclusions observed in ALS-FTD patients with mutation in genes involved in autophagy or in protein clearance pathway, including *UBQLN2*, *TBK1*, *OPTN*, *SQSTM1*, *VCP*, or *GRN* (Hu *et al*, 2010; Brady *et al*, 2013; review in Majcher *et al*, 2015 and in Taylor, 2015). However, this questions whether the aggregates of TDP-43 observed in the vast majority of sporadic ALS-FTD cases are also caused by some deficiency in autophagy and/or protein clearance mechanisms, and if so, what would be the underlying pathogenic mechanisms. In that aspect, recent evidences of accumulation of TDP-43 aggregates in aging human brain (Uchino *et al*, 2015) might be related to the known decline of autophagy with age (Sun *et al*, 2015).

Finally, we found that partial loss of C9ORF72 promoted accumulation of P62 in aggregates, but had only mild effect on LC3B levels. Similarly, reduced expression of C9orf72 had little effect on neuronal cell viability. This is consistent with the absence of neurodegenerative phenotypes observed in mouse depleted of *C9orf72* expression (Lagier-Tourenne *et al*, 2013; Koppers *et al*, 2015). These results may suggest that either the activity of C9ORF72 is redundant with other proteins or that C9ORF72 is not crucial for basal autophagy but may play a more restricted role in a specific autophagy subpathway. In support of that latter hypothesis, we found that decreased expression of C9ORF72 promotes specifically the aggregation of Ataxin-2 with intermediate length of polyQ. These results support the co-incidence of expanded GGGGCC repeats in *C9ORF72* with intermediate length of polyQ repeats in Ataxin-2 in ALS-FTD patients (Elden *et al*, 2010; Daoud *et al*, 2011; Ross *et al*, 2011; Van Damme *et al*, 2011; Lattante *et al*, 2014). However, why the decreased expression of C9ORF72 promotes the aggregation and toxicity of Ataxin-2 with polyQ expansion, but not the aggregation of Ataxin-3 or Huntingtin with polyQ expansion, is intriguing and the cause of this specificity remains to be explored. In that aspect, both TDP-43 and Ataxin-2 are RNA-binding proteins, thus questioning whether a selective autophagy of RNA-protein granules (RNAphagy) is controlled by C9ORF72 and altered specifically in ALS-FTD (Buchan *et al*, 2013; Fujiwara *et al*, 2013). It is also possible that we missed the deleterious effect of C9ORF72 loss on other polyQ proteins due to the reduced time frame of our study or to other inherent limitations of cell cultures. Similarly, it is possible that Ataxin-2 with a control length (22Q) of polyglutamine might form microaggregates that would be toxic on a longer time period of analysis. This hypothesis is sustained by the observation that Ataxin-2 with both normal and intermediate length of polyQ synergizes the toxicity of TDP-43 in fly, however with normal polyQ size being less toxic than intermediate polyQ length (Kim *et al*, 2014). Thus, murine models would be instrumental to test the pathological consequences of loss of C9ORF72 in the presence of Ataxin-2 or other proteins with polyglutamine expansion. It also remains to test whether decreased expression of C9ORF72 may synergize toxicity of other stress, notably some that are inherent to the expanded GGGGCC repeats such as accumulation of GGGGCC RNA foci and/or RAN-translated DPRs. This hypothesis is particularly appealing in light of the association of C9ORF72 mRNA expression with patient survival (van Blitterswijk *et al*, 2015) and the recent reports of no overt neurodegenerative phenotype in BAC transgenic mouse models with normal expression of C9orf72 but overexpression of expanded GGGGCC repeats. These mice present RNA foci and aggregates of dipeptide repeat proteins but develop only subtle behavioral

phenotypes (O'Rourke *et al*, 2015; Peters *et al*, 2015). Similarly, mice depleted of *C9orf72* expression in brain or in neurons present no overt neurodegenerative phenotypes (Lagier-Tourenne *et al*, 2013; Koppers *et al*, 2015). These results suggest that the sole loss of C9ORF72 or the expression of GGGGCC RNA and DPR in isolation is not sufficient to be pathogenic, but it remains to test whether a reduced expression of C9ORF72 would synergize the toxicity of GGGGCC RNA or DPRs. This synergic model is consistent with the absence of ALS/FTD patients with null alleles or missense mutations in *C9ORF72*, as well as by increasing genetic evidences of oligogenicity in ALS-FTD (Ferrari *et al*, 2012; Van Blitterswijk *et al*, 2012; van Blitterswijk *et al*, 2013; Cady *et al*, 2015; Lattante *et al*, 2015a; Pottier *et al*, 2015).

In conclusion, our results support a double-hit mechanism in ALS-FTD, where the sole decreased expression of C9ORF72 does not explain alone the pathogenicity of the expanded GGGGCC repeats but may synergize other stress such as Ataxin-2 with intermediate polyQ length, while association with other stress such as GGGGCC RNA foci or Ran-translated DPRs remains to be formally tested. Finally, if loss of C9ORF72 leads to partial dysfunction of autophagy, one may hope that pharmacological compounds activating autophagy may contribute to alleviate some pathological features of ALS-FTD.

## Materials and Methods

### Constructions

PCMV6 containing C-terminally Flag-tagged human cDNAs of SQSTM1 (P62), OPTN, SMCR8, WDR41, ULK1, NAP1, SINTBAD, TANK, and RAB GTPases were purchased from OriGene. Optimized cDNAs for human N-terminally HA-tagged *C9ORF72* and Flag-tagged *TBK1* cloned into pcDNA3 were purchased from GenScript. Human cDNAs of *ATXN2* with 22 or 30 glutamines were fused to an N-terminal HA tag and cloned into pcDNA3. Constitutively active Q68L and negative S22N mutants of N-terminally HA-tagged RAB39b were constructed by inverse PCR. Similarly, mutations of C-terminally HA-tagged SMCR8 phosphorylation sites (S400, S402, S492, S562, T666, and T796D) in alanine or aspartate were constructed by inverse PCR.

### HA-Flag tandem affinity purification

$12 \times 10^6$  Neuro-2A cells were transfected with 48  $\mu$ g of either control- or C9ORF72-Flag-Ha plasmid using Fugene HD (Promega) for 24 h, and proteins were purified by Ha-Flag tandem purification kit according to the manufacturer's instruction (Sigma-Aldrich). The bound proteins were visualized by silver staining (SilverQuest, Invitrogen) after separation on a 4–12% bis-Tris Gel (NuPAGE), and interactant proteins were identified using NanoESI\_Ion Trap (Thermo Fisher).

### Immunofluorescence

Coverslips were incubated for 10 min in PBS with 4% paraformaldehyde, washed with PBS, and incubated in PBS plus 0.5% Triton X-100 for 10 min. The cells were washed three times with PBS, and

the coverslips were incubated for 1 h with primary antibody against the HA tag (26183, Pierce). P62/Sqstm1 (ab56416, Abcam) or anti-phospho-TDP-43 (pS409/410, Cosmo Bio). After washing with PBS, the coverslips were incubated with goat anti-mouse secondary antibody conjugated with Alexa 488 (Interchim SA) for 1 h, washed twice with PBS, and incubated for 2 min in PBS/DAPI (1/10,000 dilution). Coverslips were rinsed twice before mounting in Pro-Long media (Molecular Probes) and were examined using confocal microscope.

### Immunoprecipitation

$6.25 \times 10^5$  HEK293 cells (1 well of a 6-well plate) were co-transfected for 24 h with 1  $\mu$ g of plasmids expressing HA-tagged cDNA and 1  $\mu$ g of plasmids expressing Flag-tagged cDNA using Fugene HD (Promega). Cells were scraped into RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40) and centrifuged for 15 min at 18,000 g at 4°C; 20  $\mu$ l of pre-washed HA magnetic beads (Dynabeads) was added, and immunoprecipitation was carried for 1 h at 4°C with constant rotation. After three washes with 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween, bound proteins were eluted in SDS-PAGE loading buffer and analyzed by Western blot using antibodies against the Flag tag (PA1-984B, Pierce) or the HA tag (26183, Pierce). For endogenous immunoprecipitation, SMCR8 1D2 mouse monoclonal antibody was incubated with mouse brain extract overnight in RIPA buffer. Pre-cleared A/G magnetic beads (Life Technologies) were added, and immunoprecipitation was carried out for 1 h at 4°C with constant rotation. The beads were washed three times with 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween and then boiled at 95°C for 5 min in SDS-PAGE loading buffer. Bound proteins were analyzed by Western blot using antibodies against SMCR8 (1D2), C9ORF72 (22637-1-AP, Proteintech), WDR41 (NBP1-83812, Novus Biological), Rab8a (11792-1-AP, Proteintech), Rab39b (12162-1-AP, Proteintech), Rab5 (11671-1-AP, Proteintech), Rab7 (Ab137029, Abcam).

### In vitro GDP/GTP exchange assay

About 40 pmol (~2  $\mu$ g) of purified recombinant GST-RAB protein was loaded with 1  $\mu$ Curie of  $\alpha^{32}$ P-labeled GDP (Hartmann Analytic) in 10  $\mu$ l of buffer assay (150 mM NaCl, 50 mM Hepes, 1 mg/ml BSA, 2.5 mM EDTA, pH 7.5) for 30 min at 30°C. Increased quantities of recombinant purified C9ORF72 or C9ORF72/SMCR8/WDR41 complex were added and incubated for further 30 min at 30°C. Twenty microliters of pre-washed GST magnetic beads (Dynabeads) was added, and pull-down was carried out for 30 min at 4°C. After three washes in reaction buffer, radioactivity was measured by using a scintillation counter (Beckman Coulter).

### In vitro phosphorylation

Eight micrograms of recombinant purified C9ORF72/SMCR8/WDR41 complex was incubated for 30 min at 30°C with 10  $\mu$ Curie of  $\gamma^{32}$ P-labeled ATP in 20  $\mu$ l of kinase buffer assay (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, 2 mM  $MgCl_2$ , 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 100  $\mu$ M orthovanadate, pH 7.5) with or without 2  $\mu$ g of recombinant purified ULK1 or TBK1 protein (OriGene). The reaction was stopped by the addition of SDS-PAGE loading buffer, boiled for 3 min at 90°C,

and run on 4–12% bis-Tris Gel (NuPAGE). The gel was then either used for Western blotting assay or dried and imaged (Typhoon scanner, GE Healthcare).

### Neuronal cell cultures, transfection, and treatments

Primary cortical neurons were prepared from C57Bl/6 E18 embryos and grown on poly-L-lysine-coated 24-well plates in neurobasal medium (NBM) supplemented with  $1 \times B27$ , 0.5 mM L-glutamine, and 100 IU/ml penicillin/streptomycin at 37°C with 5%  $CO_2$ . Neurons were transduced at Day 3 with recombinant lentivirus expressing either control shRNA or shRNA against *C9orf72* (SK02-040236-00-10 SMARTvector 2.0 hEF1a Lentiviral Mouse 3110043O21Rik shRNA, Thermo). After overnight incubation, lentivirus was removed and fresh media were added. After 5–7 days, neurons were analyzed by immunofluorescence or by Western blot analysis. GT1-7 cells were grown in 10% fetal bovine serum, gentamicin, and penicillin at 37°C in 5%  $CO_2$ , plated in DMEM and 0.1% fetal bovine serum, and transfected for 24–48 h using Lipofectamine 2000 (Fisher Scientific) and/or RNAiMax (Fisher Scientific) with siRNA control or targeting *C9orf72*, *Smcr8* 3'UTR, or *Tbk1* (ON-TARGETplus, Dharmacon). Neurons were treated with either 10  $\mu$ M of rapamycin (Millipore) for 15 h or 100 nM of bafilomycin (Sigma) for 15 h or 250 nM of Torin-1 (Tocris) for 2 h before analysis.

### Recombinant protein production and purification

For RAB GTPases, *E. coli* BL21(RIL) pRARE competent cells (Invitrogen) were transformed with pet28-GST-RAB GTPase vectors, grown at 37°C in 400 ml of LB medium supplemented with kanamycin until  $OD_{600} = 0.5$ , 0.5 mM IPTG was added and the culture was further incubated for 4 h at 30°C. Harvested cells were sonicated in 300 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM DTT, 5 mM EDTA and centrifuged for 20 min at 20,000 g and recombinant GST-RAB GTPase proteins were purified using the GST purification Kit (Novagen), quantified, dialyzed, and stored in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, 2 mM  $MgCl_2$ , 20% glycerol. Concerning C9ORF72 complex,  $2 \times 10^6$  of SF9 (*Spodoptera frugiperda*) cells (one T25 flask) were co-transfected with 500 ng of *Bsu36I*-linearized BAC10: KO1629 DNA and 2  $\mu$ g of pMF-Dual vectors containing either HIS-C9ORF72, SMCR8, or WDR41 and incubated at 27°C for 6 days. Harvested baculovirus were then tested, amplified and used to infect 2 l of SF9 cell culture for protein production and purification using the HIS purification kit (Novagen) with sonication and washing in 500 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM imidazole, elution with 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM DTT, 5 mM EDTA, 200 mM imidazole, dialysis, and storage in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, 2 mM  $MgCl_2$ , 20% glycerol.

### Monoclonal antibody production

To generate anti-SMCR8 monoclonal antibodies, 8-week-old female BALB/c mice were injected intraperitoneally with 100  $\mu$ g of recombinant purified SMCR8:C9ORF72 complex and 200  $\mu$ g of poly (I/C) as adjuvant. Three injections were performed at 2-week intervals, and 4 days prior to hybridoma fusion, mice with positively reacting sera were re-injected. Spleen cells were fused with

Sp2/0.Agl4 myeloma cells as described by De StGroth and Scheidegger (1980). Hybridoma culture supernatants were tested at Day 10 by ELISA for cross-reaction with recombinant purified C9ORF72: SMCR8 complex. Positive supernatants were then tested by immunofluorescence and Western blot on HA-tagged SMCR8 and HA-tagged C9ORF72 transfected COS-1 cells. Specific cultures were cloned twice on soft agar. Specific hybridomas were established, and ascites fluid was prepared by injection of  $2 \times 10^6$  hybridoma cells into Freund adjuvant-primed BALB/c mice. All animal experimental procedures were performed according to the European authority guidelines.

### Western blotting

Proteins were denatured for 3 min at 95°C, separated on 4–12% bis-Tris Gel (NuPAGE), transferred on nitrocellulose membranes (Whatman Protran), blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) buffer, incubated with anti-Flag (PA1-984B, Pierce), HA (26183, Pierce), C9ORF72 (22637-1-AP, Proteintech), LC3B (ab51520, Abcam), GAPDH (ab125247, Abcam), TDP-43 (3449S, Cell Signaling), SMCR8 (1D2, 1/200) in TBS plus 5% non-fat dry milk, washed three times, and incubated with anti-rabbit or anti-mouse peroxidase antibody (1:3,000, Cell Signaling) for 1 h in TBS, followed by washing and ECL chemoluminescence revelation (Amersham ECL Prime).

### Zebrafish studies

Adult and larval zebrafish (*Danio rerio*) were maintained at the ICM fish facility and bred according to the National and European Guidelines for Animal Welfare. Experiments were performed on wild-type embryos from AB and TL strains. Hb9:GFP Tg(Mnx1:GFP) transgenic lines were used to label motor neurons and their axonal projections. All procedures for zebrafish experimentation were approved by the Institutional Ethics Committee at the Research Center of the ICM and by French and European legislation. The *ATXN2* constructs were used in all the experiments described here at the final DNA concentration of 75 ng/μl. Embryos were maintained at 28°C and manually dechorionated using fine forceps at 24 hpf. Only zebrafish without developmental abnormalities (qualified as malformed) and the swimming trajectories at 48 h post-fertilization were selected and their swimming trajectories appropriately traced. For the percentage analysis, behavioral analysis, and axonal projections, more than three independent experiments were performed for each of the conditions described here. Antisense morpholino oligonucleotides (AMOs) were designed complementary to bind to an upstream ATG that would block both transcripts of the zebrafish *C9orf72* (*C9orf72*) and synthesized from GeneTools. The *C9orf72* AMO sequence was ATGTGGAGGACAGGCTGAAGACAT and known to bind to the following sequence in the *C9orf72* mRNA: [(ATG)TCTTCAGCCTGCTCCACAAT]. A control AMO (mismatch), containing five mismatch nucleotides with the *C9orf72* AMO sequence and not binding anywhere in the zebrafish genome, was used to assess the specificity of the observed phenotype (ATTcTcGAGcACAGcCTcAAGACAT). For the genetic interaction experiments, microinjections were performed at 0.2 mM for *C9orf72*-AMO and 0.2 mM for *C9orf72*-mis. At these concentrations, *C9orf72* and mismatch AMOs do not lead to phenotypic features

associated with deficient swimming or morphological abnormalities (Ciura et al, 2013; Lattante et al, 2015a,b). For the percentage analysis, behavioral analysis, and axonal projections, more than three independent experiments were performed for each of the conditions including co-injections of *ATXN2* Q22x and *ATXN2* Q30x alongside *C9orf72* and mismatch AMOs. Zebrafish embryos at 48 hpf were analyzed for any morphological abnormalities and touched lightly at the level of the tail with a pipette tip with their locomotor behavior scored. Thus, for each injection set, larvae and embryos were separated into the following groups: dead, curly, and monster groups (developmentally aberrant fish). TEER episodes were performed only in zebrafish that appeared morphologically normal (normal TEER observed) and were recorded for each of the conditions with a Grasshopper 2 Camera (Point Grey Research) at 30 Hz. The videos were then analyzed using the manual tracking plugin of ImageJ 1.45r software, and the swim duration, swim distance, and maximum swim velocity of the fish were calculated as previously described (Ciura et al, 2013; Lattante et al, 2015b). To correlate gene expression with cell morphology, the axonal projections of motor neurons in selected HB9 zebrafish embryos GFP-positive at 48 hpf. In addition, axonal projections were labeled using the synaptic vesicle marker, SV2 as previously described (Kabashi et al, 2010). Fluorescent images of fixed embryos were taken using the fluorescence Automated Inverted Microscope System Olympus IX83 equipped with a Hamamatsu ORCA-flash 2.8 digital camera. Image acquisition was performed with the Olympus cellSens software. Axonal projections from primary motor neurons at a defined location in the intersomitic segments were determined. Analysis of Z-stacks by fluorescence microscopy was performed in three to four axonal projections per animal. The axonal length to the first branching was determined by tracing the labeled axon from the spinal cord to the point where it branches using ImageJ. These values were averaged for each of the animals analyzed (minimum 15 zebrafish per condition) for the various conditions. Primers for RT-qPCR quantification of HA-tagged *ATXN2* injected in zebrafish are F-TGGTTCTCCAGCTCCTGTCT and R-TGACCACTGATGACCACGTT. *ATXN2* levels were normalized to endogenous *Gapdh* (QuantiTect Primer Assay, Dr\_gapdh\_1\_SG).

### Statistical analysis

All cell experiments are represented as average  $\pm$  standard error of mean (SEM) with significance determined using Student's *t*-test. All data values for the zebrafish experiments are represented as average  $\pm$  standard error of mean (SEM) with significance determined using one-way ANOVAs.

**Expanded View** for this article is available online.

### Acknowledgements

We thank Pamela Mellon (UCSD, USA) for the gift of the GT1-7 cells; Terje Johansen (University of Tromsø, Norway) for the gift of the P62, OPTN, and LC3B plasmids; Jochen Weishaupt (Ulm University, Germany) for the gift of the TBK1 vector; and Aaron Gitler (Stanford University School of Medicine, USA) and Daisuke Ito (Keio University, Tokyo, Japan) for the gift of the Ataxin-2 plasmids. This work was supported by Fondation de France Thierry Latran #57486 "Model-ALS", AFM grant #18605 "Role of C9ORF72 in ALS-FTD", ERC-2012-StG #310659 "RNA DISEASES", ANR-10-LABX-0030-INRT, and

ANR-10-IDEX-0002-02 (NCB); Atip/Avenir from Inserm, Career Integration Grant (Marie Curie Actions), Robert Packard Foundation, E-rare ERA-NET program, AFM, ARSLA, France-Alzheimer Association, and the program "Investissements d'avenir" ANR-10-IAIHU-06 (EK). SC is supported by an AFM postdoctoral fellowship and M-LC by a postdoctoral fellowship from the Fondation Cognacq-Jay.

## Author contributions

Experiments were performed by CS, MLC, AG, IKC, CJC, MOA, FR and SC. Data were collected and analyzed by CS, AP, SC, EK, and NCB. The study was designed, coordinated, and written by CS, SC, EK, and NCB.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Almeida S, Gascon E, Tran H, Chou HJ, Gendron TF, Degroot S, Tapper AR, Sellier C, Charlet-Berguerand N, Karydas A, Seeley WW, Boxer AL, Petrucelli L, Miller BL, Gao FB (2013) Modeling key pathological features of frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansion in iPSC-derived human neurons. *Acta Neuropathol* 126: 385–399
- Al-Sarraj S, King A, Troakes C, Smith B, Maekawa S, Bodi I, Rogelj B, Al-Chalabi A, Hortobágyi T, Shaw CE (2011) P62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTL and MND/ALS. *Acta Neuropathol* 122: 691–702
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 602–611
- Arndt V, Dick N, Tawo R, Dreisidler M, Wenzel D, Hesse M, Fürst DO, Saftig P, Saint R, Fleischmann BK, Hoch M, Höfeld J (2010) Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr Biol* 20: 143–148
- Ash PE, Bieniek KF, Gendron TF, Caulfield T, Lin WL, van Blitterswijk MM, Jansen-West K, Paul JW 3rd, Rademakers R, Boylan KB, Dickson DW, Petrucelli L (2013) Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 77: 639–646
- Barmada SJ, Serio A, Arjun A, Bilican B, Daub A, Ando DM, Tsvetkov A, Pleiss M, Li X, Peisach D, Shaw C, Chandran S, Finkbeiner S (2014) Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models. *Nat Chem Biol* 10: 677–685
- Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW (2010) Network organization of the human autophagy system. *Nature* 466: 68–76
- van Blitterswijk M, Baker MC, DeJesus-Hernandez M, Ghidoni R, Benussi L, Finger E, Hsiung GY, Kelley BJ, Murray ME, Rutherford NJ, Brown PE, Ravenscroft T, Mullen B, Ash PE, Bieniek KF, Hatanpää KJ, Karydas A, Wood EM, Coppola G, Bigio EH et al (2013) C9ORF72 repeat expansions in cases with previously identified pathogenic mutations. *Neurology* 81: 1332–1341
- van Blitterswijk M, Gendron TF, Baker MC, DeJesus-Hernandez M, Finch NA, Brown PH, Daugherty LM, Murray ME, Heckman MG, Jiang J, Lagier-Tourenne C, Edbauer D, Cleveland DW, Josephs KA, Parisi JE, Knopman DS, Petersen RC, Petrucelli L, Boeve BF, Graff-Radford NR et al (2015) Novel clinical associations with specific C9ORF72 transcripts in patients with repeat expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol* 130: 863–876
- Bose JK, Huang CC, Shen CK (2011) Regulation of autophagy by neuropathological protein TDP-43. *J Biol Chem* 286: 44441–44448
- Brady OA, Zheng Y, Murphy K, Huang M, Hu F (2013) The frontotemporal lobar degeneration risk factor, TMEM106B, regulates lysosomal morphology and function. *Hum Mol Genet* 22: 685–695
- Buchan JR, Kolaitis RM, Taylor JP, Parker R (2013) Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function. *Cell* 153: 1461–1474
- Cady J, Allred P, Bali T, Pestronk A, Goate A, Miller TM, Mitra RD, Ravits J, Harms MB, Baloh RH (2015) Amyotrophic lateral sclerosis onset is influenced by the burden of rare variants in known amyotrophic lateral sclerosis genes. *Ann Neurol* 77: 100–113
- Chan EY, Kir S, Tooze SA (2007) siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem* 282: 25464–25474
- Chew J, Gendron TF, Prudencio M, Sasaguri H, Zhang YJ, Castaneda-Casey M, Lee CW, Jansen-West K, Kurti A, Murray ME, Bieniek KF, Bauer PO, Whitelaw EC, Rousseau L, Stankowski JN, Stetler C, Daugherty LM, Perkerson EA, Desaro P, Johnston A et al (2015) Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science* 348: 1151–1154
- Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS, Couthouis J, Lu YF, Wang Q, Krueger BJ, Ren Z, Keebler J, Han Y, Levy SE, Boone BE, Wimbish JR, Waite LL, Jones AL, Carulli JP, Day-Williams AG et al (2015) Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science* 347: 1436–1441
- Ciura S, Lattante S, Le Ber I, Latouche M, Tostivint H, Brice A, Kabashi E (2013) Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* 74: 180–187
- Cooper-Knock J, Walsh MJ, Higginbottom A, Robin Highley J, Dickman MJ, Edbauer D, Ince PG, Wharton SB, Wilson SA, Kirby J, Hautbergue GM, Shaw PJ (2014) Sequestration of multiple RNA recognition motif-containing proteins by C9orf72 repeat expansions. *Brain* 137: 2040–2051
- Daoud H, Belzil V, Martins S, Sabbagh M, Provencher P, Lacomblez L, Meininger V, Camu W, Dupré N, Dion PA, Rouleau GA (2011) Association of long ATXN2 CAG repeat sizes with increased risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 68: 739–742
- De StGroth SF, Scheidegger D (1980) Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods* 35: 1–21
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung GY, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR, Rademakers R (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72: 245–256
- Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H, Jiang H, Hirano M, Ropersaud E, Jansen GH, Donkervoort S, Bigio EH, Brooks BR, Ajroud K, Sufit RL, Haines JL et al (2011) Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477: 211–215
- Donnelly CJ, Zhang PW, Pham JT, Heusler AR, Mistry NA, Vidsensky S, Daley EL, Poth EM, Hoover B, Fines DM, Maragakis N, Tienari PJ, Petrucelli L, Traynor BJ, Blackshaw S, Sattler R, Rothstein JD (2013) RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron* 80: 415–428
- Dunlop EA, Seifan S, Claessens T, Behrends C, Kamps MA, Rozycka E, Kemp AJ, Nookala RK, Blenis J, Coull BJ, Murray JT, van Steensel MA, Wilkinson S,

- Tee AR (2014) FLCN, a novel autophagy component, interacts with GABARAP and is regulated by ULK1 phosphorylation. *Autophagy* 10: 1749–1760
- Eliden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, Armakola M, Geser F, Greene R, Lu MM, Padmanabhan A, Clay-Falcone D, McCluskey L, Elman L, Juhr D, Gruber PJ, Rüb U, Auburger G, Trojanowski JQ, Lee VM et al (2010) Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 466: 1069–1075
- Farg MA, Sundaramoorthy V, Sultana JM, Yang S, Atkinson RA, Levina V, Halloran MA, Gleeson PA, Blair IP, Soo KY, King AE, Atkin JD (2014) C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet* 23: 3579–3595
- Fecto F, Yan J, Vemula SP, Liu E, Yang Y, Chen W, Zheng JG, Shi Y, Siddique N, Arrat H, Donkervoort S, Ajroud-Driss S, Sufit RL, Heller SL, Deng HX, Siddique T (2011) SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 68: 1440–1446
- Ferrari R, Mok K, Moreno JH, Cosentino S, Goldman J, Pietrini P, Mayeux R, Tierney MC, Kapogiannis D, Jicha GA, Murrell JR, Ghetti B, Wassermann EM, Grafman J, Hardy J, Huey ED, Momeni P (2012) Screening for C9ORF72 repeat expansion in FTL. *Neurobiol Aging* 33: 1850.e1–1850.e11
- Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerød L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A (2007) Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* 179: 485–500
- Freibaum BD, Lu Y, Lopez-Gonzalez R, Kim NC, Almeida S, Lee KH, Badders N, Valentine M, Miller BL, Wong PC, Petrucelli L, Kim HJ, Gao FB, Taylor JP (2015) GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature* 525: 129–133
- Freischmidt A, Wieland T, Richter B, Ruf W, Schaeffer V, Müller K, Marroquin N, Nordin F, Hübers A, Weydt P, Pinto S, Press R, Millicamps S, Molko N, Bernard E, Desnuelle C, Soriani MH, Dorst J, Graf E, Nordström U et al (2015) Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci* 18: 631–636
- Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Yoshimura A, Tamai Y, Wada K, Kabuta T (2013) Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy* 9: 403–409
- Gamerding M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C (2009) Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J* 28: 889–901
- Gendron TF, Bieniek KF, Zhang YJ, Jansen-West K, Ash PE, Caulfield T, Daugherty L, Dunmore JH, Castanedes-Casey M, Chew J, Cosio DM, van Blitterswijk M, Lee WC, Rademakers R, Boylan KB, Dickson DW, Petrucelli L (2013) Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathol* 126: 829–844
- Giannandrea M, Bianchi V, Mignogna ML, Sirri A, Carrabino S, D'Elia E, Vecellio M, Russo S, Cogliati F, Larizza L, Ropers HH, Tzschach A, Kalscheuer V, Oehl-Jaschkowitz B, Skinner C, Schwartz CE, Gecz J, Van Esch H, Raynaud M, Chelly J et al (2010) Mutations in the small GTPase gene RAB39B are responsible for X-linked mental retardation associated with autism, epilepsy, and macrocephaly. *Am J Hum Genet* 86: 185–195
- Gijssels I, Van Langenhove T, van der Zee J, Sleegers K, Philtjens S, Kleinberger G, Janssens J, Bettens K, Van Cauwenbergh C, Pereson S, Engelborghs S, Van Dongen J, Vermeulen S, Van den Broeck M, Vaerenberg C, Mattheijssens M, Peeters K, Robberecht W, Cras P, Martin JJ et al (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: 54–65
- Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, Mayo K, Norton JB, Levitch D, Hatanpaa KJ, White CL 3rd, Bigio EH, Caselli R, Baker M, Al-Lozi MT, Morris JC, Pestronk A, Rademakers R, Goate AM, Cairns NJ (2008) TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann Neurol* 63: 535–538
- Goncalves A, Bürckstümmer T, Dixit E, Scheicher R, Górna MW, Karayel E, Sugar C, Stukalov A, Berg T, Kralovics R, Planyavsky M, Bennett KL, Colinge J, Superti-Furga G (2011) Functional dissection of the TBK1 molecular network. *PLoS ONE* 6: e23971
- Haeusler AR, Donnelly CJ, Periz G, Simko EA, Shaw PG, Kim MS, Maragakis NJ, Troncoso JC, Pandey A, Sattler R, Rothstein JD, Wang J (2014) C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature* 507: 195–200
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441: 885–889
- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N (2008) FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* 181: 497–510
- Hattula K, Peränen J (2000) FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. *Curr Biol* 10: 1603–1606.
- Heo JM, Ordureau A, Paulo JA, Rinehart J, Harper JW (2015) The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Mol Cell* 60: 7–20
- Hoffman NJ, Parker BL, Chaudhuri R, Fisher-Wellman KH, Kleinert M, Humphrey SJ, Yang P, Holliday M, Trefely S, Fazakerley DJ, Stöckli J, Burchfield JG, Jensen TE, Jothi R, Kiens B, Wojtaszewski JF, Richter EA, James DE (2015) Global Phosphoproteomic Analysis of Human Skeletal Muscle Reveals a Network of Exercise-Regulated Kinases and AMPK Substrates. *Cell Metab* 22: 922–935
- Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, Zhang Y, Ottina KA, Lim D, Peterson TR, Choi Y, Gray NS, Yaffe MB, Marto JA, Sabatini DM (2011) The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* 332: 1317–1322
- Hu F, Padukkavidana T, Vægter CB, Brady OA, Zheng Y, Mackenzie IR, Feldman HH, Nykjaer A, Strittmatter SM (2010) Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron* 68: 654–667
- Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier JM, Weber C, Mandel JL, Cancel G, Abbas N, Dürr A, Didierjean O, Stevanin G, Agid Y, Brice A (1996) Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet* 14: 285–291
- Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Gibbs JR, Brunetti M, Gronka S, Wu J, Ding J, McCluskey L, Martinez-Lage M, Falcone D, Battistini S, Salvi F, Spataro R, Sola P, Borghero G, Galassi G et al (2010) Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 68: 857–864
- Jovičić A, Mertens J, Boeynaems S, Bogaert E, Chai N, Yamada SB, Paul JW 3rd, Sun S, Herdy JR, Bieri G, Kramer NJ, Gage FH, Van Den Bosch L, Robberecht W, Gitler AD (2015) Modifiers of C9orf72 dipeptide repeat toxicity connect nucleocytoplasmic transport defects to FTD/ALS. *Nat Neurosci* 18: 1226–1229

- Ju JS, Fuentealba RA, Miller SE, Jackson E, Piwnicka-Worms D, Baloh RH, Weihl CC (2009) Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *J Cell Biol* 187: 875–888
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA (2008) TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40: 572–574
- Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, Dion PA, Bercier V, Bourguoin P, Rochefort D, Bel Hadj S, Durham HD, Vande Velde C, Rouleau GA, Drapeau P (2010) Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Hum Mol Genet* 19: 671–683
- Kim HJ, Raphael AR, LaDow ES, McGurk L, Weber RA, Trojanowski JQ, Lee VM, Finkbeiner S, Gitler AD, Bonini NM (2014) Therapeutic modulation of eIF2 $\alpha$  phosphorylation rescues TDP-43 toxicity in amyotrophic lateral sclerosis disease models. *Nat Genet* 46: 152–160
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441: 880–884
- Koppers M, Blokhuis AM, Westeneng HJ, Terpstra ML, Zundel CA, Vieira de Sá R, Schellevis RD, Waite AJ, Blake DJ, Veldink JH, van den Berg LH, Jeroen Pasterkamp R (2015) C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann Neurol* 78: 426–438
- Kozlov G, Trempe JF, Khaleghpour K, Kahvejian A, Ekiel I, Gehring K (2001) Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly (A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4409–4413
- Kwon I, Xiang S, Kato M, Wu L, Theodoropoulos P, Wang T, Kim J, Yun J, Xie Y, McKnight SL (2014) Poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeats bind nucleoli, impede RNA biogenesis, and kill cells. *Science* 345: 1139–1145
- Lagier-Tourenne C, Baughn M, Rigo F, Sun S, Liu P, Li HR, Jiang J, Watt AT, Chun S, Katz M, Qiu J, Sun Y, Ling SC, Zhu Q, Polymenidou M, Drenner K, Artates JW, McAlonis-Downes M, Markmiller S, Hutt KR et al (2013) Targeted degradation of sense and antisense C9orf72 RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E4530–E4539
- Lattante S, Millicamps S, Stevanin G, Rivaud-Péchéux S, Moigneu C, Camuzat A, Da BS, Mundwiller E, Couarch P, Salachas F, Hannequin D, Meininger V, Pasquier F, Seilhean D, Couratier P, Danel-Brunaud V, Bonnet AM, Tranchant C, LeGuern E, Brice A et al (2014) Contribution of ATXN2 intermediary polyQ expansions in a spectrum of neurodegenerative disorders. *Neurology* 83: 990–995
- Lattante S, Ciura S, Rouleau GA, Kabashi E (2015a) Defining the genetic connection linking amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with frontotemporal dementia (FTD). *Trends Genet* 31: 263–273
- Lattante S, de Calbiac H, Le Ber I, Brice A, Ciura S, Kabashi E (2015b) Sqt1 knock-down causes a locomotor phenotype ameliorated by rapamycin in a zebrafish model of ALS/FTLD. *Hum Mol Genet* 24: 1682–1690
- Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, Sideris DP, Fogel AI, Youle RJ (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524: 309–314
- Lee YB, Chen HJ, Peres JN, Gomez-Deza J, Attig J, Stalekar M, Troakes C, Nishimura AL, Scotter EL, Vance C, Adachi Y, Sardone V, Miller JW, Smith BN, Gallo JM, Ule J, Hirth F, Rogelj B, Houart C, Shaw CE (2013) Hexanucleotide repeats in ALS/FTD form length-dependent RNA foci, sequester RNA binding proteins, and are neurotoxic. *Cell Rep* 5: 1178–1186
- Levine TP, Daniels RD, Gatta AT, Wong LH, Hayes MJ (2013) The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinformatics* 29: 499–503
- Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller B (2002) The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* 59: 1077–1079
- Ma X, Helgason E, Phung QT, Quan CL, Iyer RS, Lee MW, Bowman KK, Starovasnik MA, Dueber EC (2012) Molecular basis of Tank-binding kinase 1 activation by transautophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 9378–9383
- Majcher V, Goode A, James V, Layfield R (2015) Autophagy receptor defects and ALS-FTLD. *Mol Cell Neurosci* 66: 43–52.
- Majounie E, Renton AE, Mok K, Doppler EG, Waite A, Rollinson S, Chiò A, Restagno G, Nicolaou N, Simon-Sanchez J, van Swieten JC, Abramzon Y, Johnson JO, Sendtner M, Pamphlett R, Orrell RW, Mead S, Sidle KC, Houlden H, Rohrer JD et al (2012) Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 11: 323–330.
- Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T et al (2010) Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465: 223–226
- Matsumoto G, Shimogori T, Hattori N, Nukina N (2015) TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated mitochondria through P62/SQSTM1 phosphorylation. *Hum Mol Genet* 24: 4429–4442
- May S, Hornburg D, Schludi MH, Arzberger T, Rentzsch K, Schwenk BM, Grässer FA, Mori K, Kremmer E, Banzhaf-Strathmann J, Mann M, Meissner F, Edbauer D (2014) C9orf72 FTLD/ALS-associated Gly-Ala dipeptide repeat proteins cause neuronal toxicity and Unc119 sequestration. *Acta Neuropathol* 128: 485–503
- Mizielinska S, Lashley T, Norona FE, Clayton EL, Ridler CE, Fratta P, Isaacs AM (2013) C9orf72 frontotemporal lobar degeneration is characterised by frequent neuronal sense and antisense RNA foci. *Acta Neuropathol* 126: 845–857
- Mizielinska S, Grönke S, Niccoli T, Ridler CE, Clayton EL, Devoy A, Moens T, Norona FE, Woollacott IO, Pietrzyk J, Cleverley K, Nicoll AJ, Pickering-Brown S, Dols J, Cabecinha M, Hendrich O, Fratta P, Fisher EM, Partridge L, Isaacs AM (2014) C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in *Drosophila* through arginine-rich proteins. *Science* 345: 1192–1194
- Mori K, Lammich S, Mackenzie IR, Forné I, Zilow S, Kretzschmar H, Edbauer D, Janssens J, Kleinberger G, Cruts M, Herms J, Neumann M, Van Broeckhoven C, Arzberger T, Haass C (2013a) hnRNP A3 binds to GGGGCC repeats and is a constituent of P62-positive/TDP43-negative inclusions in the hippocampus of patients with C9orf72 mutations. *Acta Neuropathol* 125: 413–423
- Mori K, Weng SM, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, Schmid B, Kretzschmar HA, Cruts M, Van Broeckhoven C, Haass C, Edbauer D (2013b) The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTLD/ALS. *Science* 339: 1335–1338
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314: 130–133

- Nixon RA (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* 19: 983–997
- Nookala RK, Langemeyer L, Pacitto A, Ochoa-Montañón B, Donaldson JC, Blaszczyk BK, Chirgadze DY, Barr FA, Bazan JF, Blundell TL (2012) Crystal structure of folliculin reveals a hidDENN function in genetically inherited renal cancer. *Open Biol* 2: 120071
- O'Rourke JG, Bogdanik L, Muhammad AK, Gendron TF, Kim KJ, Austin A, Cady J, Liu EY, Zarrow J, Grant S, Ho R, Bell S, Carmona S, Simpkinson M, Lall D, Wu K, Daugherty L, Dickson DW, Harms MB, Petrucelli L et al (2015) C9orf72 BAC Transgenic Mice Display Typical Pathologic Features of ALS/FTD. *Neuron* 88: 892–901
- Peters OM, Cabrera GT, Tran H, Gendron TF, McKeon JE, Metterville J, Weiss A, Wightman N, Salameh J, Kim J, Sun H, Boylan KB, Dickson D, Kennedy Z, Lin Z, Zhang YJ, Daugherty L, Jung C, Gao FB, Sapp PC et al (2015) Human C9ORF72 Hexanucleotide Expansion Reproduces RNA Foci and Dipeptide Repeat Proteins but Not Neurodegeneration in BAC Transgenic Mice. *Neuron* 88: 902–909
- Petit CS, Rocznik-Ferguson A, Ferguson SM (2013) Recruitment of folliculin to lysosomes supports the amino acid-dependent activation of Rag GTPases. *J Cell Biol* 202: 1107–1122
- Pilli M, Arko-Mensah J, Ponpuak M, Roberts E, Master S, Mandell MA, Dupont N, Ornatoński W, Jiang S, Bradfute SB, Bruun JA, Hansen TE, Johansen T, Deretic V (2012) TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation. *Immunity* 37: 223–234
- Pottier C, Bieniek KF, Finch N, van de Vorst M, Baker M, Perkerson R, Brown P, Ravenscroft T, van Blitterswijk M, Nicholson AM, DeTure M, Knopman DS, Josephs KA, Parisi JE, Petersen RC, Boylan KB, Boeve BF, Graff-Radford NR, Veltman JA, Gilissen C et al (2015) Whole-genome sequencing reveals important role for TBK1 and OPTN mutations in frontotemporal lobar degeneration without motor neuron disease. *Acta Neuropathol* 130: 77–92
- Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Díaz G, Lunkes A, DeJong P, Rouleau GA, Auburger G, Korenberg JR, Figueroa C, Sahba S (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 14: 269–276
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG et al (2011) A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72: 257–268
- Ringholz GM, Appel SH, Bradshaw M, Cooke NA, Mosnik DM, Schulz PE (2005) Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* 65: 586–590
- Ross OA, Rutherford NJ, Baker M, Soto-Ortolaza AI, Carrasquillo MM, DeJesus-Hernandez M, Adamson J, Li M, Volkening K, Finger E, Seeley WW, Hatanpää KJ, Lomen-Hoerth C, Kertesz A, Bigio EH, Lippa C, Woodruff BK, Knopman DS, White CL 3rd, Van Gerpen JA et al (2011) Ataxin-2 repeat-length variation and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 20: 3207–3212
- Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, Gass JM, Finch NA, Xu YF, Stewart H, Kelley BJ, Kuntz K, Crook RJ, Sreedharan J, Vance C, Sorenson E, Lippa C, Bigio EH, Geschwind DH, Knopman DS, Mitsumoto H, Petersen RC, Cashman NR et al (2008) Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet* 4: e1000193
- Sanpei K, Takano H, Igarashi S, Sato T, Oyake M, Sasaki H, Wakisaka A, Tashiro K, Ishida Y, Ikeuchi T, Koide R, Saito M, Sato A, Tanaka T, Hanyu S, Takiyama Y, Nishizawa M, Shimizu N, Nomura Y, Segawa M et al (1996) Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nat Genet* 14: 277–284
- Sato T, Iwano T, Kunii M, Matsuda S, Mizuguchi R, Jung Y, Hagiwara H, Yoshihara Y, Yuzaki M, Harada R, Harada A (2014) Rab8a and Rab8b are essential for several apical transport pathways but insufficient for ciliogenesis. *J Cell Sci* 127: 422–431
- Schaffer BE, Levin RS, Hertz NT, Maures TJ, Schoof ML, Hollstein PE, Benayoun BA, Banko MR, Shaw RJ, Shokat KM, Brunet A (2015) Identification of AMPK Phosphorylation Sites Reveals a Network of Proteins Involved in Cell Invasion and Facilitates Large-Scale Substrate Prediction. *Cell Metab* 22: 907–921
- Scotter EL, Vance C, Nishimura AL, Lee YB, Chen HJ, Urwin H, Sardone V, Mitchell JC, Rogelj B, Rubinsztein DC, Shaw CE (2014) Differential roles of the ubiquitin proteasome system and autophagy in the clearance of soluble and aggregated TDP-43 species. *J Cell Sci* 127: 1263–1278
- Seto S, Sugaya K, Tsujimura K, Nagata T, Horii T, Koide Y (2013) Rab39a interacts with phosphatidylinositol 3-kinase and negatively regulates autophagy induced by lipopolysaccharide stimulation in macrophages. *PLoS ONE* 8: e83324
- Skibinski G1, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thüsgaard T, Johannsen P, Sørensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J (2005) Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* 37: 806–808.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319: 1668–1672
- Sun N, Yun J, Liu J, Malide D, Liu C, Rovira II, Holmström KM, Fergusson MM, Yoo YH, Combs CA, Finkel T (2015) Measuring In Vivo Mitophagy. *Mol Cell* 60: 685–696
- Suzuki N, Maroof AM, Merkle FT, Koszka K, Intoh A, Armstrong I, Moccia R, Davis-Dusenberry BN, Eggan K (2013) The mouse C9ORF72 ortholog is enriched in neurons known to degenerate in ALS and FTD. *Nat Neurosci* 16: 1725–1727
- Tao Z, Wang H, Xia Q, Li K, Li K, Jiang X, Xu G, Wang G, Ying Z (2015) Nucleolar stress and impaired stress granule formation contribute to C9orf72 RAN translation-induced cytotoxicity. *Hum Mol Genet* 24: 2426–2441
- Taylor JP (2015) Multisystem proteinopathy: Intersecting genetics in muscle, bone, and brain degeneration. *Neurology* 85: 658–660
- Thurston TL, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N, Randow F (2009) The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol* 10: 1215–1221
- Tsun ZY, Bar-Peled L, Chantranupong L, Zoncu R, Wang T, Kim C, Spooner E, Sabatini DM (2013) The folliculin tumor suppressor is a GAP for the RagC/D GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Mol Cell* 52: 495–505
- Uchino A, Takao M, Hatsuta H, Sumikura H, Nakano Y, Nogami A, Saito Y, Arai T, Nishiyama K, Murayama S (2015) Incidence and extent of TDP-43 accumulation in aging human brain. *Acta Neuropathol Commun*. 20: 35
- Urushitani M, Sato T, Bamba H, Hisa Y, Tooyama I (2010) Synergistic effect between proteasome and autophagosome in the clearance of polyubiquitinated TDP-43. *J Neurosci Res* 88: 784–797
- Van Blitterswijk M, van Es MA, Hennekam EA, Dooijes D, van Rheenen W, Medic J, Bourque PR, Schelhaas HJ, van der Kooij AJ, de Visser M, de Bakker PI, Veldink JH, van den Berg LH (2012) Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 21: 3776–3784

- Van Damme P, Veldink JH, van Blitterswijk M, Corveleyn A, van Vught PW, Thijs V, Dubois B, Matthijs G, van den Berg LH, Robberecht W (2011) Expanded ATXN2 CAG repeat size in ALS identifies genetic overlap between ALS and SCA2. *Neurology* 76: 2066–2072
- Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, Bird TD, Yuan W, Elman LB, Clay D, Wood EM, Chen-Plotkin AS, Martinez-Lage M, Steinbart E, McCluskey L, Grossman M, Neumann M, Wu IL, Yang WS, Kalb R, Galasko DR, Montine TJ, Trojanowski JQ et al (2008) TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet Neurol* 7: 409–416
- Waite AJ, Bäumer D, East S, Neal J, Morris HR, Ansorge O, Blake DJ (2014) Reduced C9orf72 protein levels in frontal cortex of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal degeneration brain with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion. *Neurobiol Aging* 35:1779.e5–1779.e13
- Wang IF, Guo BS, Liu YC, Wu CC, Yang CH, Tsai KJ, Shen CK (2012) Autophagy activators rescue and alleviate pathogenesis of a mouse model with proteinopathies of the TAR DNA-binding protein 43. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 15024–15029
- Wen X, Tan W, Westergard T, Krishnamurthy K, Markandaiah SS, Shi Y, Lin S, Shneider NA, Monaghan J, Pandey UB, Pasinelli P, Ichida JK, Trotti D (2014) Antisense proline-arginine RAN dipeptides linked to C9ORF72-ALS/FTD form toxic nuclear aggregates that initiate in vitro and in vivo neuronal death. *Neuron* 84: 1213–1225
- West RJ, Lu Y, Marie B, Gao FB, Sweeney ST (2015) Rab8, POSH, and TAK1 regulate synaptic growth in a *Drosophila* model of frontotemporal dementia. *J Cell Biol* 208: 931–947
- Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, Richter B, Korac J, Waidmann O, Choudhary C, Dötsch V, Bumann D, Dikic I (2011) Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* 333: 228–233
- Wilke C, Pomper JK, Biskup S, Puskás C, Berg D, Synofzik M (2016) Atypical parkinsonism in C9orf72 expansions: a case report and systematic review of 45 cases from the literature. *J Neurol* 263: 558–574
- Wilson GR, Sim JC, McLean C, Giannandrea M, Galea CA, Riseley JR, Stephenson SE, Fitzpatrick E, Haas SA, Pope K, Hogan KJ, Gregg RG, Bromhead CJ, Wargowski DS, Lawrence CH, James PA, Churchyard A, Gao Y, Phelan DG, Gillies G et al (2014) Mutations in RAB39B cause X-linked intellectual disability and early-onset Parkinson disease with  $\alpha$ -synuclein pathology. *Am J Hum Genet* 95: 729–735
- Wong E, Cuervo AM (2010) Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 13: 805–811
- Xia Q, Wang H, Hao Z, Fu C, Hu Q, Gao F, Ren H, Chen D, Han J, Ying Z, Wang G (2016) TDP-43 loss of function increases TFEB activity and blocks autophagosome-lysosome fusion. *EMBO J* 35: 121–142
- Xu J, Fotouhi M, McPherson PS (2015) Phosphorylation of the exchange factor DENND3 by ULK in response to starvation activates Rab12 and induces autophagy. *EMBO Rep* 16: 709–718
- Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, Tagawa A, Kaneko H, Koyama A, Eguchi H, Tsujino A, Ikeuchi T, Kakita A, Okamoto K, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O (2008) TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 63: 538–542
- Yokoshi M, Li Q, Yamamoto M, Okada H, Suzuki Y, Kawahara Y (2014) Direct binding of Ataxin-2 to distinct elements in 3' UTRs promotes mRNA stability and protein expression. *Mol Cell* 55: 186–198
- Zhang D, Iyer LM, He F, Aravind L (2012) Discovery of Novel DENN Proteins: Implications for the Evolution of Eukaryotic Intracellular Membrane Structures and Human Disease. *Front Genet* 13: 283
- Zhang YJ, Jansen-West K, Xu YF, Gendron TF, Bieniek KF, Lin WL, Sasaguri H, Caulfield T, Hubbard J, Daugherty L, Chew J, Belzil VV, Prudencio M, Stankowski JN, Castanedes-Casey M, Whitelaw E, Ash PE, DeTure M, Rademakers R, Boylan KB et al (2014) Aggregation-prone c9FTD/ALS poly (CA) RAN-translated proteins cause neurotoxicity by inducing ER stress. *Acta Neuropathol* 128: 505–524
- Zhang K, Donnelly CJ, Haeusler AR, Grima JC, Machamer JB, Steinwald P, Daley EL, Miller SJ, Cunningham KM, Vidensky S, Gupta S, Thomas MA, Hong I, Chiu SL, Haganir RL, Ostrow LW, Matunis MJ, Wang J, Sattler R, Lloyd TE et al (2015) The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature* 525: 56–61
- Zu T, Liu Y, Bañez-Coronel M, Reid T, Pletnikova O, Lewis J, Miller TM, Harms MB, Falchook AE, Subramony SH, Ostrow LW, Rothstein JD, Troncoso JC, Ranum LP (2013) RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E4968–E4977

## Expanded View Figures

**Figure EV1. Validation of the protein interacting with C9ORF72.**

- A Immunoblot analysis of endogenous proteins found associated by proteomic analysis with control or Flag-HA-tagged C9ORF72 expressed in N2A cells.
- B Immunoblot analysis of HA-immunoprecipitated proteins and lysate of HEK293 cells co-expressing HA-tagged long or short splicing variant of C9ORF72 with Flag-tagged SMCR8 and Flag-tagged WDR41.
- C Immunoblot analysis of HA-immunoprecipitated proteins and lysate of HEK293 cells co-expressing HA-tagged C9ORF72 and/or HA-tagged SMCR8 and/or HA-tagged WDR41 with Flag-tagged HSC70.
- D Left panel, immunoblot analysis of HA-immunoprecipitated proteins and lysate of HEK293 cells co-expressing either HA-tagged C9ORF72, HA-tagged SMCR8, or HA-tagged WDR41 with Flag-tagged RAB8A. Right panel, immunoblot analysis of HA-immunoprecipitated proteins and lysate of HEK293 cells co-expressing either HA-tagged C9ORF72, HA-tagged SMCR8, or HA-tagged WDR41 with Flag-tagged RAB39b.
- E Immunoblot analysis of HA-immunoprecipitated proteins and lysate of HEK293 cells co-expressing HA-tagged SMCR8 with various Flag-tagged Rab GTPases.
- F Immunoblot analysis of endogenous expression of Smcr8, Rab8a, Rab39b, and Gapdh in mouse adult tissues and primary culture of E18 cortical mouse neurons.
- G <sup>32</sup>P-radiolabelled GDP release from GST-tagged purified RAB8a, RAB39b, RAB29 (also known as RAB7L1), and RAB32 as a function of increased concentration of recombinant purified HIS-C9ORF72:SMCR8:WDR41 complex purified from baculovirus-infected insect cells. Error bars indicate SEM, N = 3.

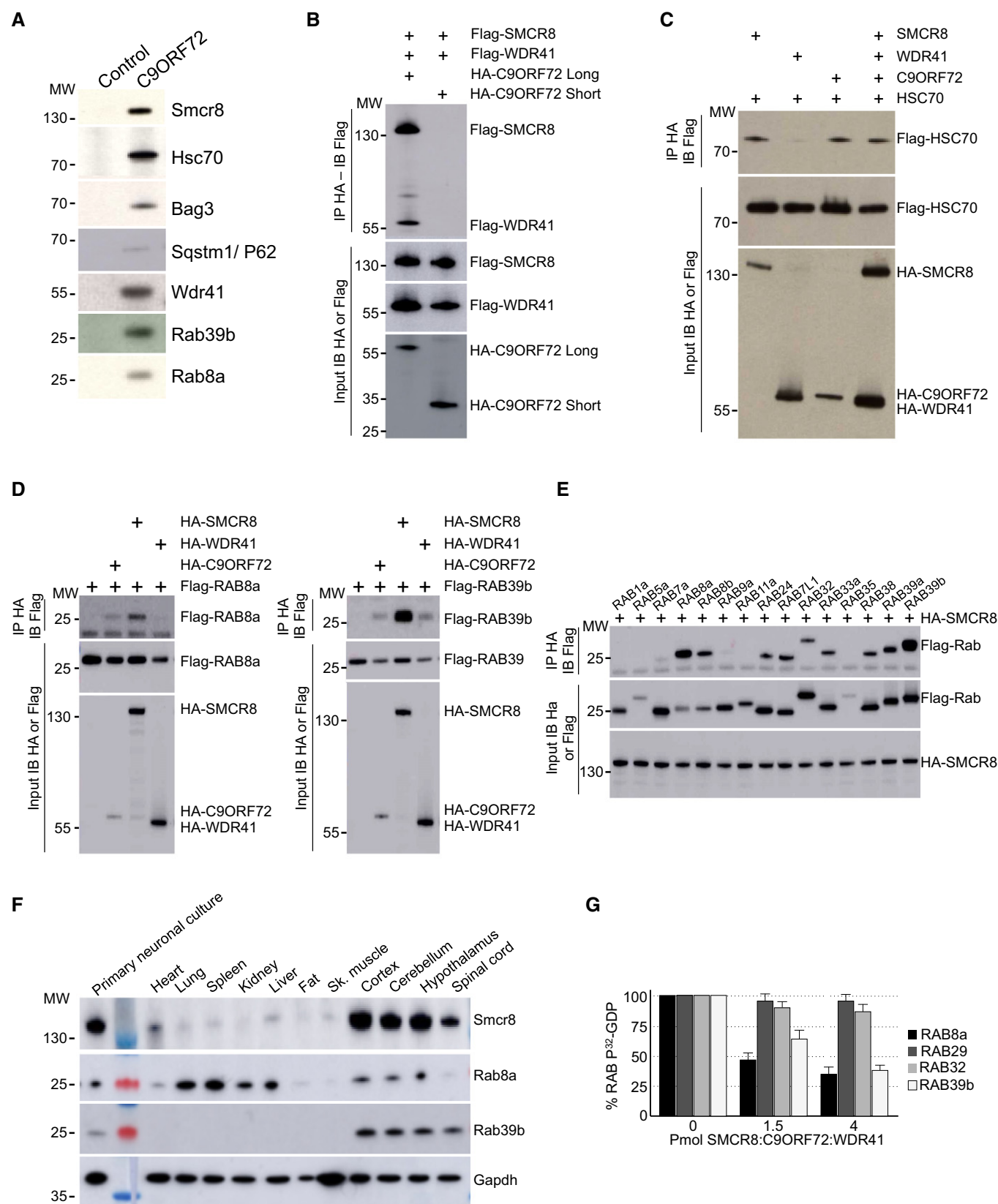


Figure EV1.

**Figure EV2. Reduced expression of C9ORF72 partly impairs autophagy.**

- A Immunoblot analysis of HA-immunoprecipitated proteins and lysate of HEK293 cells co-expressing either HA-tagged C9ORF72, HA-tagged SMCR8, or HA-tagged WDR41 with Flag-tagged P62.
- B Immunoblot analysis of HA-immunoprecipitated proteins and lysate of HEK293 cells co-expressing either HA-tagged C9ORF72, HA-tagged SMCR8, or HA-tagged WDR41 with Flag-tagged OPTN.
- C Immunoblot analysis of HA-immunoprecipitated proteins and lysate of HEK293 cells co-expressing either HA-tagged RAB8a or HA-tagged RAB39b with Flag-tagged P62.
- D Representative images of mouse GT1-7 neuronal cells co-transfected with GFP-RFP-LC3B and either control siRNA or siRNA targeting endogenous *C9orf72* mRNA and treated or not with Torin.
- E Upper panel, immunoblot analysis of endogenous LC3B (Map1lc3b), *C9orf72* and control Gapdh and actin of GT1-7 neuronal cells transfected with either control siRNA or siRNA targeting *C9orf72* mRNA and treated or not with Torin and/or bafilomycin A. Lower panel, real-time RT-qPCR quantification of endogenous *C9orf72* mRNA expression relative to *Rplp0* mRNA.
- F Left panel, representative images of immunofluorescence labeling of endogenous P62 (Sqstm1) on GT1-7 neuronal cells transfected with either control siRNA or siRNA targeting either *C9orf72*, *Smcr8*, or *Wdr41* mRNA. Right panel, quantification of P62 aggregates.
- G Left panel, representative merged images of immunofluorescence labeling of transfected constructs (green) and endogenous P62 (Sqstm1, red) on GT1-7 neuronal cells transfected with control siRNA or siRNA targeting *C9orf72* and plasmids expressing control GFP or HA-tagged long or short isoform of C9ORF72. Right panel, quantification of P62 aggregates.

Data information: Scale bars, 10  $\mu$ m. Nuclei were counterstained with DAPI. Error bars indicate SEM. Student's t-test, \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 3$ .

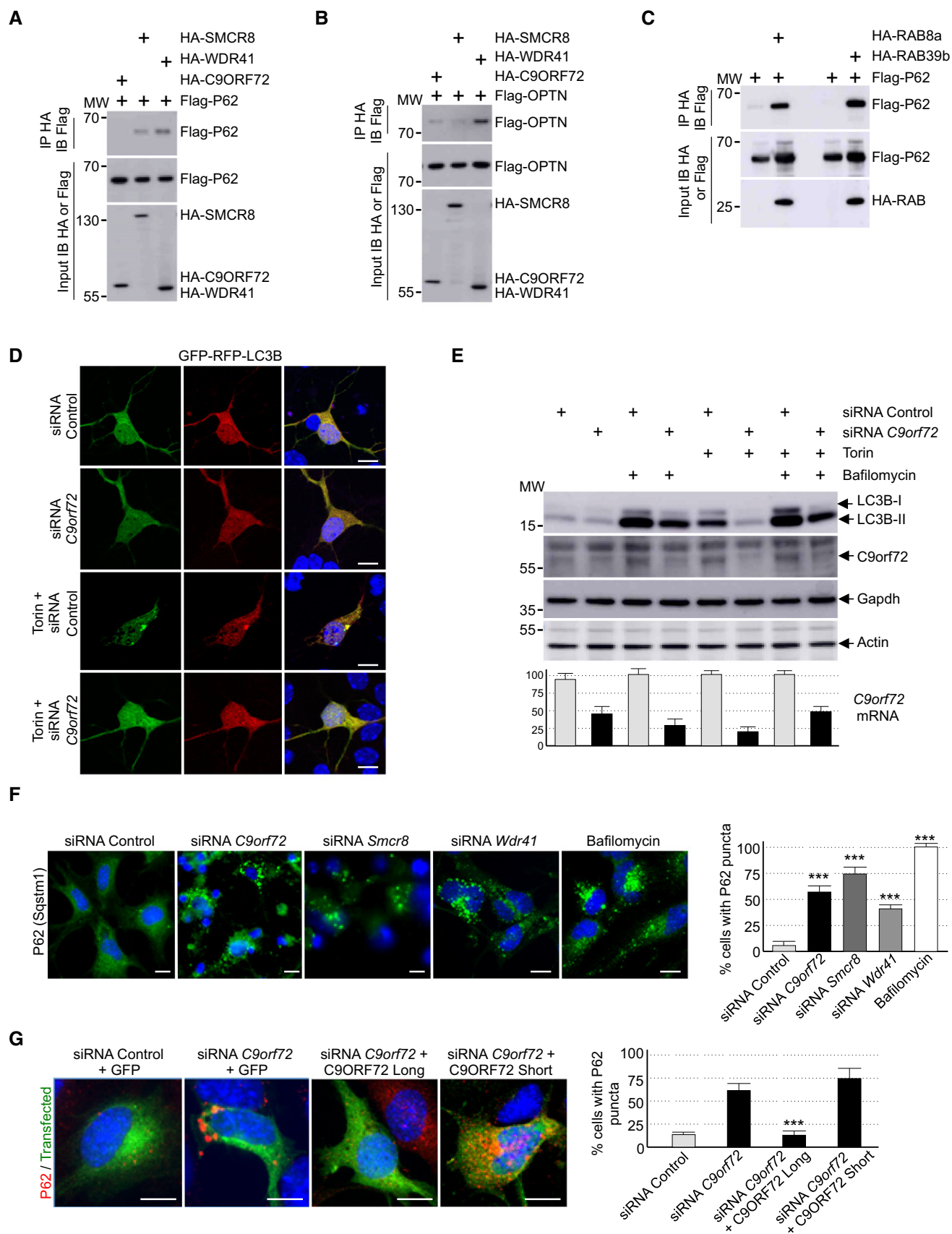


Figure EV2.

**Figure EV3. SMCR8 is phosphorylated by ULK1.**

- A Immunoblot analysis of endogenous Smcr8 or Gapdh in GT1-7 cells transfected with control siRNA or a siRNA targeting the 3'UTR of *Smcr8*.
- B Immunoblot analysis of endogenous Tbk1 or Gapdh in GT1-7 cells transfected with control siRNA or a siRNA targeting *Tbk1*.
- C Immunoblot analysis of HA-immunoprecipitated proteins and lysate of HEK293 cells co-expressing HA-tagged C9ORF72 and/or HA-tagged SMCR8 and/or HA-tagged WDR41 with Flag-tagged ULK1.
- D HA-tagged C9ORF72, HA-tagged SMCR8, and HA-tagged WDR41 were co-expressed in HEK293, immunoprecipitated, and subjected to *in vitro* ULK1 kinase assay in the presence of  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-radiolabelled ATP. Proteins were separated by migration on SDS-PAGE gel and phosphorylation was detected by autoradiography (upper panel), while expression was detected by Western blotting (lower panel).
- E Recombinant HIS-tagged C9ORF72:SMCR8:WDR41 complex purified from baculovirus-infected insect cells was phosphorylated *in vitro* by ULK1 and SMCR8 phosphorylation sites were identified by mass spectrometry.
- F Upper panel, representative images of immunofluorescence labeling of endogenous P62 (Sqstm1, red) on GT1-7 neuronal cells transfected with control siRNA or siRNA targeting *Tbk1* or *Ulk1* and *Ulk2*. Lower panel, quantification of P62 aggregates.

Data information: Error bars indicate SEM,  $n = 3$ . Scale bars, 10  $\mu$ m. Nuclei were counterstained with DAPI.

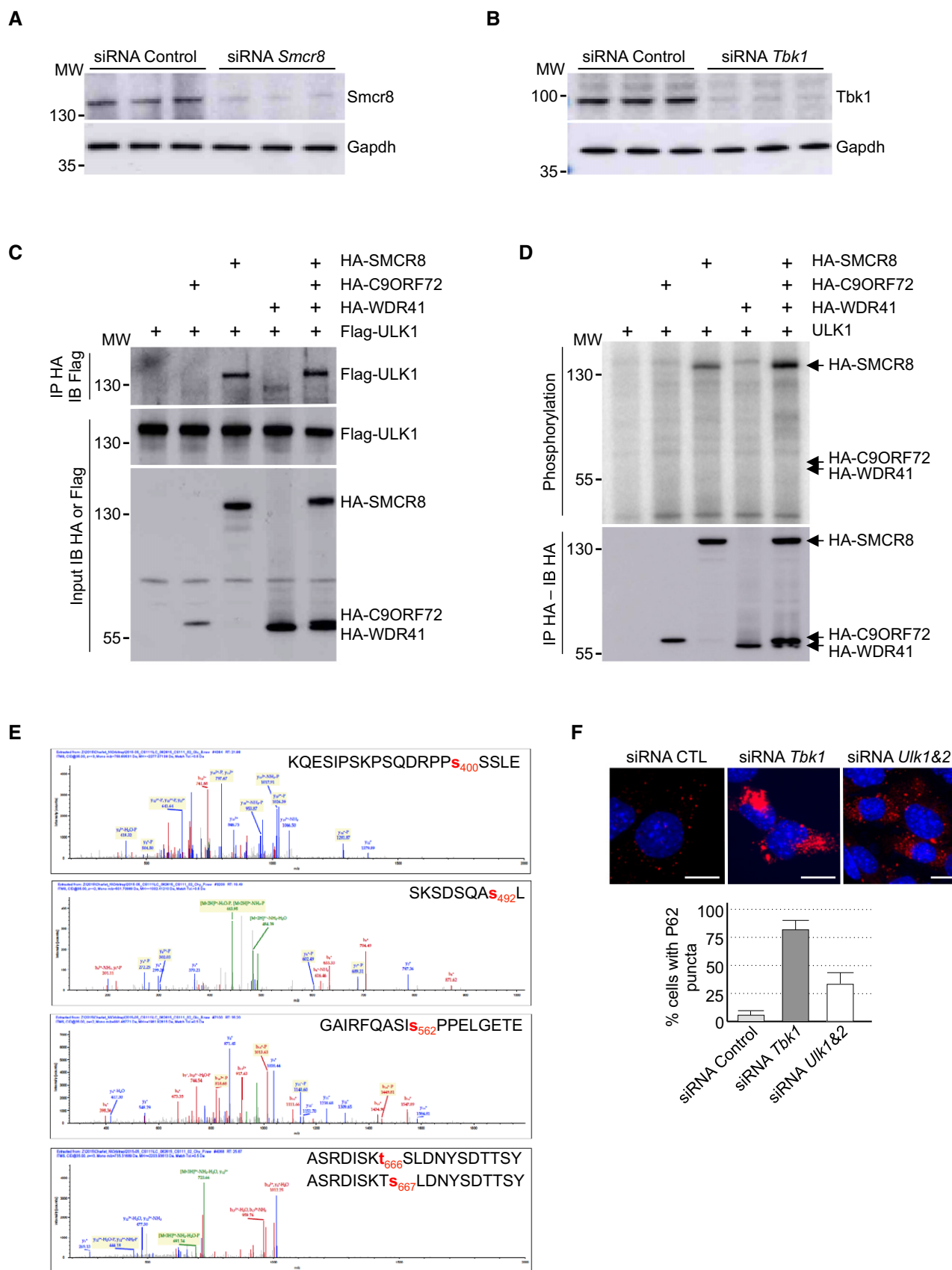
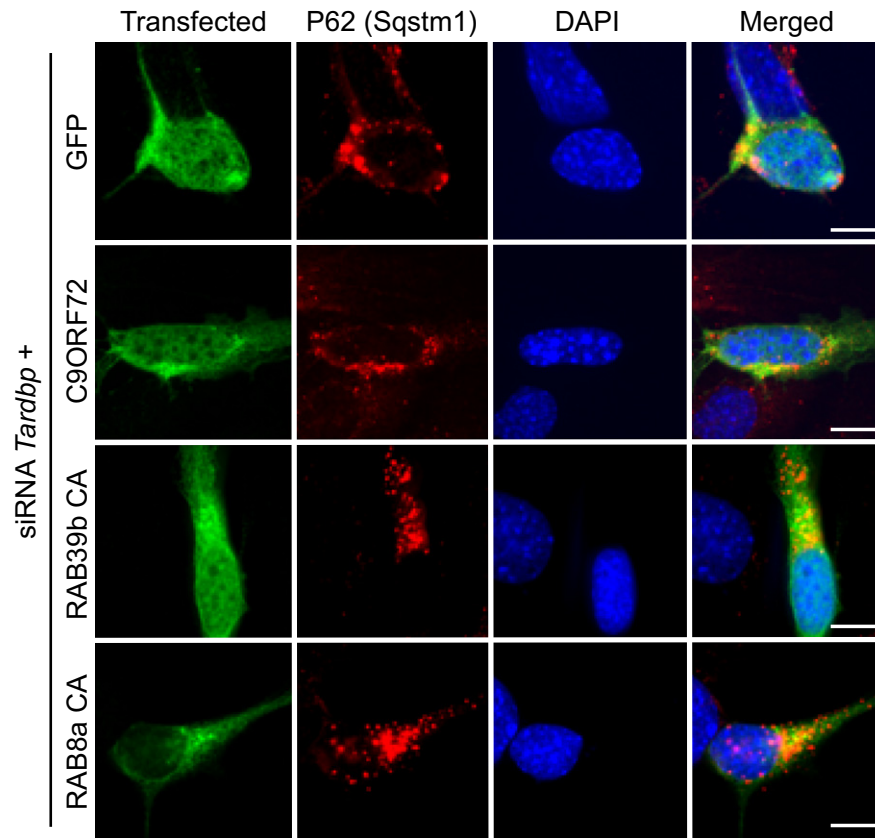
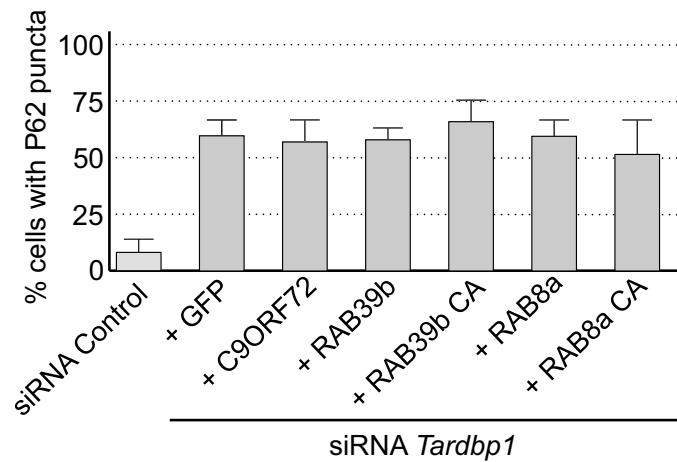


Figure EV3.



**Figure EV4. Reduced expression of C9ORF72 promotes aggregation of TDP-43.**

Upper panel, representative images of immunofluorescence labeling of transfected constructs (green) and endogenous P62 (Sqstm1, red) on GT1-7 neuronal cells transfected with siRNA targeting *Tardbp* and plasmids expressing control GFP and HA-tagged C9ORF72 or wild-type or mutant RAB8a or RAB39b. Lower panel, quantification of P62 aggregates. Error bars indicate SEM,  $n = 3$ .



**Figure EV5. Reduced expression of C9ORF72 synergizes Ataxin-2 toxicity.**

- A Representative images of GT1-7 neuronal cells co-transfected with HA-tagged ATXN2 with control (Q22x) or intermediate (Q30x) polyQ size and either control siRNA or siRNA targeting endogenous *C9orf72* mRNA.
- B, C Immunoblot analysis of endogenous *Gapdh* or transfected HA-tagged Ataxin-2 with (B) control (Q22x) length or (C) intermediate (Q30x) length of polyQ in GT1-7 cells.
- D Representative images of GT1-7 neuronal cells co-transfected with either GFP-tagged mutant SOD1, FUS, HTT, or Ataxin-3 and either control siRNA or siRNA targeting endogenous *C9orf72* mRNA.
- E RT-qPCR quantification of endogenous *C9orf72* expression relative to *Gapdh* mRNA in mismatched or *C9orf72* antisense morpholino oligonucleotide (AMO)-injected zebrafish.
- F RT-qPCR quantification of exogenous HA-tagged ATXN2 with normal (Q22x) or intermediate (Q30x) length of polyQ relative to endogenous *Gapdh* mRNA in zebrafish injected with control or HA-tagged ATXN2 constructs and with mismatched AMOs or AMOs against *C9orf72*.
- G Tracing of the swimming trajectories of 48 h post-fertilization zebrafish larvae following light touch.
- H–J Quantification of the touch-evoked swimming distance (H), average velocity (I), and maximum velocity attained (J) shows no impairment upon the sole injection of HA-tagged ATXN2 with control (Q22x) or intermediate length of polyQ (Q30x). Similarly, injection of mismatched antisense morpholino oligonucleotides (AMOs) against *C9orf72* alone or with HA-tagged ATXN2 Q22x or Q30x shows no functional alterations.

Data information: Scale bars, 10  $\mu$ m. Nuclei were counterstained with DAPI. Error bars indicate SEM,  $n = 3$ .

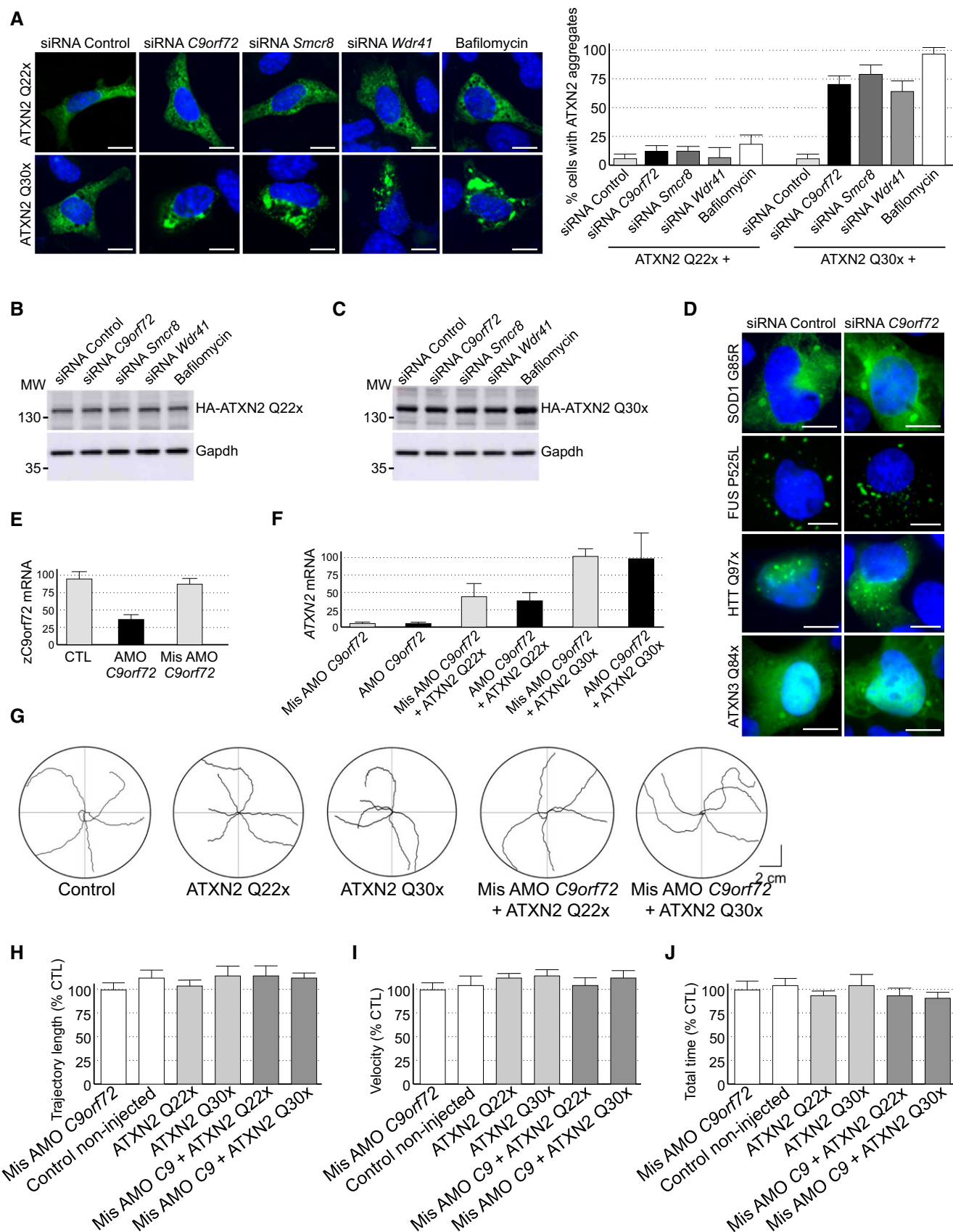


Figure EV5.

Table EV1

| Description                                                                                                                   | Score | Coverage | #<br>Peptides | # PSM | MW [kDa] |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|----------|---------------|-------|----------|
| Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Mus musculus GN=Hspa8 PE=1 SV=1 - [HSP7C_MOUSE]                                          | 595   | 60       | 31            | 152   | 646      |
| Probable helicase senataxin OS=Mus musculus GN=Setx PE=2 SV=1 - [SETX_MOUSE]                                                  | 211   | 26       | 42            | 54    | 297      |
| Tyrosine-protein kinase JAK1 OS=Mus musculus GN=Jak1 PE=1 SV=1 - [JAK1_MOUSE]                                                 | 162   | 41       | 32            | 42    | 133      |
| Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Mus musculus GN=Dync1h1 PE=1 SV=2 - [DYHC1_MOUSE]                                       | 156   | 12       | 36            | 41    | 532      |
| E3 ubiquitin-protein ligase UBR4 OS=Mus musculus GN=Ubr4 PE=1 SV=1 - [UBR4_MOUSE]                                             | 102   | 10       | 28            | 28    | 572      |
| Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Mus musculus GN=Hsp90aa1 PE=1 SV=4 - [HS90A_MOUSE]                                         | 89    | 37       | 19            | 23    | 733      |
| BAG family molecular chaperone regulator 3 OS=Mus musculus GN=Bag3 PE=1 SV=2 - [BAG3_MOUSE]                                   | 70    | 31       | 13            | 17    | 577      |
| Smith-Magenis syndrome chromosomal region candidate gene 8 protein homolog OS=Mus musculus GN=Smcr8 PE=1 SV=2 - [SMCR8_MOUSE] | 45    | 26       | 11            | 12    | 105      |
| WD repeat-containing protein 41 OS=Mus musculus GN=Wdr41 PE=2 SV=1 - [WDR41_MOUSE]                                            | 28    | 24       | 7             | 8     | 51       |
| Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 OS=Mus musculus GN=Iqgap1 PE=1 SV=2 - [IQGA1_MOUSE]                                 | 33    | 6        | 7             | 8     | 189      |
| Vesicle-fusing ATPase OS=Mus musculus GN=Nsf PE=1 SV=2 - [NSF_MOUSE]                                                          | 26    | 14       | 7             | 7     | 83       |
| Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1 OS=Mus musculus GN=Ambra1 PE=1 SV=1 - [AMRA1_MOUSE]                | 31    | 9        | 6             | 7     | 143      |
| Sequestosome-1 OS=Mus musculus GN=Sqstm1 PE=1 SV=1 - [SQSTM_MOUSE]                                                            | 29    | 31       | 6             | 6     | 48       |
| TAR DNA-binding protein 43 OS=Mus musculus GN=Tardbp PE=1 SV=1 - [TADBP_MOUSE]                                                | 23    | 22       | 6             | 6     | 45       |
| Dynactin subunit 1 OS=Mus musculus GN=Dctn1 PE=1 SV=3 - [DCTN1_MOUSE]                                                         | 22    | 8        | 6             | 6     | 142      |
| STIP1 homology and U box-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Stub1 PE=1 SV=1 - [CHIP_MOUSE]                               | 22    | 3        | 5             | 6     | 304      |
| Ras-related protein Rab-39B OS=Mus musculus GN=Rab39b PE=2 SV=1 - [RB39B_MOUSE]                                               | 17    | 33       | 5             | 5     | 25       |
| RB1-inducible coiled-coil protein 1 OS=Mus musculus GN=Rb1cc1 PE=1 SV=3 - [RBCC1_MOUSE]                                       | 12    | 3        | 4             | 4     | 182      |
| Ras-related protein Rab-8A OS=Mus musculus GN=Rab8a PE=1 SV=2 - [RAB8A_MOUSE]                                                 | 12    | 18       | 3             | 3     | 24       |
| Vesicle-trafficking protein SEC22b OS=Mus musculus GN=Sec22b PE=1 SV=3 - [SC22B_MOUSE]                                        | 12    | 17       | 3             | 3     | 25       |
| Regulatory-associated protein of mTOR OS=Mus musculus GN=Rptor PE=1 SV=1 - [RPTOR_MOUSE]                                      | 11    | 3        | 3             | 3     | 149      |
| Vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog OS=Mus musculus GN=Vps16 PE=1 SV=3 - [VPS16_MOUSE]                     | 10    | 5        | 3             | 3     | 95       |
| Ras-related protein Rab-33B OS=Mus musculus GN=Rab33b PE=1 SV=1 - [RB33B_MOUSE]                                               | 9     | 3        | 3             | 3     | 26       |
| 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 OS=Mus musculus GN=Psmd8 PE=1 SV=2 - [PSMD8_MOUSE]                             | 8     | 13       | 2             | 2     | 40       |
| Proteasome subunit alpha type-4 OS=Mus musculus GN=Psm4 PE=1 SV=1 - [PSA4_MOUSE]                                              | 7     | 13       | 2             | 2     | 29       |
| Ras-related protein Rab-26 OS=Mus musculus GN=Rab26 PE=2 SV=2 - [RAB26_MOUSE]                                                 | 7     | 13       | 2             | 2     | 22       |
| 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10 OS=Mus musculus GN=Psmd10 PE=1 SV=3 - [PSD10_MOUSE]                           | 8     | 13       | 2             | 2     | 25       |
| Syntaxin-17 OS=Mus musculus GN=Stx17 PE=1 SV=1 - [STX17_MOUSE]                                                                | 7     | 11       | 2             | 2     | 33       |
| E3 ubiquitin-protein ligase RNF126 OS=Mus musculus GN=Rnf126 PE=1 SV=1 - [RN126_MOUSE]                                        | 8     | 9        | 2             | 2     | 34       |
| Serine/threonine-protein kinase TBK1 OS=Mus musculus GN=Tbk1 PE=1 SV=1 - [TBK1_MOUSE]                                         | 8     | 4        | 2             | 2     | 83       |
| Ras-related protein Rab-6A OS=Mus musculus GN=Rab6a PE=1 SV=4 - [RAB6A_MOUSE]                                                 | 7     | 7        | 2             | 2     | 24       |
| Vacuolar protein sorting-associated protein 4B OS=Mus musculus GN=Vps4b PE=1 SV=2 - [VPS4B_MOUSE]                             | 8     | 7        | 2             | 2     | 49       |
| Sorting nexin-6 OS=Mus musculus GN=Snx6 PE=1 SV=2 - [SNX6_MOUSE]                                                              | 7     | 7        | 2             | 2     | 47       |
| 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 OS=Mus musculus GN=Psmd4 PE=1 SV=1 - [PSMD4_MOUSE]                             | 8     | 7        | 2             | 2     | 41       |
| Dynactin subunit 2 OS=Mus musculus GN=Dctn2 PE=1 SV=3 - [DCTN2_MOUSE]                                                         | 7     | 6        | 2             | 2     | 44       |
| TBC1 domain family member 22A OS=Mus musculus GN=Tbc1d22a PE=1 SV=3 - [TB22A_MOUSE]                                           | 8     | 6        | 2             | 2     | 59       |
| Sorting and assembly machinery component 50 homolog OS=Mus musculus GN=Samm50 PE=1 SV=1 - [SAM50_MOUSE]                       | 7     | 5        | 2             | 2     | 52       |
| E3 ubiquitin-protein ligase RLIM OS=Mus musculus GN=Rlim PE=1 SV=2 - [RNF12_MOUSE]                                            | 10    | 5        | 2             | 2     | 66       |
| Sorting nexin-8 OS=Mus musculus GN=Snx8 PE=2 SV=1 - [SNX8_MOUSE]                                                              | 7     | 5        | 2             | 2     | 52       |
| Atlastin-2 OS=Mus musculus GN=Atl2 PE=1 SV=1 - [ATLA2_MOUSE]                                                                  | 7     | 5        | 2             | 2     | 66       |
| Synaptic vesicle glycoprotein 2A OS=Mus musculus GN=Sv2a PE=1 SV=1 - [SV2A_MOUSE]                                             | 7     | 5        | 2             | 2     | 83       |
| WD repeat-containing protein 35 OS=Mus musculus GN=Wdr35 PE=2 SV=3 - [WDR35_MOUSE]                                            | 6     | 3        | 2             | 2     | 134      |
| 5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1 OS=Mus musculus GN=Prkaa1 PE=1 SV=2 - [AAPK1_MOUSE]                 | 7     | 3        | 2             | 2     | 64       |
| E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 OS=Mus musculus GN=Huwe1 PE=1 SV=5 - [HUWE1_MOUSE]                                          | 7     | 1        | 2             | 2     | 482      |

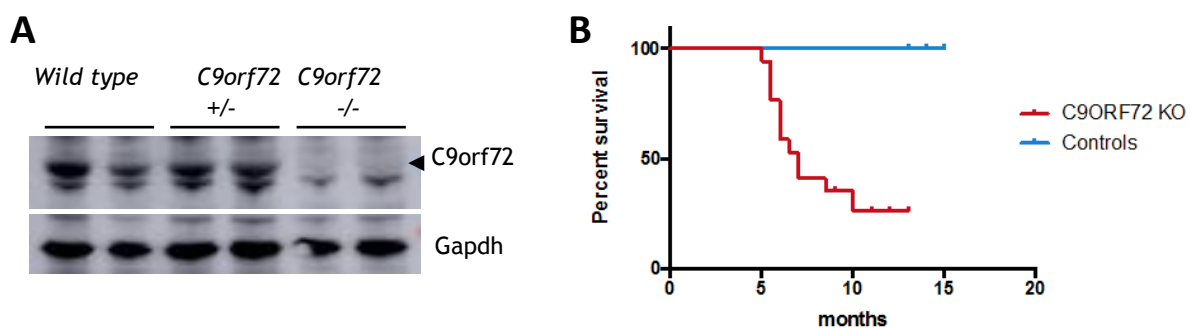
**Table EV1. Proteins potentially interacting with C9ORF72.**  
Proteins associated with tandem-tagged C9ORF72 expressed in mouse N2A neuronal cells were captured through consecutive anti-Flag and anti-HA affinity purification steps and identified by orbitrap ion trap mass analyzer.

# **RESULTATS**

## **Partie 2**

**Caractérisation du modèle murin**

***C9orf72 KO***



**Figure 18 : knock out du gène C9orf72 en modèle murin : contrôle de l'expression de C9orf72 et effet sur la longévité des animaux**

A) Immunoblot dirigé contre les protéines Gapdh et C9orf72 endogènes sur des lysats de cerveaux des souris C9orf72 KO homozygotes, hétérozygotes et wild type..

B) Test de Kaplan Meyer permettant d'évaluer la survie des 12 animaux mâles C9orf72 loxP/loxP x CMV Cre homozygotes comparée à celle des 9 animaux mâles wild type utilisés lors de l'étude.

# RESULTATS PARTIE 2

## Caractérisation du modèle murin *C9orf72*KO

### I. Modèle murin *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre

#### A. Génération du modèle murin *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et vérification du génotype

Nous avons obtenu de la clinique de la souris (ICS, Illkirch) des animaux avec les exons 5 et 6 de *C9orf72* encadrés par deux séquences flox et des souris exprimant la Cre recombinase sous contrôle d'un promoteur CMV, et donc exprimée dans l'ensemble de l'organisme. Le croisement de ces animaux nous a permis d'obtenir des individus homozygotes *C9orf72* loxP/loxP et hétérozygotes pour la CMV-Cre (figure 15). La perte des exons 5 et 6 de *C9orf72* conduit à un changement du cadre de lecture et donc à l'apparition de codons stop prématurés qui devraient entraîner la dégradation de cet ARN messager et donc une perte d'expression de *C9orf72*. Afin de confirmer cette prédiction, nous avons réalisé des immunoblots sur des lysats de cerveaux de souris contrôles (*C9orf72* wild type / wild type x CMV Cre), *C9orf72* loxP / wild type x CMV Cre (hétérozygotes *C9orf72* KO) et *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre (homozygotes *C9orf72* KO) (figure 18, A). Malgré la mauvaise qualité des anticorps commerciaux, nous pouvons remarquer une absence de marquage pour les homozygotes à la taille attendue pour *C9orf72*, ce qui nous indique une perte d'expression de cette protéine chez ces souris. Toutefois, il est à noter que les individus hétérozygotes présentent la même

expression de la protéine que les souris wild type, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de compensation de la diminution d'expression de l'allèle *C9orf72* floxé par l'allèle wild type.

Ayant confirmé que nous avons accès à un modèle murin knock out pour le gène *C9orf72*, nous avons alors étudié la viabilité de ces animaux. Une courbe de survie Kaplan-Meier (figure 18, B) indique que les souris homozygotes *C9orf72* meurent prématurément en comparaison aux souris wild type. En effet, les souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre commencent à mourir à partir de 5 mois, et environ 75% des animaux sont morts avant l'âge de 12 mois. Nous pouvons donc en conclure que la perte totale de *C9orf72* engendre une réduction de la durée de vie en modèle murin homozygote.

Toutefois, il convient de mentionner que ces résultats de viabilité ont été obtenus à l'animalerie IGBMC conventionnelle, qui est contaminée par certains pathogènes, notamment le virus MMLV (Moloney murine leukemia virus). Des animaux homozygotes pour la perte de *C9orf72* et hébergés en animalerie SPF (Specific Pathogen Free) à l'ICS, présentent, eux, une espérance de vie quasiment normale, suggérant ainsi que le statut sanitaire puisse modifier le phénotype de ces souris. Cette différence trouve peut-être son explication dans le rôle de *C9ORF72* dans la réponse virale médiée par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (*cf.* Résultats paragraphe II.A.5).

## B. Absence de symptômes correspondant à une SLA/DFT dans le modèle murin *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre KO

Afin d'évaluer si notre modèle murin knock out pour *C9orf72* développait des signes de SLA ou de DFT, nous avons fait phénotyper une cohorte de douze souris mâles homozygotes

(*C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre) par l'Institut Clinique de la Souris. Nous avons ensuite comparé leurs résultats avec ceux d'une cohorte de neuf mâles wild type.

### 1. *Suivi du poids des animaux C9orf72 loxP/loxP x CMV Cre*

Le suivi du poids de ces animaux montre une diminution de poids significative et d'environ 3g des souris KO homozygotes pour *C9orf72* comparées aux souris wild type à l'âge de six mois (figure 19). En effet, les mâles *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre ont presque deux fois moins de masse grasseuse que les souris wild type (2,5g au lieu de 5g en moyenne), ce qui est significatif à  $p < 0,01$ . Ces résultats suggèrent donc un rôle de la protéine *C9orf72* dans l'adipogénèse et/ou dans le métabolisme. Cependant, concernant la masse « maigre », nous n'observons aucune différence entre souris KO et wild type, un résultat relativement décevant sachant que la SLA engendre une atrophie musculaire et donc une perte de poids.

### 2. *Phénotype locomoteur*

Afin d'observer d'éventuels signes de SLA, l'ICS a alors testé les capacités locomotrices de ces animaux *C9orf72* KO. En figure 20.A, nous pouvons observer l'activité locomotrice de souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et de souris wild type sur une durée de 35h. Cependant, nous n'observons cependant aucune différence significative d'activité locomotrice pour nos individus *C9orf72* KO, hormis une mesure à 20h la deuxième nuit. De même, si nous nous intéressons à la distance totale parcourue par les animaux (figure 20.B), nous ne remarquons pas de différence entre les individus KO et les wild type, qui parcourent tous environ 110m.

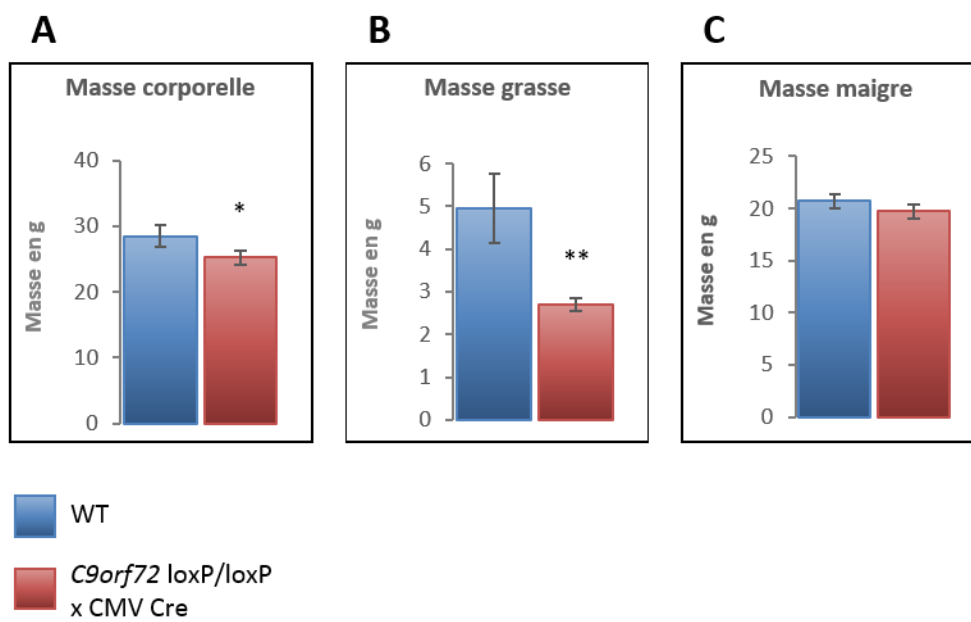
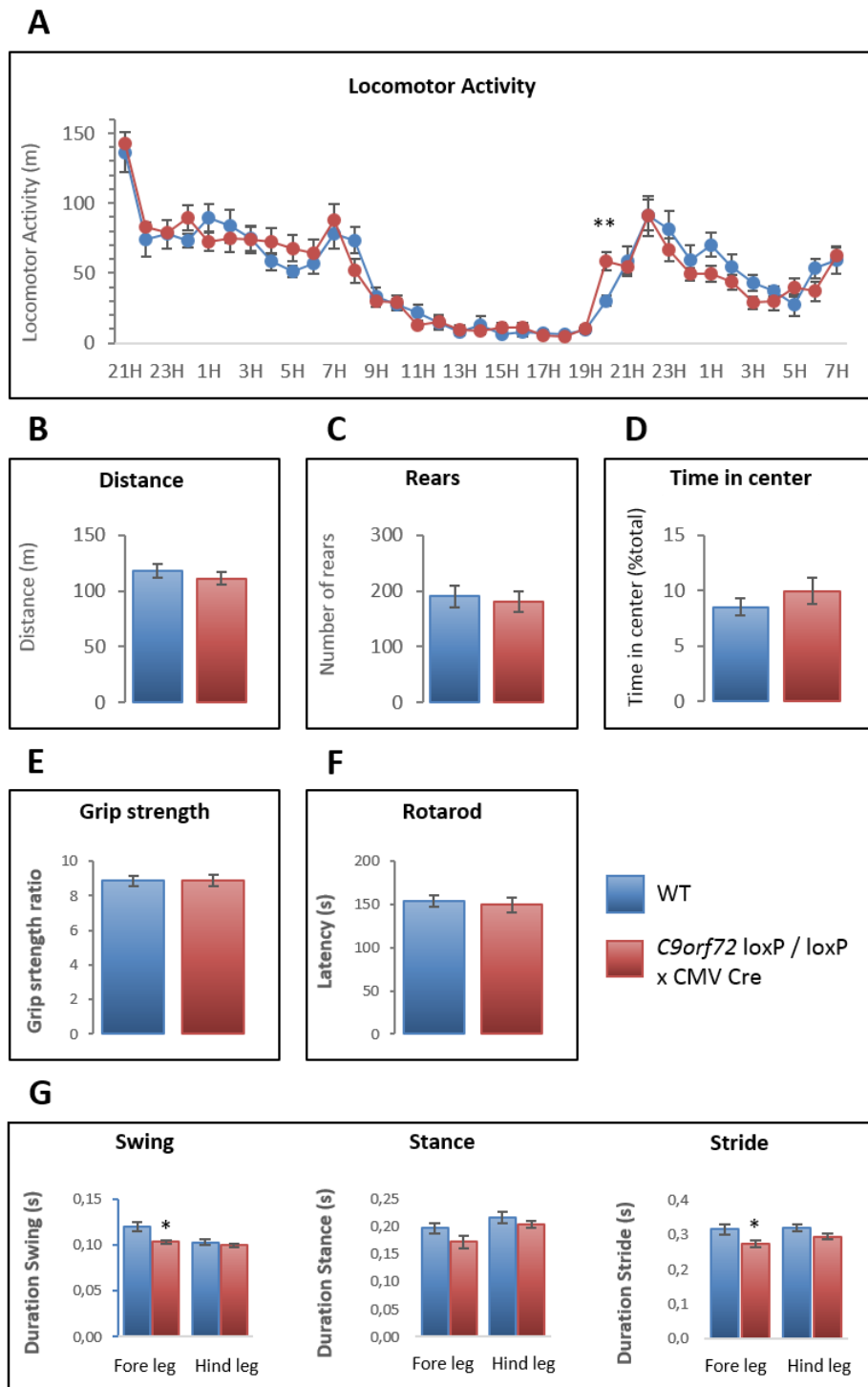


Figure 19 : Histogramme montrant les masses corporelles totales et le contenu en masse grasse et en masse maigre des animaux *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre

Mesures réalisées sur 6 animaux mâles *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et wild type de 6 mois.

A) Masse corporelle totale des animaux. B) Masse grasse des animaux. C) Masse maigre des animaux.

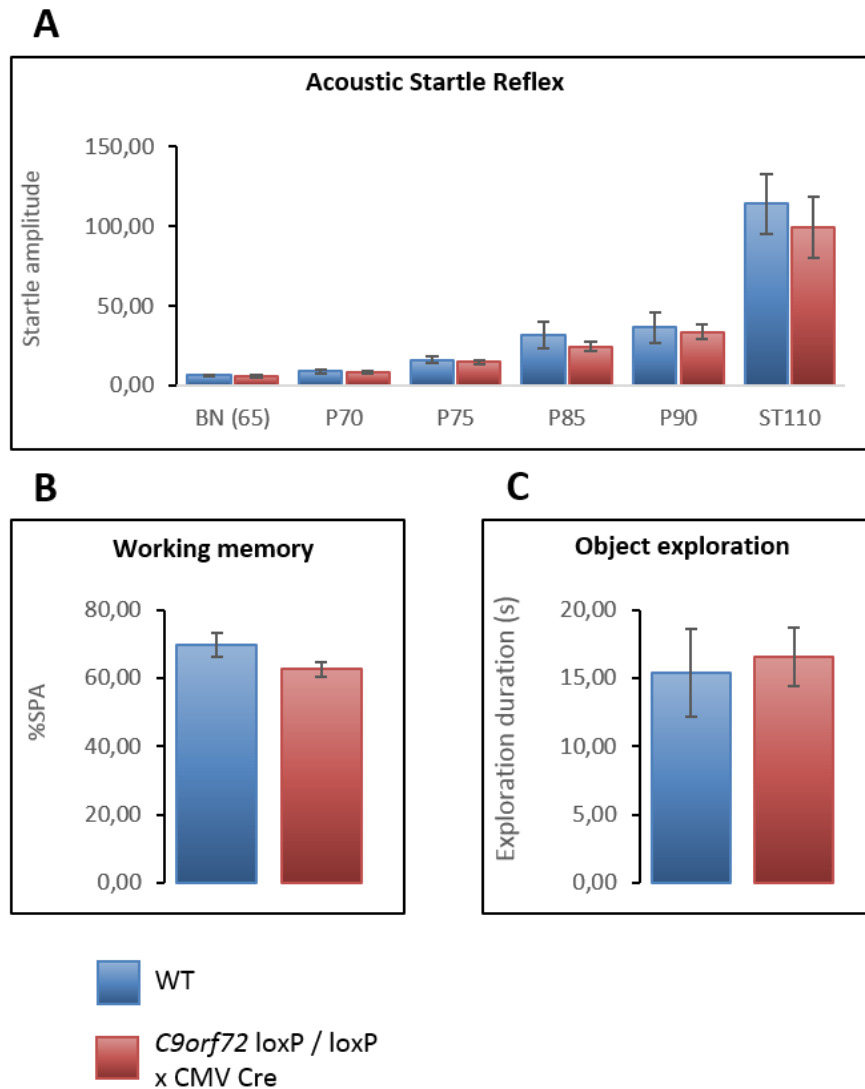
\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$



**Figure 20 : Tests locomoteurs des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre**

12 mâles *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et 9 mâles wild type de 6 mois ont été phénotypés par la plateforme de phénotypage de l'ICS.

A) Suivi de l'activité locomotrice des animaux dans leur cage sur une période de 35h, \*\* :  $p < 0,01$ . B) Distance totale parcourue en m en Open Field. C) Nombre total de redressements des animaux en Open Field. D) Pourcentage de temps passé au centre en Open Field sur le temps total dans l'Open Field. E) Test d'agrippement : le ratio correspond à la force en grammes sur la masse totale des animaux. F) Test du Rotarod, mesure du temps moyen avant la chute du Rotarod par les animaux en secondes. G) Evaluation de la démarche des animaux par « Catwalk ».



**Figure 21 : Tests cognitifs des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre**

12 mâles *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et 9 mâles wild type de 6 mois ont été phénotypés par la plateforme de phénotypage de l'ICS.

A) Test de réflexe acoustique. B) Test de mémoire réalisé dans un Y-maze. C) Test d'exploration d'objets.

Cette étude ne montre pas non plus de différence significative entre souris KO et wild type pour le nombre de redressements des animaux (figure 20.C), ni pour le pourcentage de temps passé au centre de la cage (figure 20.D), qui donne des indications sur le niveau d'anxiété et de stress des animaux. Des tests d'agrippement (figure 20.E) et de rotarod (figure 20.F) ont alors été réalisés pour mesurer la force musculaire, l'équilibre et l'endurance des animaux *C9orf72* KO comparés aux wild type. Toutefois, nous n'observons pas de différences significatives entre souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et animaux wild type. Enfin, une étude de la démarche des animaux sur « Catwalk » (figure 20.G), montre une légère différence dans le Swing (temps où la patte est levée lors de la marche) et le Stride (temps total entre deux placements de la patte) concernant les pattes avant des animaux *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre comparés aux wild type, cependant cette différence n'est significative qu'à  $p < 0,05$  et n'est pas observable pour les pattes arrière des animaux.

En conclusion, ces résultats indiquent que les souris knock out pour le gène *C9orf72* ne montrent pas de problèmes locomoteurs particuliers laissant supposer qu'elles développent des signes de SLA. De même, les animaux hétérozygotes *C9orf72* loxP/ wild type x CMV Cre ne présentent aucun trouble locomoteur, même à l'âge de 18 mois.

### 3. *Phénotype cognitif*

L'expansion de répétitions GGGGCC dans le gène *C9ORF72* menant aussi à une DFT, nous nous sommes intéressés au comportement social et à différentes fonctions sensorielles et cognitives des souris *C9orf72* KO (figure 21). Malheureusement, comme pour les tests locomoteurs, nous n'observons aucune différence significative entre souris *C9orf72*

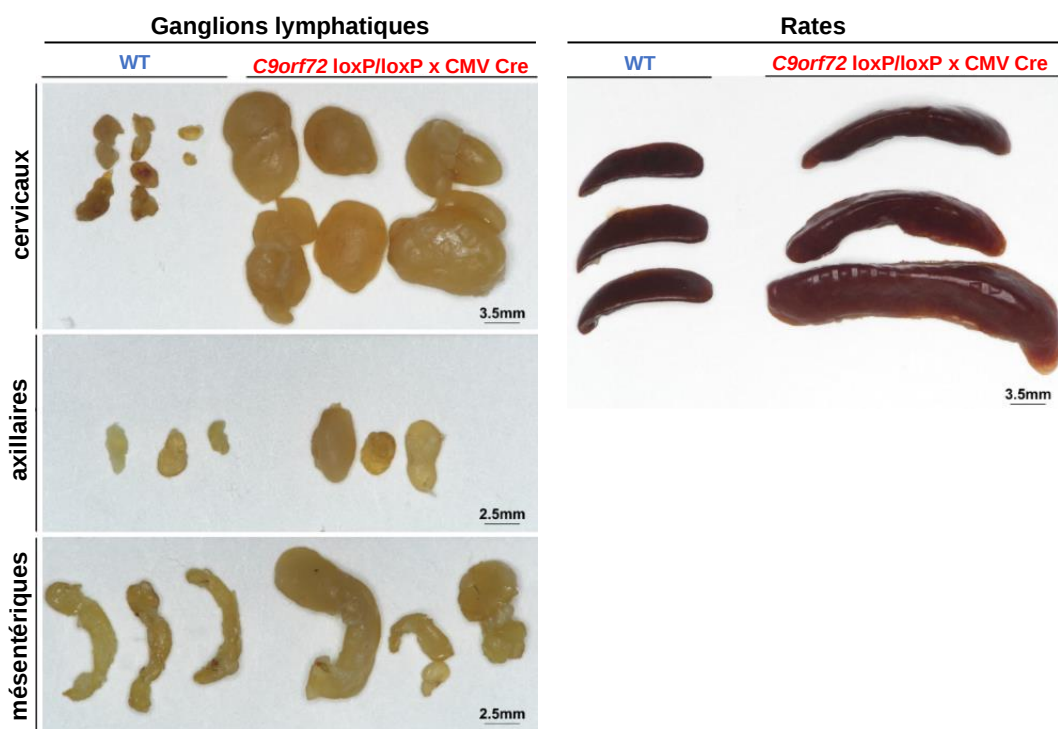


Figure 22 : Photographies montrant les ganglions lymphatiques et les rates de souris wild type et *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre

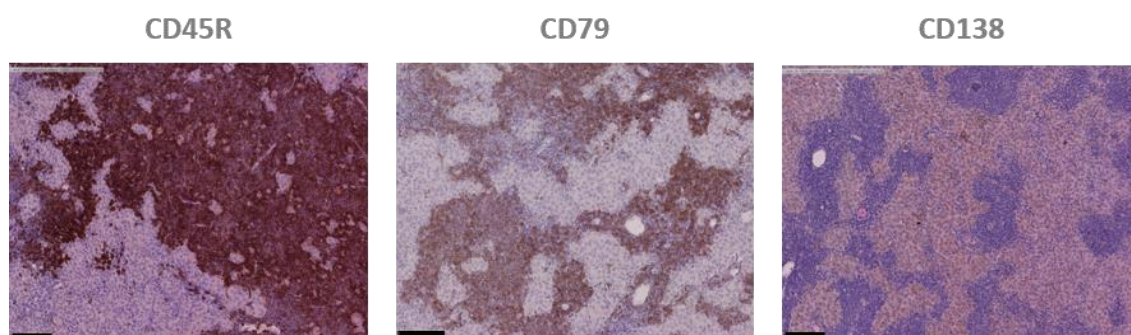
loxP/loxP x CMV Cre et individus wild type. En effet, le test de sursaut acoustique, qui est une réponse réflexe provoquée par un stimulus sonore brusque, ne montre pas de différence chez les souris C9orf72 KO (figure 21.A). De même, le test du labyrinthe en Y ne montre pas de différence de la mémoire spatiale à court terme (figure 21.B). Enfin, le temps d'exploration d'un objet est semblable entre souris C9orf72 KO et les wild type (figure 21.C).

En conclusion, ces résultats suggèrent que l'absence d'expression de C9ORF72 ne semble pas conduire à des altérations locomotrices ou cognitives évidentes chez la souris. Il est à noter que des résultats identiques ont été observés dans d'autres modèles murins knock out pour le gène C9orf72 (Atanasio *et al.*, 2016; Burberry *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2016; Koppers *et al.*, 2015; Lagier-Tourenne *et al.*, 2013; O'Rourke *et al.*, 2016; Sudria-Lopez *et al.*, 2016).

## C. Découverte d'un désordre immunitaire sévère dans les souris C9orf72 loxP/loxP x CMV Cre

### 1. Hyperplasie des ganglions lymphatiques et de la rate des souris C9orf72 loxP/loxP x CMV Cre

Nous avons observé que, entre l'âge de 4 à 6 mois, les souris C9orf72 loxP/loxP x CMV Cre développaient des hyperplasies sous cutanées localisées principalement dans le cou. La dissection de ces animaux a permis d'observer une hyperplasie des ganglions lymphatiques cervicaux, mais aussi une hyperplasie des ganglions lymphatiques axillaires, lombaires et mésentériques (figure 22). De plus, cette lymphadénopathie est associée à une augmentation de la taille de la rate (splénomégalie) chez les souris homozygotes C9orf72 loxP/loxP x CMV Cre en comparaison aux animaux hétérozygotes ou aux souris wild type. Cette hyperplasie des ganglions lymphatiques et de la rate est observable dès l'âge de deux mois et augmente au fur et à mesure du vieillissement des animaux. Nous nous sommes donc attachés



**Figure 23 : IHC sur des coupes de ganglions axillaires des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre de 6 mois**

IHC sur des coupes de 5µm de ganglions axillaires des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre. Les lames ont été colorées à l'hématoxyline-éosine puis marquées avec des anticorps dirigés contre CD45R, CD79 et CD138. Grossissement = 20x, Echelle = 100µm.

à essayer de déterminer quelle pouvait être la cause de cette hyperplasie des organes lymphoïdes secondaires, et quelle population cellulaire pouvait en être la cause.

## *2. Histologie des rates et ganglions lymphatiques des souris $C9orf72^{-/-}$*

Des analyses histologiques par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine de ganglions cervicaux ou axillaires des souris knock out pour  $C9orf72$  montrent une prolifération de cellules avec peu de cytoplasme et un marquage nucléaire dense, suggérant des cellules lymphocytaires. Des marquages immunohistochimiques réalisés dans l'équipe avec des anticorps dirigés contre CD4, un marqueur des lymphocytes T, CD45R (aussi nommé B220) et CD79 qui sont associés aux lymphocytes B, et CD138 (aussi nommé syndecan1) un marqueur des lymphocytes B activés et différenciés en plasmocytes (figure 23), confirment ces observations et indiquent une prolifération des lymphocytes B et des plasmocytes dans les ganglions des souris homozygotes  $C9orf72$  loxP/loxP x CMV Cre.

## *3. Analyses sériques des souris $C9orf72$ loxP/loxP x CMV Cre*

La particularité des plasmocytes étant de produire de grandes quantités d'immunoglobulines, la clinique de la souris a alors réalisé une analyse du sérum des souris knock out pour  $C9orf72$ . La figure 24 montre une forte augmentation de la quantité des immunoglobulines IgG2, IgG3, IgA et IgM dans le sérum des souris  $C9orf72$  loxP/loxP x CMV Cre comparé aux niveaux standards des animaux wild type. Les IgG2a augmentent ainsi d'un facteur 4 chez les individus KO, passant de 100µg/mL à environ 400µg/ml, et les IgG2b et IgG3

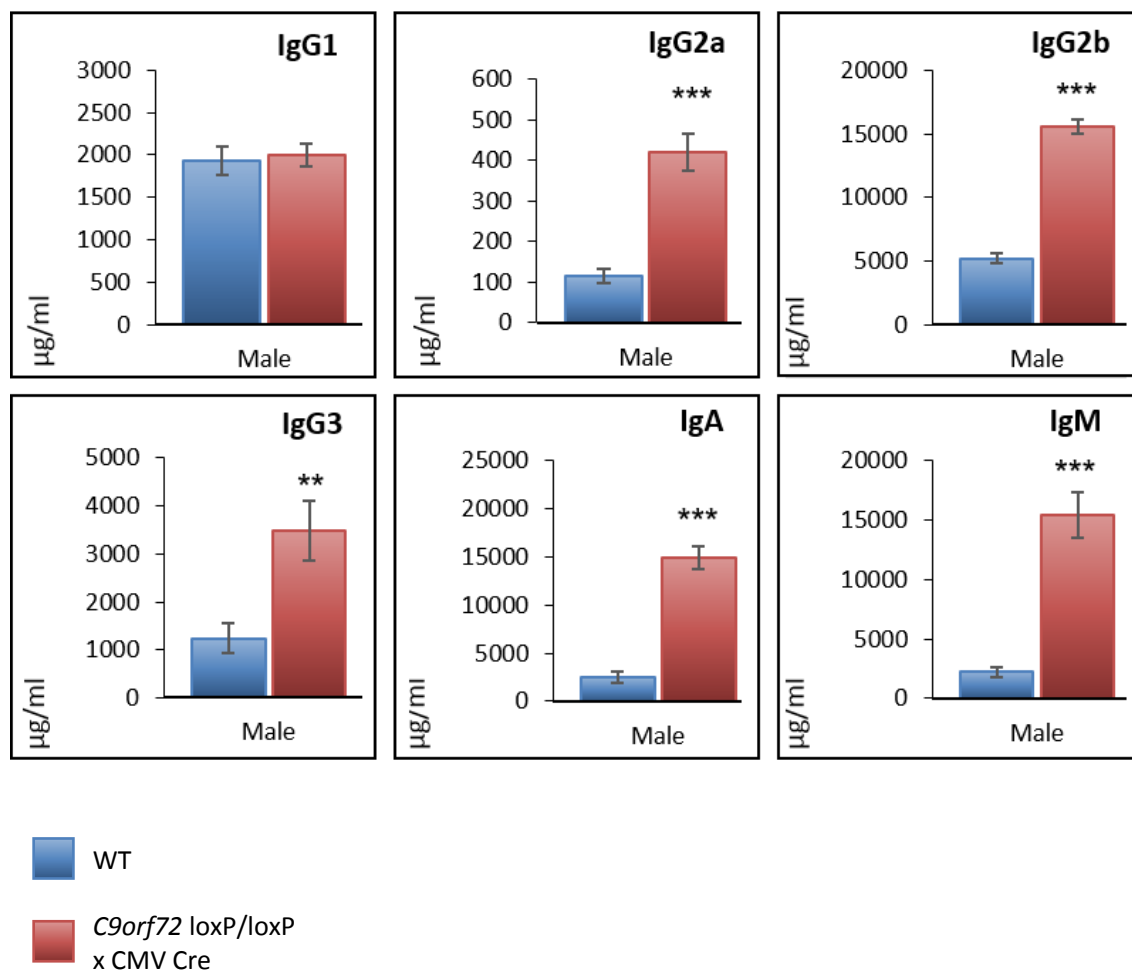


Figure 24 : Histogrammes présentant les résultats d'analyses des immunoglobulines du sérum des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre

Analyses réalisées sur 6 animaux mâles *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et 6 animaux mâles wild type de 6 mois, \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$

d'un facteur 3 chez les KO. Pour les IgG1, nous n'observons pas de différence significative, par contre la concentration des IgA et des IgM augmente de plus de 60 fois chez les animaux *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre comparés aux souris wild type avec des concentrations de 2 500µg/mL chez les wild type et de 150 000µg/mL chez les KO. Enfin, des analyses réalisées en collaboration avec l'équipe du Prof. Gros (IBMC, Strasbourg) montrent aussi une forte augmentation des anticorps dirigés contre le soi chez les souris KO. Nous pouvons donc en conclure que les souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre présentent une dérégulation majeure de leur système immunitaire, caractérisée par une hyperprolifération des lymphocytes B et des plasmocytes dans les ganglions lymphatiques et la rate, conduisant à une production excessive d'immunoglobulines circulant dans le sang.

#### *4. Histologie des reins des souris C9orf72 loxP/loxP x CV Cre*

En parallèle de l'analyse des ganglions et de la rate des souris KO pour *C9orf72*, l'étude histologique des reins de ces animaux par l'ICS montre une dégénérescence des glomérules rénaux (néphropathie glomérulaire) vers 6 mois et qui s'accroît dramatiquement avec l'âge, conduisant à des glomérules atrophiques et non fonctionnels. Le sang étant filtré en permanence par les reins, nous nous sommes alors demandé si les quantités anormalement importantes d'immunoglobulines produites dans les souris KO pour *C9orf72* pouvaient avoir un effet néfaste sur les glomérules rénaux. Des analyses par IHC en utilisant des anticorps dirigés contre les immunoglobulines IgG, IgA et IgM montrent effectivement une accumulation importante de ces molécules au niveau des glomérules rénaux des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre comparées aux souris wild type (figure 25). Il est connu que les IgM, des molécules pentamériques de presque 1 MDa, sont difficilement éliminées par les

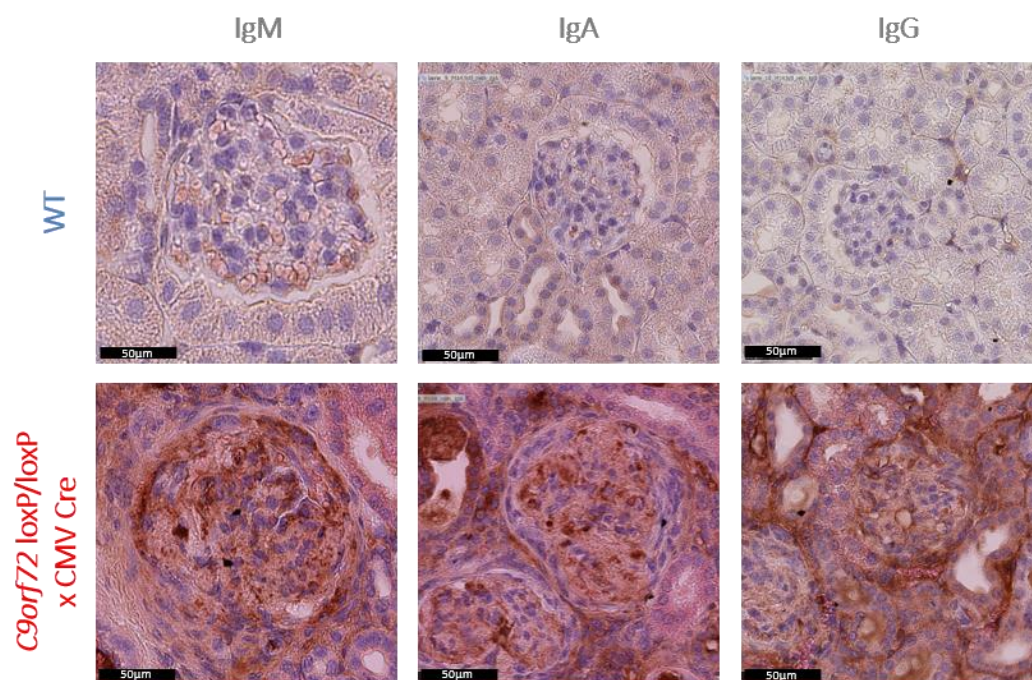


Figure 25 : IHC sur des coupes de reins des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et wild type de 6 mois

IHC sur des coupes de 5µm de reins des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et d'individus wild type. Les lames ont été colorées à l'hématoxyline-éosine puis marquées avec des anticorps dirigés contre les immunoglobulines IgM, IgA et IgG. Grossissement = 40x, Echelle = 50µm.

les glomérules rénaux et qu'un excès de production d'IgM peut conduire à des néphropathies. Nous proposons donc une hypothèse où la perte d'expression de *C9orf72* dans notre modèle murin conduit à une hyperprolifération et une activation des lymphocytes B qui produisent des quantités importantes d'immunoglobulines, notamment IgM, quiaturent et bloquent les glomérules rénaux lors de leur tentative de filtration, engendrant une glomérulonéphropathie fatale. Des résultats identiques ont aussi été observés dans d'autres modèles murins knock out pour *C9orf72* (Atanasio *et al.*, 2016; Burberry *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2016; Koppers *et al.*, 2015; Lagier-Tourenne *et al.*, 2013; O'Rourke *et al.*, 2016; Sudria-Lopez *et al.*, 2016).

## II. Identification de la population cellulaire responsable du désordre immunitaire chez les souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre

### A. Génération de nouveaux modèles murins KO pour *C9orf72*

Afin d'identifier comment la perte d'expression de *C9orf72* peut induire une hyperprolifération de lymphocytes B, l'équipe du Professeur Frédéric Gros (IBMC, Strasbourg) a testé des cellules B naïves purifiées à partir de souris *C9orf72* KO âgées de 2 mois. Toutefois, ils n'ont pas observé d'altérations de la prolifération, de l'activation ou de la survie de ces cellules comparées à des souris wild type. Au cours de cette analyse, ils ont toutefois observé que les lymphocytes T purifiés par FACS à partir de rate de souris étaient activés dans les *C9orf72* KO par rapport aux wild type. Ces résultats suggèrent que l'hyperprolifération et l'activation des lymphocytes B dans les souris KO pour *C9orf72* auraient pour origine une activation des lymphocytes T, soit provenant d'eux-mêmes, soit provenant d'une altération

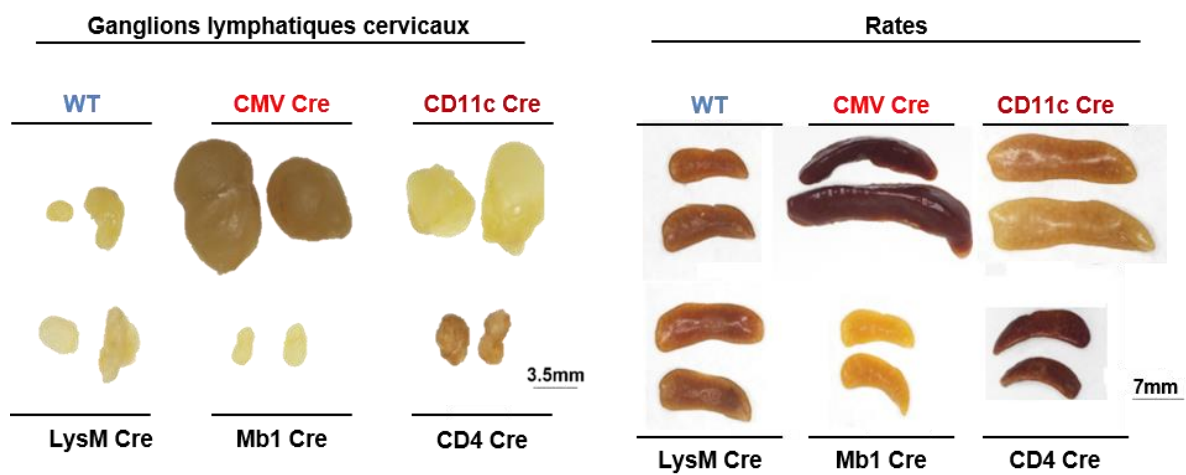


Figure 26 : Photographies montrent des ganglions lymphatiques et des rates de souris WT, *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre, *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre, *C9orf72* loxP/loxP x LysM Cre, *C9orf72* loxP/loxP x Mb1 Cre, et *C9orf72* loxP/loxP x CD4 Cre

des cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques ou les macrophages. Afin de mieux comprendre quelle population cellulaire est à l'origine du phénotype inflammatoire des souris *C9orf72* KO, nous avons alors croisé des animaux *C9orf72* loxP avec des souris exprimant la recombinaise Cre spécifiquement dans les différentes populations immunitaires principales (figure 16). Nous avons ainsi obtenu une perte d'expression de *C9orf72* spécifiquement dans les cellules dendritiques (*C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre), les macrophages (*C9orf72* loxP/loxP x LysM Cre), les lymphocytes B (*C9orf72* loxP/loxP x MB1 Cre) ou les lymphocytes T (*C9orf72* loxP/loxP x CD4 Cre). Cette perte d'expression spécifique a été confirmée par génotypage ADN sur les lymphocytes B, lymphocytes T, cellules dendritiques et macrophages purifiées par FACS à partir de ces souris. De façon intéressante, le sacrifice à l'âge de six mois de ces animaux homozygotes KO conditionnels montre une splénomégalie et une lymphadénopathie dans la lignée *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre comparable à la perte totale de *C9orf72* (figure 26). Au contraire, la perte d'expression de *C9orf72* spécifiquement dans les macrophages, les lymphocytes B ou les lymphocytes T ne conduit à aucune altération visible des ganglions lymphatiques ou de la rate. Ces résultats suggèrent que le phénotype immunitaire observés dans les souris KO pour *C9orf72* provient d'une altération des cellules dendritiques.

## B. Immunophénotypage de la lignée cellulaire dendritique

Afin de comprendre le rôle de *C9orf72* dans les cellules dendritiques, j'ai étudié avec l'aide du Dr. Peggy Kirstetter ces cellules (conventionnelles et plasmacytoïdes) ainsi que leurs précurseurs et progéniteurs dans les souris *C9orf72* KO. Nous avons notamment analysé leurs

***C9orf72* loxP / loxP x CMV Cre**

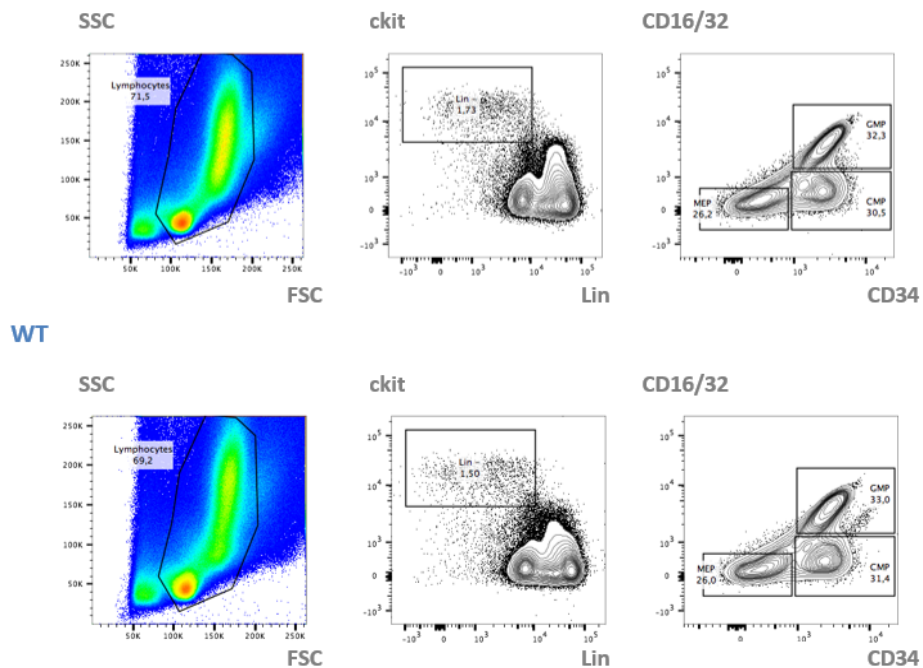


Figure 27 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des précurseurs myéloïdes des lignées *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et wild type en cytométrie en flux

L'immunophénotypage a été réalisé sur des cellules extraites à partir de la moelle osseuse de 2 animaux *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et 2 wild type, n=3.

précurseurs myéloïdes communs, les progéniteurs dendritiques communs, les cellules dendritiques pré-conventionnelles, les cellules dendritiques conventionnelles et enfin les cellules dendritiques plasmacytoïdes (figure 17). Ces immunophénotypages ont été réalisés sur la moelle osseuse et la rate de souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et wild type.

### 1. Immunophénotypage des précurseurs myéloïdes

Concernant les précurseurs myéloïdes, extraits à partir de la moelle osseuse des souris, nous avons sélectionné les cellules  $\text{ckit}^{\text{high}}/\text{Lin}^{\text{low}}$ , ckit étant un marqueur des cellules souches hématopoïétiques multipotentes et encore fortement exprimé par les précurseurs myéloïdes, et Lin un marqueur de cellules différenciées matures. Nous avons ensuite utilisé les marquages CD16/32 et CD34, deux marqueurs caractéristiques pour étudier nos trois populations cellulaires (figure 27). Les cellules  $\text{CD16/32}^{\text{high}}/\text{CD34}^{\text{high}}$  correspondent aux précurseurs myéloïdes granulocytaires (GMP), qui se différencient ensuite en différents granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles). Les cellules  $\text{CD16/32}^{\text{low}}/\text{CD34}^{\text{low}}$  sont les précurseurs myéloïdes érythrocytaires (MEP), qui donnent ensuite les érythrocytes et les plaquettes, et enfin, les cellules  $\text{CD16/32}^{\text{low}}/\text{CD34}^{\text{high}}$  correspondent aux précurseurs myéloïdes communs (CMP), qui se différencient en GMP et MEP, ainsi qu'en progéniteurs dendritiques communs. Toutefois, nos résultats ne montrent aucune différence flagrante entre les précurseurs myéloïdes des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et wild type. En effet, la forme globale de répartition des cellules sur le graphe CD16/32 / CD34 ne montre pas de changement dans les proportions des trois différents précurseurs étudiés.

### *C9orf72* loxP / loxP x CMV Cre

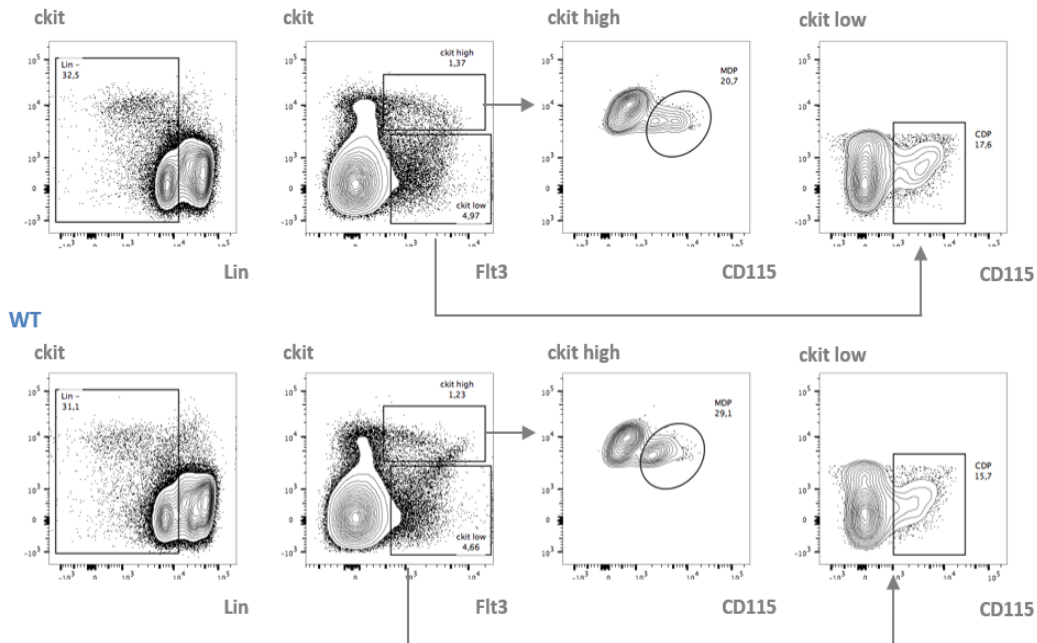


Figure 28 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des progéniteurs myéloïdes dendritiques des lignées *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et wild type en cytométrie en flux

L'immunophénotypage a été réalisé sur des cellules extraites à partir de la moelle osseuse de 2 animaux *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et 2 wild type, n=3.

Lin<sup>low</sup>/ckit<sup>high</sup>/CD115 : MDP, Lin<sup>low</sup>/ckit<sup>low</sup>/CD115 : CDP

### *C9orf72* loxP / loxP x CMV Cre

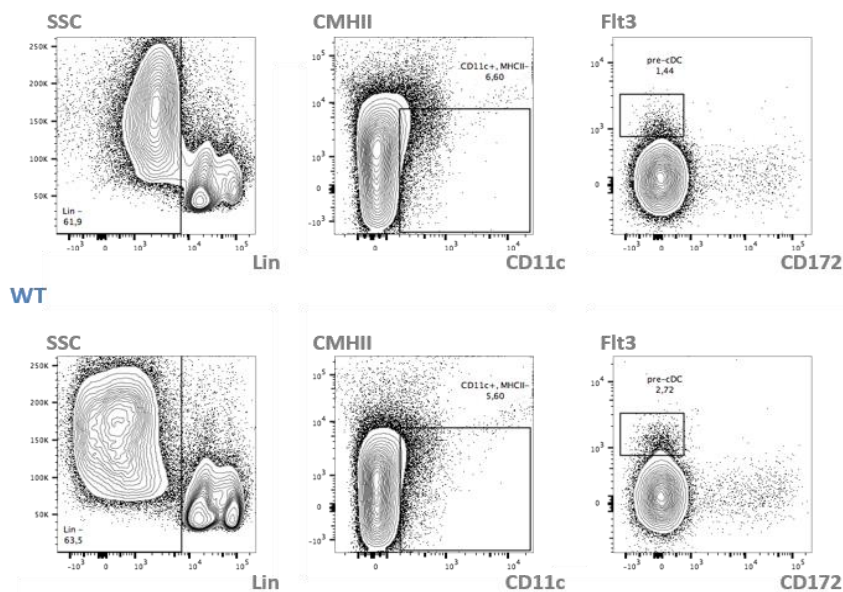


Figure 29 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques pré-conventionnelles des lignées *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et wild type en cytométrie en flux

L'immunophénotypage a été réalisé sur des cellules extraites à partir de la moelle osseuse de 2 animaux *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et 2 wild type, n=3.

Lin<sup>low</sup>/CMH<sup>low</sup>/CD11c<sup>high</sup>/Flt3<sup>high</sup>/CD172<sup>low</sup> : cellules dendritiques pré-conventionnelles

## 2. Immunophénotypage des progéniteurs dendritiques

Nous avons alors étudié les progéniteurs dendritiques myéloïdes (MDP) et les progéniteurs dendritiques communs (CDP), extraits à partir de la moelle osseuse des souris. Nous avons sélectionné les cellules Lin<sup>low</sup>, puis nous avons différencié les MDP des CDP par des marquages ckit et Flt3, ce dernier étant nécessaire pour la différenciation en cellules dendritiques (figure 28). Nous avons donc choisi des cellules Flt3<sup>high</sup> et défini deux groupes cellulaires : ckit<sup>high</sup> et ckit<sup>low</sup>, puis choisi les cellules exprimant de hauts niveaux du marqueur CD115, un marqueur de surface fortement exprimé à la fois dans les MDP et CDP. Les cellules Flt3<sup>high</sup>/ckit<sup>high</sup>/CD115<sup>high</sup> correspondent aux progéniteurs myéloïdes dendritiques, qui se différencient ensuite en progéniteurs dendritiques communs Flt3<sup>high</sup>/ckit<sup>low</sup>/CD115<sup>high</sup>. Malheureusement, ces analyses ne montrent pas de différence entre les MDP et les CDP des souris C9orf72 KO comparées aux wild type.

## 3. Immunophénotypage des cellules dendritiques pré-conventionnelles

Pour étudier les cellules dendritiques pré-conventionnelles, extraites elles aussi à partir de la moelle osseuse des souris, nous avons sélectionné les cellules Lin<sup>low</sup>, puis dans un second temps les cellules CMHII<sup>high</sup>/CD11c<sup>high</sup>. L'analyse des cellules Flt3<sup>high</sup>/CD172<sup>low</sup> correspond alors aux cellules dendritiques pré-conventionnelles (figure 29), mais ne montre pas de différence entre les souris C9orf72 KO et les souris wild type.

***C9orf72* loxP / loxP x CMV Cre**

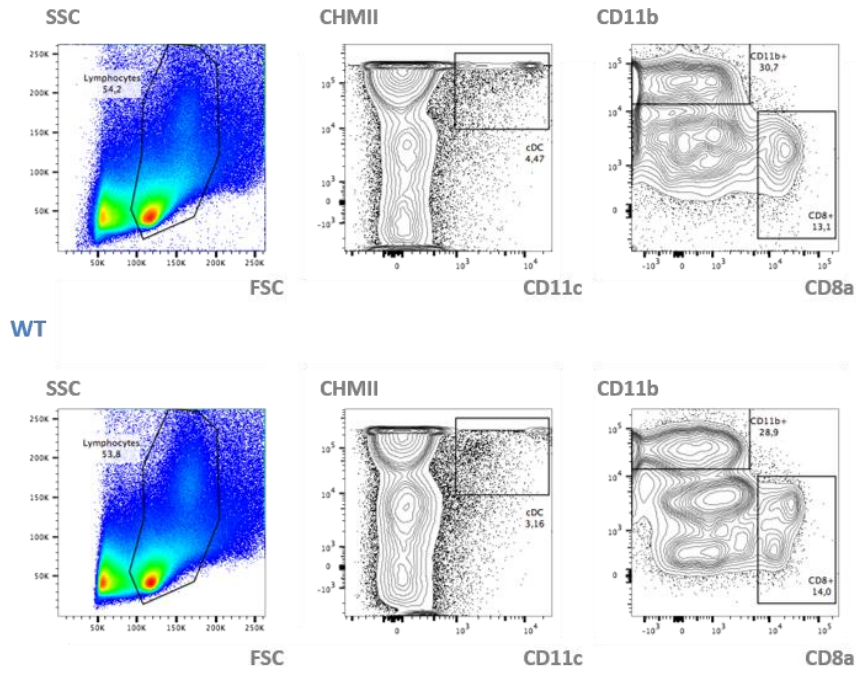


Figure 30 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques conventionnelles des lignées *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et wild type en cytométrie en flux

L'immunophénotypage a été réalisé sur des cellules extraites à partir de la moelle osseuse de 2 animaux *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et 2 wild type, n=3.

CHMII<sup>high</sup>/CD11c<sup>high</sup>/CD11b<sup>high</sup>/CD8a<sup>low</sup> : cellules dendritiques conventionnelles myéloïdes

CHMII<sup>high</sup>/CD11c<sup>high</sup>/CD11b<sup>low</sup>/CD8a<sup>high</sup> : cellules dendritiques conventionnelles lymphoïdes

***C9orf72* loxP / loxP x CMV Cre**

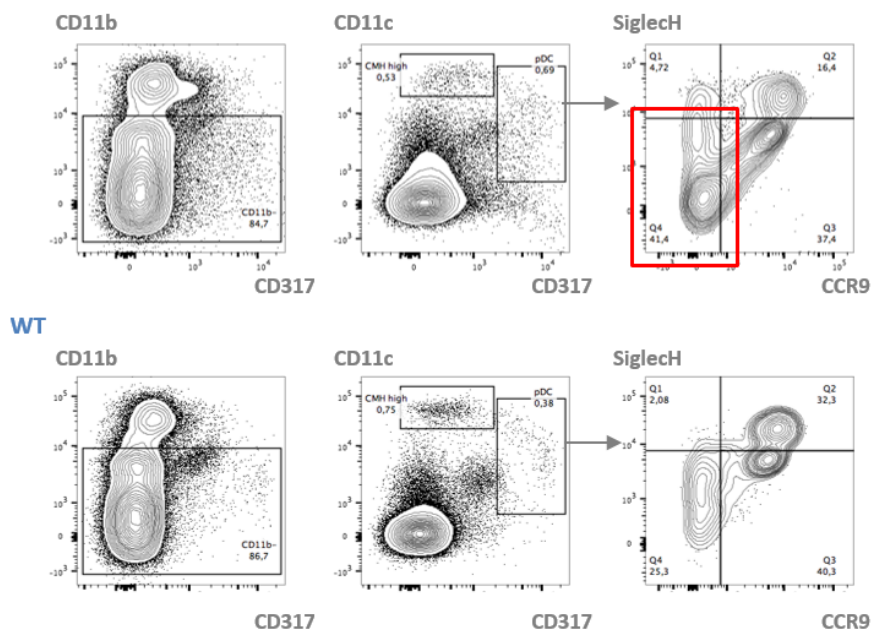


Figure 31 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques plasmacytoïdes des lignées *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et wild type en cytométrie en flux

L'immunophénotypage a été réalisé sur des cellules extraites à partir de la moelle osseuse de 2 animaux *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et 2 wild type, n=3.

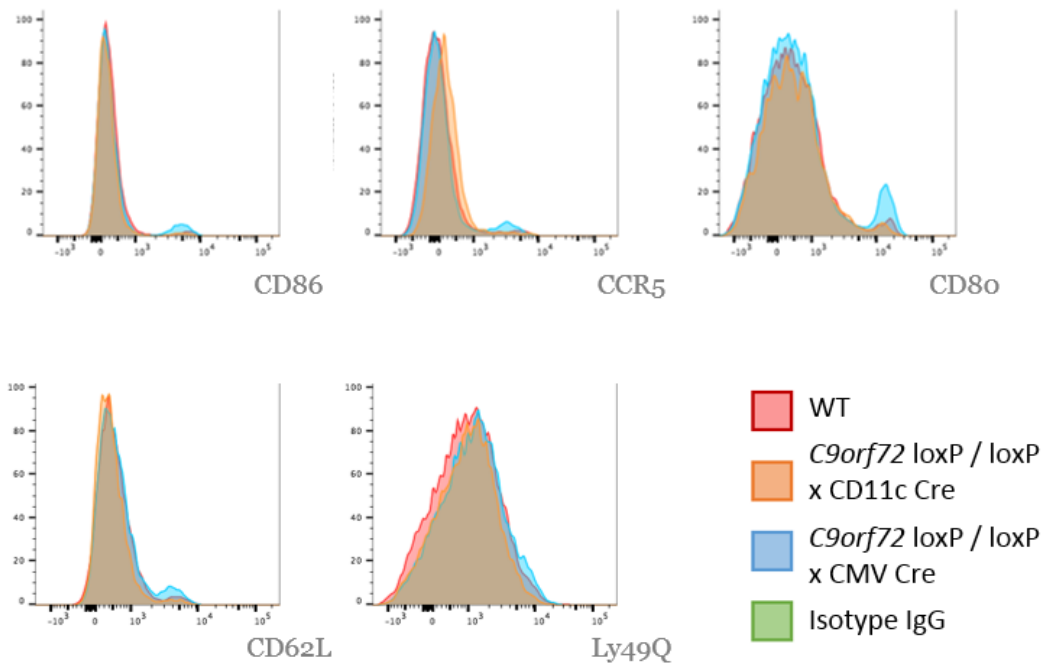
#### 4. *Immunophénotypage des cellules dendritiques conventionnelles*

Nous avons ensuite étudié les cellules dendritiques conventionnelles, extraites cette fois à partir de la rate des souris. Nous avons sélectionné les cellules CMHII<sup>high</sup>/CD11c<sup>high</sup>, puis nous avons étudié les deux différentes lignées de cellules dendritiques conventionnelles, celles provenant de la lignée myéloïde CD11b<sup>high</sup>/CD8a<sup>low</sup> et celles provenant de la lignée lymphoïde CD11b<sup>low</sup>/CD8a<sup>high</sup> (figure 30). Toutefois, nous pouvons remarquer que les cellules dendritiques conventionnelles des souris knock out pour C9orf72 ne montrent aucune différence notable comparées à celles des souris wild type.

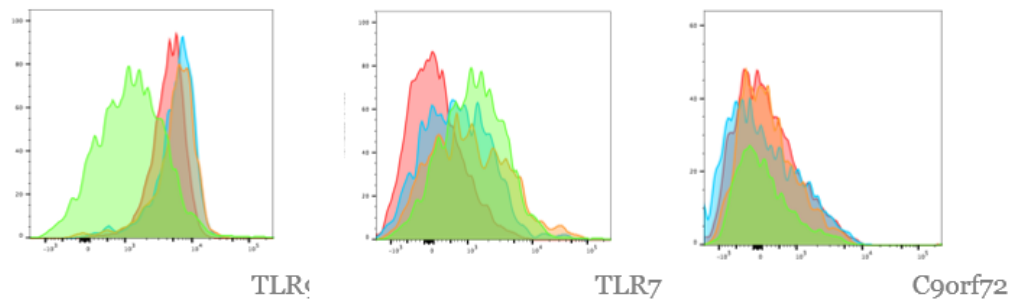
#### 5. *Immunophénotypage des cellules dendritiques plasmacytoïdes*

Enfin, nous avons étudié les cellules dendritiques plasmacytoïdes, extraites à partir de la moelle osseuse des souris. Nous avons sélectionné les cellules CD11b<sup>low</sup>, puis nous avons pu observer les pDC sur un graphe présentant les marqueurs CD11c et CD317 (figure 31). CD317, aussi appelé Tetherin, BST2 (bone marrow stromal antigen 2) ou PDCA-1 (plasmacytoid dendritic cell antigen 1) est un marqueur spécifique des pDC. Après avoir sélectionné nos pDC CD11c<sup>high</sup>/CD317<sup>high</sup>, nous avons étudié deux marqueurs de maturité des pDC, SiglecH et CCR9. De façon intéressante, le graphe SiglecH/CCR9 montre une population de cellules SiglecH<sup>low</sup>/CCR9<sup>low</sup> plus nombreuse pour les pDC des souris C9orf72 loxP/loxP x CMV Cre comparées aux pDC des souris wild type, qui sont majoritairement SiglecH<sup>high</sup>/CCR9<sup>high</sup>. Les marqueurs SiglecH et CCR9 étant des marqueurs de la maturité des cellules dendritiques plasmacytoïdes, ces résultats suggèrent que la protéine C9orf72 joue un rôle dans ces cellules.

**A**



**B**



**Figure 32 : Histogrammes présentant l'expression de différents marqueurs extra et intracellulaires par les pDC des lignées *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et wild type en cytométrie en flux**

L'immunophénotypage a été réalisé sur des cellules extraites à partir de la moelle osseuse de 2 animaux *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et 2 wild type, n=3.

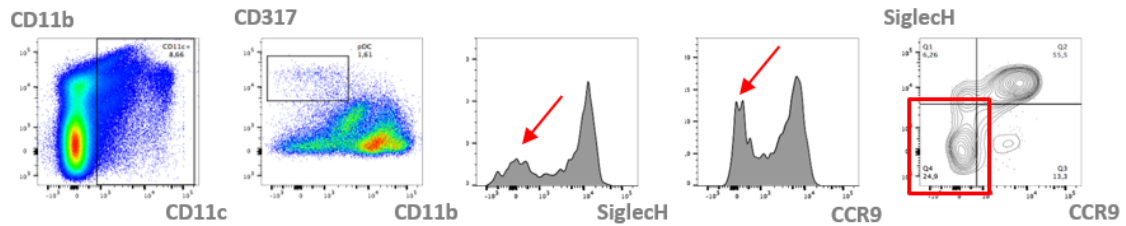
A) Marquages extracellulaires des pDC avec des anticorps contre les protéines CD86, CCR5, CD80, CD62L ou, Ly49Q. B) Marquage intracellulaire des pDC avec des anticorps contre les protéines TLR9, TLR7, C9orf72 ou un isotype contrôle.

### C. Immunophénotypage des pDC chez les souris CMV Cre et CD11c Cre

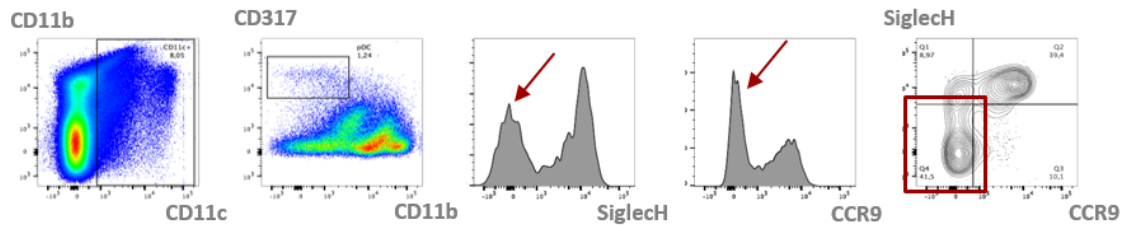
Les souris avec une perte complète de *C9orf72* (*C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre) montrant un phénotype immunitaire identique à la délétion spécifique de *C9orf72* dans les cellules dendritiques (*C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre), nous avons recherché si les pDC étaient affectées de la même manière dans ces souris CD11c Cre. Nous avons ainsi sélectionné les cellules CD11b<sup>low</sup>/CD11c<sup>high</sup>/CD317<sup>high</sup>, puis nous avons comparé différents marqueurs permettant de caractériser les pDC. En figure 32.A, nous pouvons observer des histogrammes correspondant aux niveaux d'expression des marqueurs CD86, CCR5, CD80, CD62L et Ly49Q des souris wild type (en rouge), *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre (en orange) et *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre (en bleu) superposés. Malheureusement, nous n'observons aucun changement marquant pour ces différents marqueurs entre les différentes souris, indiquant que ces facteurs ne sont pas modifiés par la perte de *C9orf72*. J'ai aussi réalisé un marquage intracellulaire afin d'essayer de déterminer l'expression de TLR9, TLR7 et *C9orf72* directement par cytométrie en flux (figure 32.B). Un isotype (en vert) sert de contrôle négatif afin d'évaluer le bruit de fond aspécifique. Nous pouvons remarquer que les trois modèles murins expriment des niveaux de TLR9, TLR7 et *C9orf72* semblables, mais aussi proches de la courbe correspondant à l'isotype. Il est donc possible que le marquage de ces anticorps ne soit pas spécifique dans nos conditions.

En revanche, l'étude de Siglech et CCR9 (figure 33) montre des populations de pDC exprimant des niveaux plus faibles de ces deux marqueurs à la fois chez les souris *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre (en bordeaux) et *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre (en rouge). Nous pouvons en effet identifier une population cellulaire négative pour ces deux facteurs dans ces

***C9orf72* loxP / loxP x CMV Cre**



***C9orf72* loxP / loxP x CD11c Cre**



**WT**

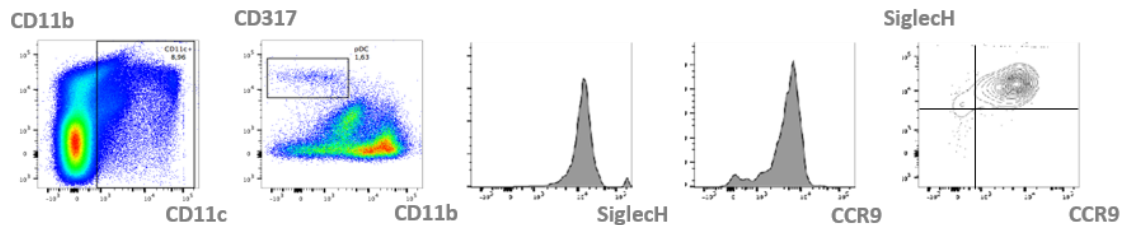


Figure 33 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques plasmacytoïdes des lignées *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre, *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre et wild type en cytométrie en flux

L'immunophénotypage a été réalisé sur des cellules extraites à partir de la moelle osseuse d'un animal *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre, un *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre et un wild type, n=3.

CD11b<sup>low</sup>/CD11c<sup>high</sup>/CD317<sup>high</sup> : cellules dendritiques plasmacytoïdes

souris, comparées aux pDC des souris wild type. En conclusion, l'étude des souris avec un KO conditionnel CD11c Cre confirme que C9orf72 semble jouer un rôle dans la maturation ou l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes.

#### D. Validation de du rôle de C9orf72 dans les cellules dendritiques

En parallèle de ces analyses par cytométrie en flux, j'ai testé différentes voies de signalisation impliquées dans l'activation des cellules immunitaires. Pour ce faire, j'ai purifié à l'aide de billes magnétiques couplées à des anticorps spécifiques les lymphocytes B et T et les cellules dendritiques à partir de la rate, et les macrophages intrapéritonéaux de nos souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre.

##### 1. Etude des lymphocytes B, lymphocytes T et macrophages

Ces différentes populations cellulaires ont ensuite été induites avec des ligands spécifiques, soit des IgM, du LPS et du CD40 pour les lymphocytes B, du CD3 pour les lymphocytes T et du LPS pour les macrophages. Après avoir récupéré et lysé les cellules, j'ai réalisé des immunoblots de manière à déterminer s'il y avait des changements dans l'expression ou dans la phosphorylation de protéines impliquées dans l'autophagie, l'inflammation et l'inflammasome, qui est un complexe de l'immunité innée qui se forme après la reconnaissance de signaux inflammatoires comme le LPS, et qui permet la sécrétion de cytokines inflammatoires ainsi qu'une mort cellulaire médiée par la caspase-1.

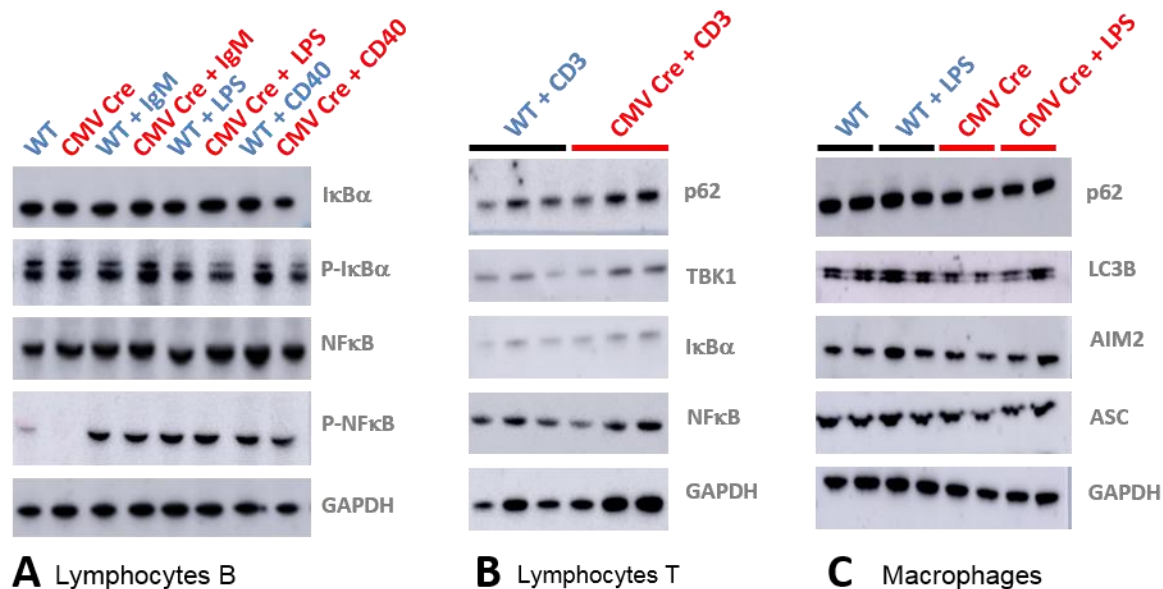


Figure 34 : Immunoblot illustrant l'expression de protéines liées à l'autophagie ou à l'inflammation dans les lymphocytes B, T et les macrophages de la souris *C9orf72 loxP/loxP* x *CMV Cre* comparées à des wild type

A) Immunoblot réalisé sur des lymphocytes B non induits, induits avec des IgM, du LPS ou du CD40. B) Immunoblot réalisé sur des lymphocytes T induits au CD3. C) Immunoblot réalisé sur des macrophages non induits et induits avec du LPS.

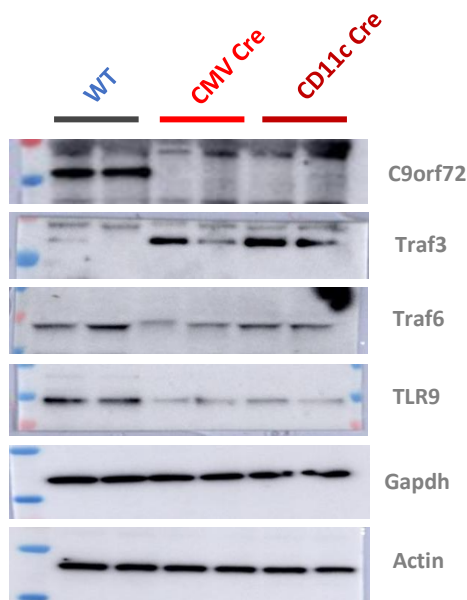


Figure 35 : Immunoblots illustrant l'expression de protéines liées à l'autophagie ou à l'inflammation dans les cellules dendritiques des souris *C9orf72 loxP/loxP* x *CMV Cre* et *C9orf72 loxP/loxP* x *CD11c Cre* comparées à des wild type

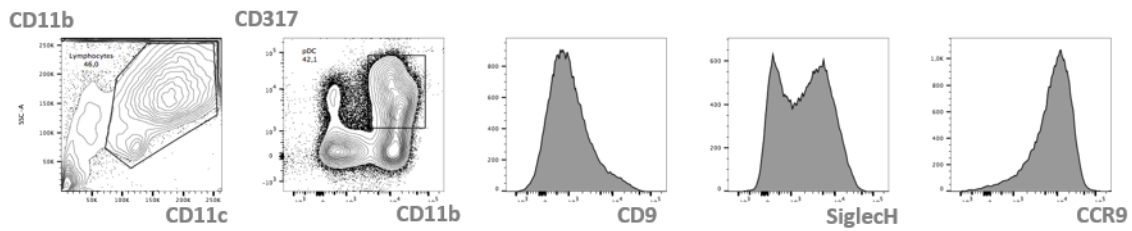
Immunoblot réalisé sur des cellules dendritiques extraites à partir de la rate de souris wild type, *C9orf72 loxP/loxP* x *CMV Cre* et *C9orf72 loxP/loxP* x *CD11c Cre*.

La figure 34.A montre l'analyse de la voie NF- $\kappa$ B dans des lymphocytes B purifiés à partir de souris *C9orf72* KO et wild type. Toutefois, ces immunoblots ne montrent pas de différence dans l'expression et la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  et NF- $\kappa$ B. Concernant les lymphocytes T (figure 34.B), l'étude des protéines de la voie NF- $\kappa$ B et des protéines TBK1 et p62, impliquées dans l'autophagie, ne montre aucune différence entre souris wild type et *C9orf72* KO. Enfin, les immunoblots réalisés sur les macrophages intrapéritonéaux (figure 34.C) ne montrent pas d'effet de la perte de *C9orf72* sur les protéines AIM2 et ASC, deux protéines impliquées dans la formation de l'inflammasome, ni sur les protéines p62 et LC3B, impliquées dans l'autophagie. Ces résultats suggèrent que la perte d'expression de *C9orf72* dans les lymphocytes B, les lymphocytes T et les macrophages ne semble pas altérer diverses voies de signalisation dans ces cellules, ce qui est compatible avec l'absence de phénotype dans les souris *C9orf72* loxP x CD4 Cre, MB1 Cre ou LysM Cre.

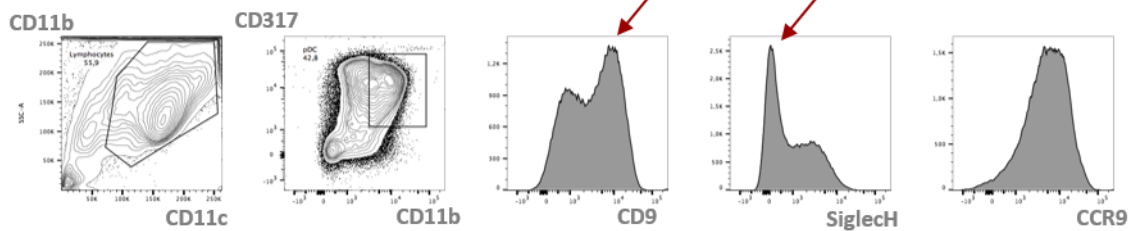
## 2. Etude des cellules dendritiques

Nous avons ensuite purifié avec l'aide de billes magnétiques couplées avec un anticorps dirigé contre CD11c des cellules dendritiques à partir de rates de souris wild type, *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre ainsi que *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre (figure 35). Un immunoblot dirigé contre *C9orf72* confirme la perte de l'expression de cette protéine dans les souris KO comparées aux souris wild type. De façon intéressante, j'ai noté une augmentation de l'expression de la protéine Traf3 et une diminution de l'expression de Traf6 et TLR9, trois protéines impliquées dans la voie d'activation des pDC, notamment pour la production d'interférons. Ces résultats confirment que *C9orf72* puisse jouer un rôle important dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes.

***C9orf72* loxP / loxP x CMV Cre**



***C9orf72* loxP / loxP x CD11c Cre**



**WT**

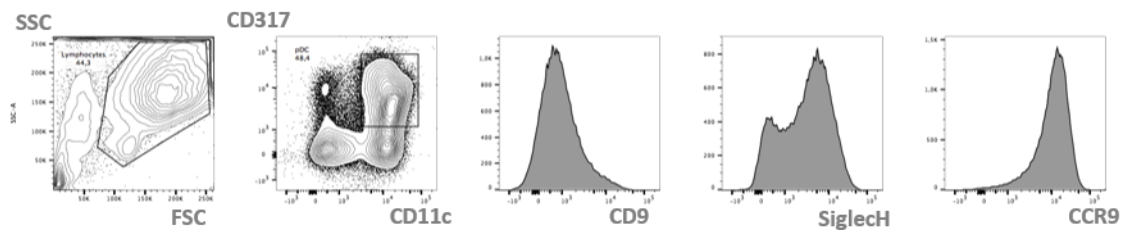


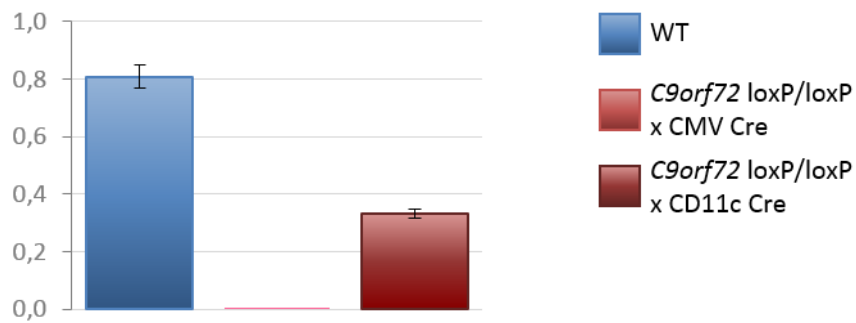
Figure 36 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques plasmacytoïdes des lignées *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre, *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre et wild type en cytométrie en flux

L'immunophénotypage a été réalisé sur des cellules de moelle osseuse de un animal *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre, un animal *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre et un wild type, et mises en culture pendant 8j, n=3. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes dérivées de moelle osseuse ont été identifiées avec les marquages  $CD11b^{low}/CD11c^{high}/CD317^{high}$ .

### III. Reproduction du phénotype immature des pDC en cellules

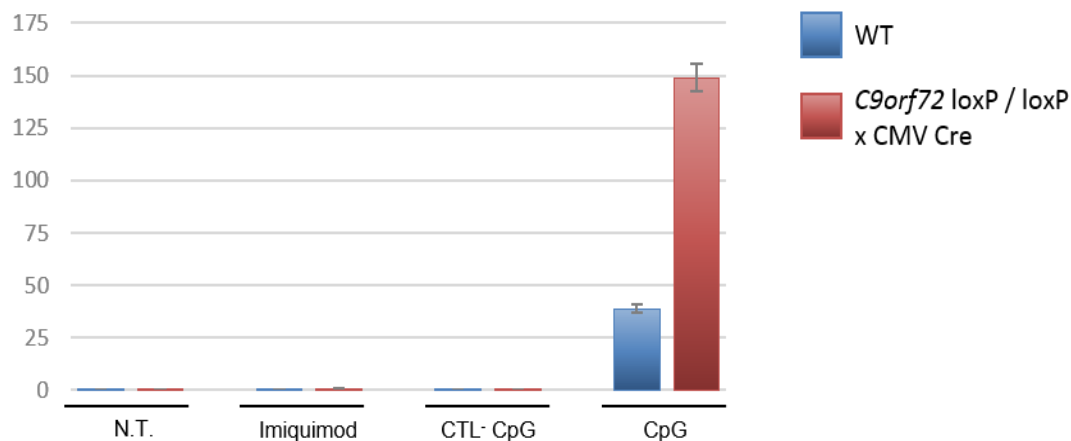
#### A. Culture de pDC dérivées à partir de moelle osseuse (BMpDC)

Afin de mieux comprendre le rôle de la protéine C9orf72 dans les pDC, nous avons cherché à reproduire ce phénotype dans un modèle cellulaire. Pour cela et avec l'aide du Dr. Peggy Kirstetter, j'ai différencié pendant 8 jours dans un milieu de culture supplémenté avec du Flt3 ligand des cellules dendritiques plasmacytoïdes « naïves » extraites à partir de moelle osseuse (BMpDC) de souris wild type, *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre. Le tri (CD11b, CD11c et CD317) . L'analyse de ces cellules par cytométrie en flux montre que les pDC différenciées à partir de moelle osseuse de souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre expriment moins de marqueur SiglecH comparées aux cellules différenciées à partir de souris wild type (figure 36). Ces résultats coïncident avec ceux obtenus lors de l'immunophénotypage sur les pDC extraites directement à partir de la rate des souris *C9orf72* KO. Toutefois, concernant le marqueur CCR9, nous n'observons pas d'altérations de ce marqueur dans les cultures de pDC différenciées à partir de moelle osseuse de souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre, contrairement à ce que nous observions sur les pDC extraites directement à partir de la rate de ces souris. De plus, nous n'avons observé aucune différence dans les marqueurs étudiés entre les souris wild type et les souris *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre, bien que ces souris présentent une hyperplasie des ganglions lymphoïdes et de la rate identique à celle des souris CMV Cre. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ce KO se fait grâce à une Cre recombinase exprimée sous le promoteur CD11c, qui n'est exprimé qu'assez tardivement et à des niveaux faibles dans le développement des cellules dendritiques plasmacytoïdes. Les sites loxP insérés dans le gène *C9orf72* ne sont peut-être donc pas



**Figure 37 :** Histogramme illustrant l'expression de C9orf72 et d'interféron de type I dans les BMpDC des lignées *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre, *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre et wild type

Histogramme représentant l'expression de C9orf72 dans les BMpDC des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre, *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre et wild type.



**Figure 38 :** Histogramme illustrant l'expression de C9orf72 et d'interféron de type I dans les BMpDC des lignées *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre, *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre et wild type

Histogramme représentant l'expression d'interféron de type I dans les BMpDC des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre, *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre et wild type, sans traitement, en présence de 1µg/mL d'imiquimod, en présence de 2,5µM de contrôle négatif correspondant au CpG utilisé et en présence de 2,5µM de CpG.

complètement excisés après seulement huit jours de culture. Afin de confirmer cette hypothèse, j'ai réalisé des RT-qPCR sur ces cellules BMpDC. La figure 37 confirme une perte complète d'expression du gène *C9orf72* dans les BMpDC différenciées à partir des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre mais une expression réduite seulement de moitié dans les BMpDC des souris *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre par rapport aux souris wild type. Cette observation démontre que le modèle murin *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre n'est pas utilisable pour générer des cellules BMpDC.

En conclusion de cette partie, nous sommes en mesure de cultiver des cellules dendritiques plasmacytoïdes différenciées, ce qui devrait nous permettre d'étudier le rôle de *C9orf72* dans ces cellules.

## B. Expression d'interféron par induction des BMpDC

Ayant mis au point un modèle cellulaire de cellules dendritiques plasmacytoïdes (BMpDC) à partir de moelle osseuse d'animaux *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre, nous avons utilisé ce modèle pour définir le rôle de *C9orf72* dans ces cellules. J'ai donc stimulé ces cellules BMpDC (wild type ou *C9orf72* KO) avec des ligands mimant des acides nucléiques viraux, soit de l'imiquimod à 1µg/mL afin de stimuler TLR7, soit du CpG à 2,5µM pour stimuler TLR9. Après 16h d'incubation, les cellules ont été récupérées et leur ARN extrait afin de réaliser des RTqPCR pour étudier différentes voies de signalisation, notamment celles conduisant à la production d'interféron.

La figure 38 montre l'expression de l'ARNm codant pour l'interféron de type I par des BMpDC wild type et *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre. L'activation de TLR9 avec 2,5µM de CpG

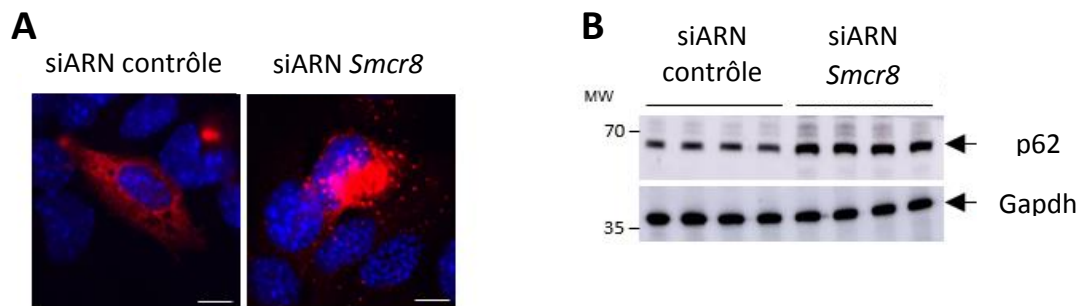


Figure 39 : Conséquences de la perte d'expression de *Smcr8* *in vitro*

A) Immunofluorescence dirigée contre la protéine p62 en cellules neuronales GT1.7 transfectées avec du siARN contrôle ou du siARN dirigé contre SMCR8. B) Immunoblot dirigé contre la protéine p62 réalisé sur des cellules neuronales GT1.7 transfectées avec du siARN contrôle ou du siARN dirigé contre SMCR8.

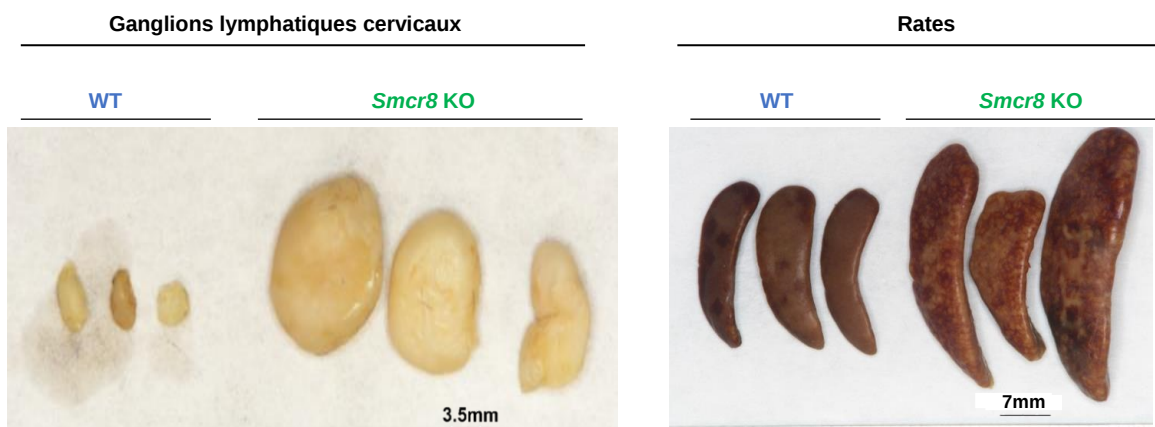


Figure 40 : Photographies montrant les ganglions lymphatiques et les rates de souris wild type et *Smcr8* KO

induit une forte production d'interféron dans les BMpDC *C9orf72* KO, qui expriment environ quatre fois plus d'interféron comparées aux cellules wild type. Ces résultats obtenus sur une culture de BMpDC restent à confirmer, mais sont prometteurs car une hyperproduction d'interféron par les cellules dendritiques plasmacytoïdes pourrait expliquer l'activation des lymphocytes T et l'hyperprolifération et l'activation des lymphocytes B observée dans les souris *C9orf72* KO.

## IV. Autres modèles murins

### A. Génération de modèles murins *Smcr8* KO

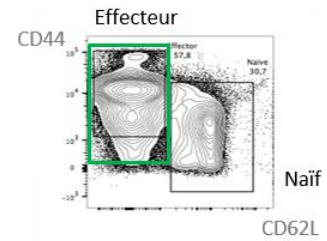
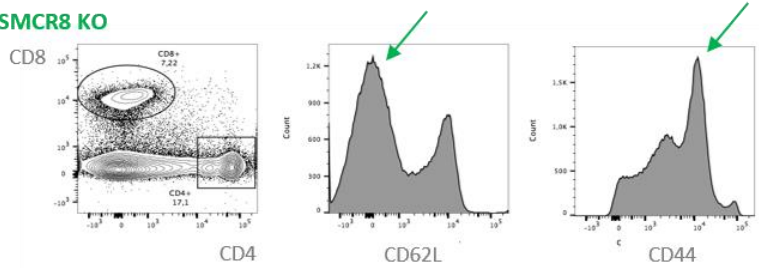
La protéine C9ORF72 forme un complexe avec SMCR8. Nous avons montré qu'une diminution d'expression de *SMCR8* par l'utilisation d'un siARN engendrait une dysfonction de l'autophagie, notamment une accumulation de la protéine p62, comparable à celle observée après déplétion de C9ORF72 (*cf.* Résultats partie 1) (Figure 39.A et 39.B). SMCR8 et C9ORF72 semblent donc avoir une fonction similaire dans la régulation de l'autophagie. Afin d'étudier plus en détail ce complexe C9ORF72/SMCR8, nous avons alors généré un modèle murin KO pour le gène *Smcr8*.

### B. Hyperplasie des ganglions lymphatiques et de la rate des souris *Smcr8* KO

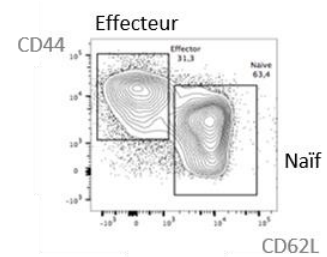
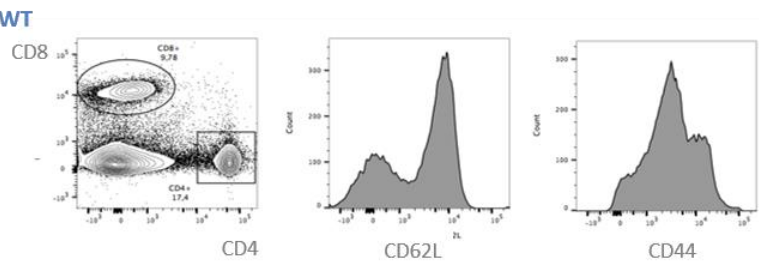
Le sacrifice d'animaux *Smcr8* homozygotes KO âgés de six mois montre une hyperplasie des ganglions lymphatiques cervicaux, axillaires, lombaires et mésentériques (figure 40), ainsi qu'une augmentation de la taille de la rate en comparaison aux souris wild type. Il semble

## A Lymphocytes T CD4+

### SMCR8 KO

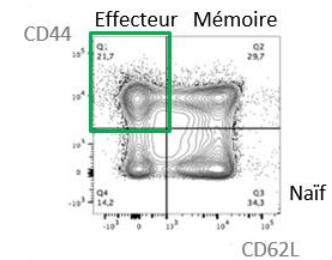
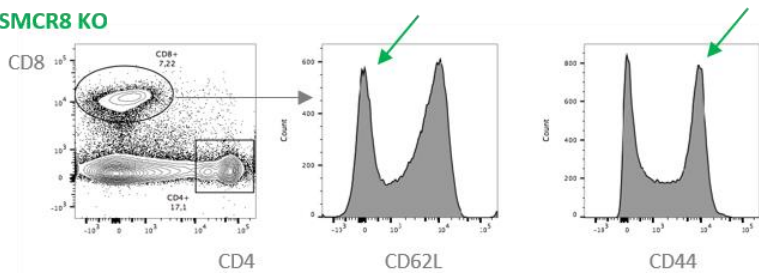


### WT



## B Lymphocytes T CD8+

### SMCR8 KO



### WT

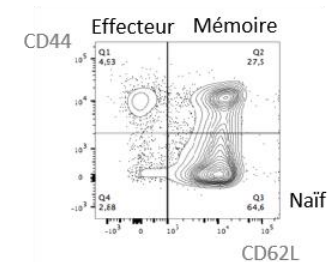
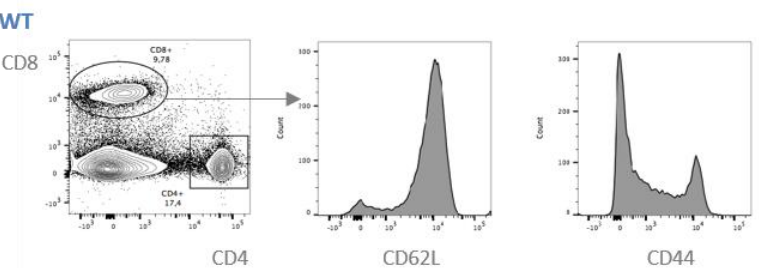


Figure 41 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques plasmacytoïdes des lignées *Smcr8* KO et wild type en cytométrie en flux

L'immunophénotypage a été réalisé sur des cellules de moelle osseuse de 2 animaux *Smcr8* KO et 2 wild type. Les lymphocytes T ont été marqués avec des anticorps CD4 et CD8 et leur état d'activation étudiés avec les anticorps CD62L et CD44. A) Etat d'activation des lymphocytes CD4+, B) Etat d'activation des lymphocytes T CD8+.

donc que la perte d'expression de *Smcr8* conduise à un phénotype immunitaire identique à la perte de *C9orf72*.

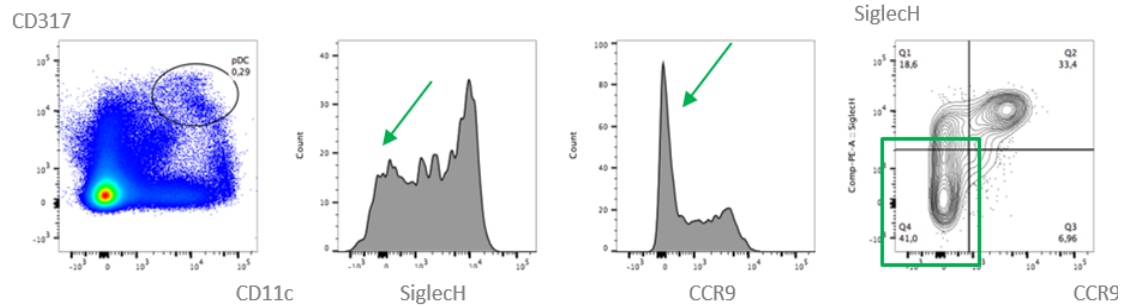
### C. Immunophénotypage des lymphocytes T chez les souris *Smcr8* KO

Afin de confirmer l'analogie de phénotype entre la perte de *C9orf72* et la perte de *Smcr8*, j'ai réalisé un immunophénotypage des lymphocytes T extraits de la rate de ces souris. La figure 41.A montre une population  $CD44^{\text{high}}/CD62L^{\text{low}}$ , correspondant aux lymphocytes T  $CD4^{+}$  effecteurs, plus importante chez les souris knock out pour le gène *Smcr8* comparées aux animaux wild type. Le ratio lymphocytes T  $CD4^{+}$  effecteurs/naïfs est d'environ 2:1 pour les souris *Smcr8* knock out alors qu'il est de 1 :2 chez les animaux wild type. De même, les souris *Smcr8* KO montrent plus de lymphocytes T  $CD8^{+}$  activés avec un ratio lymphocytes T  $CD8^{+}$  effecteurs/naïfs d'environ 1:1,6 pour les souris *Smcr8* KO et un ratio de 1:14 chez les souris contrôles (figure 41.B). Ces résultats indiquent que, comme pour les souris *C9orf72* KO, les lymphocytes T  $CD4^{+}$  et  $CD8^{+}$  sont plus activés chez les souris *Smcr8* KO. Il est à noter que des résultats identiques ont été observés dans d'autres modèles murins knock out pour *SMCR8* (Zhang *et al.*, 2018; McAlpine *et al.*, 2018a; Lan *et al.*, 2019).

### D. Immunophénotypage des cellules dendritiques plasmacytoïdes chez les souris *Smcr8* KO

En parallèle de l'immunophénotypage des lymphocytes T des souris *Smcr8* KO, j'ai analysé les cellules dendritiques de ces animaux. L'analyse de cellules dendritiques plasmacytoïdes ( $CD11b^{\text{low}}/CD11c^{\text{high}}/CD317^{\text{high}}$ ) extraites à partir de la rate de souris *Smcr8* KO montre une population cellulaire négative pour les marqueurs SiglecH et CCR9 comparée aux souris wild

## SMCR8 KO



## WT

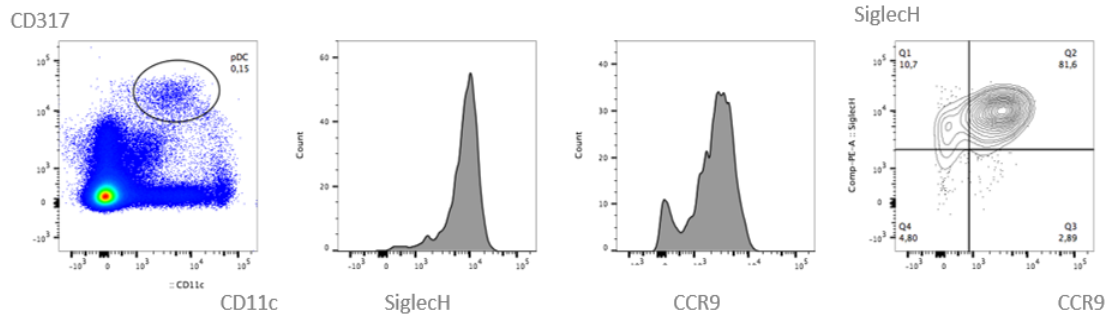


Figure 42 : Graphique en nuage de points présentant les résultats de l'analyse des cellules dendritiques plasmacytoïdes des lignées *Smcr8* KO et wild type en cytométrie en flux

L'immunophénotypage a été réalisé sur des cellules extraites à partir de la moelle osseuse de 2 animaux *Smcr8* KO et 2 wild type.

$CD11b^{low}/CD11c^{high}/CD317^{high}$  : cellules dendritiques plasmacytoïdes

type (figure 42). Ces résultats sont identiques à l'analyse des pDC de souris knock out pour le gène *C9orf72*, indiquant que ces deux protéines, Smcr8 et C9orf72, ont des fonctions similaires dans le système immunitaire et notamment dans l'activation des pDC.

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ces trois années de thèse, j'ai concentré mes travaux sur l'étude de la protéine C9ORF72 et de ses fonctions. Ce projet a été d'autant plus difficile et enrichissant que très peu d'informations sur cette protéine étaient disponibles au moment où j'ai commencé ma thèse, ce qui m'a donné la chance de pouvoir suivre un projet de recherche sur différents domaines de recherche scientifique. J'ai ainsi pu étudier la protéine C9ORF72 à la fois par des expériences de biologie moléculaire, des analyses cellulaires et enfin dans un organisme entier, *in vivo*, dans des modèles murins.

## I. Caractérisation des fonctions moléculaires et cellulaires de C9ORF72

Une expansion de répétitions des nucléotides GGGGCC dans le gène *C9ORF72* est la principale cause de SLA et de DFT, et ces répétitions induisent une diminution partielle de l'expression de C9ORF72. En collaboration avec le docteur Chantal Sellier, j'ai tout d'abord essayé d'en apprendre un peu plus sur la fonction de C9ORF72, notamment en recherchant ses interactants. Nous avons montré par des expériences de co-immunoprécipitation suivies d'identification des protéines par spectrométrie de masse que la protéine C9ORF72 formait un complexe stable avec deux autres protéines : SMCR8 et WDR41. Des études bio-informatiques (Zhang *et al.*, 2012; Levine *et al.*, 2013) prédisent que les protéines C9ORF72 et SMCR8 sont des facteurs d'échange GDP/GTP pour les Rab GTPases, de petites protéines

impliquées dans le trafic vésiculaire intracellulaire. Nous avons pu confirmer ces prédictions en établissant que le complexe C9ORF72/SMCR8/WDR41 régula l'échange de GDP pour du GTP pour les Rab GTPases Rab8a et Rab39b, qui sont notamment impliquées dans l'autophagie. En accord avec ces données, nous avons alors montré que la diminution d'expression de la protéine C9ORF72 dans des modèles cellulaires neuronaux engendrait une altération partielle de l'autophagie. De plus, nous avons démontré que si la perte d'expression de C9ORF72 seule ne conduit pas à une mort neuronale, elle permet la sensibilisation des neurones à un second stress, comme d'autres protéines ayant tendance à s'agréger et ayant besoin d'être dégradées par autophagie (par exemple l'Ataxine 2 avec une expansion de polyglutamines). Ces résultats ont pu être confirmés par l'équipe du Dr. Edor Kabashi chez le poisson zèbre, ce qui conduit à une publication dont je suis co-auteur (Sellier *et al.*, 2016).

Sur la base de ces résultats, nous nous sommes alors demandé quelles étaient les conséquences de la perte d'expression de la protéine C9ORF72 *in vivo*. Nous avons donc généré un modèle murin knock out pour le gène *C9orf72*, notamment dans l'espoir de reproduire et d'étudier un phénotype correspondant à une SLA et/ou une DFT.

## II. Conséquences de la perte de C9ORF72 en modèle murin

Nous avons généré un modèle de souris où les exons 5 et 6 du gène *C9orf72* sont floxés, conduisant ainsi à une perte totale d'expression de *C9orf72* dans la descendance de ces animaux croisés avec des souris exprimant la recombinaison Cre (souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre). Toutefois, et contrairement à nos attentes, le phénotypage des individus mâles de cette lignée ne montre pas d'altérations locomotrices, de perte de force musculaire ni aucun

changement notable de comportement ou de mémoire, ni de perte évidente de neurones moteurs ou autres. En revanche, ces animaux développent une hyperplasie de la rate et des ganglions lymphatiques, marquée par une hyperprolifération des lymphocytes B et des plasmocytes. Des analyses du sérum de ces souris révèlent ainsi une augmentation des anticorps, IgM, IgA et IgG, conduisant à une glomérulonéphropathie et *in fine* à la mort de ces animaux en 10 à 15 mois, quand ceux-ci sont hébergés en animalerie non SPF. Ces résultats sont consistants avec ceux obtenus par des équipes ayant généré elles aussi des modèles KO pour *C9orf72* (Atanasio *et al.*, 2016 ; O'Rourke *et al.*, 2016 ; Sudria-Lopez *et al.*, 2016).

### III. Identification de la population cellulaire responsable du désordre immunitaire chez les souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre

#### A. Génération de nouveaux modèles murins KO pour le gène *C9orf72*

Afin d'étudier ce phénotype plus en détail, et tenter de mieux comprendre quelle population cellulaire pouvait être à l'origine de cette dérégulation immunitaire, nous avons alors croisé nos souris *C9orf72* flox avec des lignées Cre spécifiques des différentes populations immunitaires principales. Nous avons ainsi obtenu une perte d'expression de *C9orf72* spécifiquement dans les cellules dendritiques (CD11c Cre), les macrophages (LysM Cre), les lymphocytes B (Mb1 Cre) ou les lymphocytes T (CD4 Cre). De façon intéressante, les souris *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre développent une splénomégalie et une lymphadénopathie comparables à la perte totale de *C9orf72*. Au contraire, la perte d'expression de *C9orf72* spécifiquement dans les macrophages ou les lymphocytes B ou T ne reproduit pas ce phénotype inflammatoire. De même des analyses d'immunophénotypage

réalisées par l'équipe du Professeur Gros (IBMC) ne montrent pas d'altération des lymphocytes B ou T naïfs. Ces résultats suggèrent un rôle de *C9orf72* dans les cellules dendritiques.

## B. Immunophénotypage de la lignée cellulaire dendritique chez les souris KO pour *C9orf72*

Afin de tester si la perte de *C9orf72* pouvait avoir un impact sur le développement des cellules dendritiques, j'ai réalisé un immunophénotypage par cytométrie en flux des divers stades de différenciation de ces cellules, depuis leurs précurseurs myéloïdes communs jusqu'aux cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) et aux cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) matures. Nous n'avons observé aucun défaut de développement des cellules dendritiques extraites depuis la moelle osseuse, ni d'altérations des cDCs extraites de la rate des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre. En revanche, les cellules dendritiques plasmacytoïdes des souris KO pour *C9orf72* sont plus immatures comparées aux pDC des souris contrôles. En effet, nous observons une population cellulaire SiglecH<sup>low</sup>/CCR9<sup>low</sup> dans les pDC des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre, alors que ces cellules sont quasi inexistantes dans les pDC des souris wild type. L'immunophénotypage des souris *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre confirme ce résultat avec des pDC plus immatures que les pDC des souris wild type. Ces résultats sont pertinents pour le phénotype inflammatoire des souris *C9orf72* KO car les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont spécialisées dans la réponse aux infections virales via la sécrétion massive d'interféron. De plus, les pDC immatures (CD9<sup>high</sup>/SiglecH<sup>low</sup>) produisent plus d'interféron que les pDC matures CD9<sup>low</sup>/SiglecH<sup>high</sup>, qui n'en produiraient que des quantités négligeables (Bjorck *et al.*, 2011). Une augmentation de la production d'interféron par les pDC activant les lymphocytes T puis les lymphocytes B et leur production

d'immunoglobulines pourrait ainsi être un candidat solide pour expliquer le phénotype inflammatoire observé chez les souris *C9orf72* KO.

### C. Validation de la lignée cellulaire impliquée dans le phénotype inflammatoire

En parallèle de ces études d'immunophénotypage, j'ai testé plusieurs voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'inflammation. Pour cela, j'ai extrait les rates de souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre, purifié diverses populations immunitaires (lymphocytes B, lymphocytes T, cellules dendritiques et macrophages intrapéritonéaux) à l'aide de billes magnétiques couplées à des anticorps spécifiques. Ces différentes populations cellulaires ont été induites avec leurs ligands spécifiques, puis j'ai réalisé des immunoblots afin de comparer les changements d'expression et de phosphorylation dans différentes voies d'activation, notamment l'inflammation et l'inflammasome, mais aussi l'autophagie. De façon intéressante, les protéines (Traf3, Traf6, TLR9) dont l'expression varie entre cellules contrôle et *C9orf72* KO sont toutes impliquées dans la voie d'activation et de production d'interféron par les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Toutefois, après analyse par cytométrie en flux des cellules obtenues après purification avec les billes magnétiques couplées à un anticorps contre CD11c, nous avons pu constater la présence d'environ 30% d'autres cellules ne correspondant pas à des cellules dendritiques, certaines non identifiables avec nos marquages et d'autres correspondant à des lymphocytes B, dont certains, notamment dans la rate, peuvent exprimer le marqueur CD11c (Rubtsov *et al.*, 2015). Combiner la purification par billes magnétiques puis le tri par cytométrie en flux nous a alors permis d'obtenir des cellules dendritiques « pures », mais en quantité insuffisante pour réaliser des immunoblots. J'ai donc tenté de pallier ce problème en vérifiant l'expression de protéines impliquées dans la voie de

production de l'interféron directement par cytométrie en flux, en triant des pDC à partir de la rate de souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et wild type, avant de les induire avec du CpG de classe A (ODN1585) ou de classe B (ODN1826) qui induisent respectivement une production d'interféron ou une sécrétion de cytokines dépendante de la voie NF- $\kappa$ B. J'ai ensuite marqué intracellulairement les pDC induites avec le CpG de classe A avec des anticorps dirigés contre IRF7, Phospho-IRF7, TBK1 et Phospho-TBK1, et les pDC induites au CpG de classe B avec des anticorps dirigés contre NF- $\kappa$ B, Phospho-Nf- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  et Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ . Cependant, l'analyse par cytométrie en flux de ces cellules a montré qu'aucun de nos anticorps n'a donné de résultat en cytométrie, hormis peut-être les anticorps NF- $\kappa$ B et Phospho-NF- $\kappa$ B, empêchant ainsi l'étude de potentiels changement d'expression ou de phosphorylation de ces protéines.

#### IV. Reproduction du phénotype immature des pDC en cellules

Ces deux approches (immunophénotypage et immunoblotting) suggèrent un rôle de *C9orf72* dans la voie de production des interférons par les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Afin de confirmer cette hypothèse, j'ai alors différencié des cellules pDC « naïves » à partir de moelle osseuse de souris (BMpDC). Après différenciation et tri cellulaire, j'ai activé ces BMpDC avec des ligands mimant des acides nucléiques viraux. De façon intéressante, mes premières analyses par RT-qPCR montrent une expression d'interféron plus importante dans les cellules originaires des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre comparées aux souris contrôles. Ces résultats n'ont malheureusement été obtenus que deux fois, pour un total de quatre souris KO et quatre souris wild type. En effet, les quantités d'ARN extraites des BMpDC après leur induction étaient souvent trop faibles pour que les qPCR dirigées contre

l'ubiquitine, *C9orf72* et l'interféron conduisent à des données robustes. Ces résultats sont cependant prometteurs car ils pourraient expliquer le dysfonctionnement immunitaire observé chez les souris *C9orf72* KO. Toutefois, ils demandent encore à être confirmés, notamment par des dosages ELISA de l'interféron produit par des BMpDC différenciées à partir de souris *C9orf72* KO ou wild type.

## V. Modèle murin SMCR8

La protéine C9ORF72 étant en complexe avec SMCR8, une protéine présentant des domaines (DENN, longin) comparables à ceux de C9ORF72, nous avons cherché à savoir si la perte d'expression de *Smcr8* en modèle murin conduisait aussi à un phénotype inflammatoire. Effectivement, nous observons une hyperplasie des rates et ganglions chez les souris homozygotes *Smcr8* KO. De plus, comme pour les souris KO pour *C9orf72*, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont plus activés chez les souris *Smcr8* KO comparés aux lymphocytes T des souris wild type. Ces résultats sont consistants avec ceux obtenus par des équipes ayant généré elles aussi des modèles KO pour *Smcr8* (Zhang *et al.*, 2018; McAlpine *et al.*, 2018a; Lan *et al.*, 2019). Compte tenu de nos résultats sur les cellules dendritiques dans les souris *C9orf72* KO, j'ai alors analysé les pDC des souris *Smcr8* KO. Comme pour les souris knockout pour *C9orf72*, nous observons une population de pDC négative pour les marqueurs de maturité SiglecH et CCR9. Ces résultats sont à confirmer par l'étude de la production d'interféron dans des BMpDC dérivées de souris *Smcr8* KO, mais suggèrent que les deux protéines *C9orf72* et *Smcr8* jouent des rôles semblables au niveau du système immunitaire et notamment dans la biologie des pDC.

Il est à noter que l'étude de souris avec une perte globale de *Smcr8* (McAlpine *et al.*, 2018b) ou de *C9orf72* (O'Rourke *et al.*, 2016; Atanasio *et al.*, 2016) suggère une dysfonction des macrophages en absence de *C9orf72* et *Smcr8*. Cependant, notre modèle murin avec une perte spécifique de *C9orf72* dans les macrophages (*C9orf72* loxP/loxP x LysM Cre) ne montre pas de dysfonctions immunitaires comparables à celles observées dans les modèles *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre ou *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre. Il est donc possible que les altérations des macrophages observées dans les souris avec une perte globale de l'expression de *C9orf72* ou de *Smcr8* (Atanasio *et al.*, 2016; O'Rourke *et al.*, 2016; McAlpine *et al.*, 2018) soient éventuellement secondaires à une activation des cellules dendritiques.

## VI. Identification du rôle spécifique de du complexe *C9orf72*/*Smcr8* dans la régulation de la voie de signalisation TLR7/TLR9

Nous avons identifié que le complexe *C9orf72*/*Smcr8* joue un rôle dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Toutefois, il reste à comprendre le rôle moléculaire de ce complexe, notamment dans la production d'interféron. Cette voie de signalisation implique la reconnaissance d'acides nucléiques viraux par les récepteurs TLR7 et TLR9, qui présentent la particularité d'être inactifs dans le Golgi ou le réticulum endoplasmique mais qui sont activés par clivage de leur partie N-terminale en conditions acides. Ce clivage a lieu dans les endosomes acides où sont aussi présents les acides nucléiques des virus endocytés, un cloisonnement essentiel pour éviter l'activation des récepteurs TLR7/9 par les acides nucléiques cellulaires. Nos résultats précédents montrent que *C9orf72* régule des Rab GTPases spécifiques (Sellier *et al.*, 2016; Corbier and Sellier, 2017) et donc potentiellement le

trafic de vésicules spécifiques. Une hypothèse serait ainsi que le complexe C9orf72/Smcr8 régule le transit des endosomes vers les lysosomes, agissant ainsi sur leur acidification et donc le clivage et l'activation des récepteurs TLR7 et/ou TLR9. Il est aussi possible que les protéines C9orf72 et Smcr8 agissent dans la dégradation des TLR7/9 après leur activation. En effet, Yao et collaborateurs ont montré que Rab7b, localisé aux endosomes tardifs et aux lysosomes, se lie à TLR9 dans les macrophages afin de promouvoir sa dégradation (Yao *et al.*, 2009). C9orf72 étant une GEF pour différentes Rab GTPases, il est possible que la perte de son expression influence la dégradation de ces TLR et induise ainsi un changement d'expression d'interféron dans les pDC. Ces hypothèses sont à vérifier, notamment en testant la localisation, l'expression et le clivage des récepteurs TLR7 et TLR9 par immunofluorescence et immunoblotting dans des cellules BMpDC obtenues à partir de souris *C9orf72* KO et wild type. Cette hypothèse est appuyée par les résultats de O'Rourke *et al.* en 2016 et McAlpine *et al.* en 2018, qui ont observé une dysfonction du trafic lysosomal dans des macrophages dérivés de moelle osseuse de souris *C9orf72* KO ou des macrophages de souris *Smcr8*.

## VII. Autres modèles murins

### A. Modèle murin avec un KO spécifique de *C9orf72* dans les pDC

Nous observons une expression plus faible des facteurs de maturité CCR9 et SigleCH dans les pDC des souris *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre et *C9orf72* loxP/loxP x CD11c Cre ainsi qu'une expression plus forte de l'ARNm codant pour l'interféron dans des BMpDC de souris *C9orf72* KO que celles des animaux wild type. Ces résultats suggèrent que la perte d'expression de C9orf72 dans les pDC pourrait être à l'origine du phénotype inflammatoire observé dans ces

animaux. Toutefois, les souris CD11c Cre expriment la recombinaise Cre à la fois dans les cellules dendritiques conventionnelles et dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Afin de vérifier l'importance de *C9orf72* pour les pDC, indépendamment de la perte d'expression de *C9orf72* dans les cDC, nous avons croisé des souris *C9orf72* flox avec des souris exprimant la Cre recombinaise spécifiquement dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (SiglecH Cre). Cette nouvelle lignée de souris devrait ainsi nous permettre de confirmer l'implication des pDC dans le phénotype inflammatoire observé dans nos modèles murins.

#### B. Modèle murin présentant un double KO pour *C9orf72* et le récepteur à l'interféron

Nos résultats suggèrent que la perte d'expression de *C9orf72* conduise à une augmentation de la production d'interféron par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, qui provoquerait l'activation du système immunitaire et donc le phénotype inflammatoire observé dans les animaux *C9orf72* KO. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons croisé des animaux *C9orf72* loxP/loxP x CMV Cre avec des souris présentant un knock out global pour le récepteur aux interférons (*IFNAR* KO). Nous espérons ainsi bloquer l'effet de la surproduction d'interféron et corriger la splénomégalie et la lymphadénopathie observées chez les souris knockout pour *C9orf72*, démontrant ainsi le rôle crucial de l'interféron et donc des pDC dans l'apparition de ce phénotype.

En conclusion, ces résultats suggèrent un rôle régulateur de *C9orf72* dans la production d'interféron par les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Toutefois, en ce qui concerne la sclérose latérale amyotrophique et la démence frontotemporale, nos résultats sur les souris knock out pour le gène *C9orf72* indiquent que la perte d'expression de ce gène n'est pas une cause majeure de mort neuronale. Cependant, il est connu que l'inflammation joue un rôle important dans le développement de cette maladie, et il n'est donc pas exclu que la perte d'expression de *C9orf72* soit impliquée dans ce mécanisme. De plus, nos résultats en modèles cellulaires montrent que la perte d'expression de *C9orf72* conduit à une autophagie sous optimale qui sensibilise les neurones à un deuxième stress comme l'expression de protéines ayant tendance à s'agréger. Il est donc possible que la perte d'expression de *C9orf72* dans un modèle animal n'ait de conséquence neuronale qu'en présence d'un deuxième stress. On peut ainsi espérer que l'étude des souris *C9orf72* KO croisées avec des souris exprimant des protéines prônes à s'agréger (comme ATXN2 avec des polyQ ou TDP-43 mutée) permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la SLA/DFT.

# **BIBLIOGRAPHIE**

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., Baker, D.L., and Baker, A. (2018). Cellular and molecular immunology (Philadelphia, PA: Elsevier).

Akira, S. (2011). Innate immunity and adjuvants. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 366, 2748–2755.

Almeida, S., Gascon, E., Tran, H., Chou, H.J., Gendron, T.F., Degroot, S., Tapper, A.R., Sellier, C., Charlet-Berguerand, N., Karydas, A., et al. (2013). Modeling key pathological features of frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansion in iPSC-derived human neurons. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 126, 385–399.

Andersen, P. (1997). Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia. *Brain* 120, 1723–1737.

Ardavín, C., del Hoyo, G.M., Martín, P., Anjuère, F., Arias, C.F., Marín, A.R., Ruiz, S., Parrillas, V., and Hernández, H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.* 22, 691–700.

Atanasio, A., Decman, V., White, D., Ramos, M., Ikiz, B., Lee, H.-C., Siao, C.-J., Brydges, S., LaRosa, E., Bai, Y., et al. (2016). C9orf72 ablation causes immune dysregulation characterized by leukocyte expansion, autoantibody production and glomerulonephropathy in mice. *Sci. Rep.* 6.

Baker, M., Mackenzie, I.R., Pickering-Brown, S.M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., Snowden, J., Adamson, J., Sadovnick, A.D., Rollinson, S., et al. (2006). Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442, 916–919.

Bao, M., and Liu, Y.-J. (2013). Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein Cell* 4, 40–52.

Baumann, P., Nyman, J., Hoyer, M., Wennberg, B., Gagliardi, G., Lax, I., Drugge, N., Ekberg, L., Friesland, S., Johansson, K.-A., et al. (2009). Outcome in a Prospective Phase II Trial of Medically Inoperable Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Stereotactic Body Radiotherapy. *J. Clin. Oncol.* 27, 3290–3296.

Beasley, D.E., Koltz, A.M., Lambert, J.E., Fierer, N., and Dunn, R.R. (2015). The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome. *PloS One* 10, e0134116–e0134116.

Behrends, C., Sowa, M.E., Gygi, S.P., and Harper, J.W. (2011). Network organization of the human autophagy system. 23.

Belz, G.T., and Nutt, S.L. (2012). Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 101–113.

Belzil, V.V., Bauer, P.O., Prudencio, M., Gendron, T.F., Stetler, C.T., Yan, I.K., Pregent, L., Daugherty, L., Baker, M.C., Rademakers, R., et al. (2013). Reduced C9orf72 gene expression in c9FTD/ALS is caused by histone trimethylation, an epigenetic event detectable in blood. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 126, 895–905.

Benussi, L., Rossi, G., Glionna, M., Tonoli, E., Piccoli, E., Fostinelli, S., Paterlini, A., Flocco, R., Albani, D., Pantieri, R., et al. (2013). C9ORF72 Hexanucleotide Repeat Number in Frontotemporal Lobar Degeneration: A Genotype-Phenotype Correlation Study. *J. Alzheimers Dis.* 38, 799–808.

Beyersdorf, N., Kerkau, T., and Hünig, T. (2015). CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *ImmunoTargets Ther.* 4, 111–122.

- Bjorck, P., Leong, H.X., and Engleman, E.G. (2011). Plasmacytoid Dendritic Cell Dichotomy: Identification of IFN- Producing Cells as a Phenotypically and Functionally Distinct Subset. *J. Immunol.* *186*, 1477–1485.
- Blasius, A.L., and Beutler, B. (2010). Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* *32*, 305–315.
- van Blitterswijk, M., van Es, M.A., Hennekam, E.A.M., Dooijes, D., van Rheenen, W., Medic, J., Bourque, P.R., Schelhaas, H.J., van der Kooi, A.J., de Visser, M., et al. (2012). Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 3776–3784.
- Blokhuis, A.M., Groen, E.J.N., Koppers, M., van den Berg, L.H., and Pasterkamp, R.J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *125*, 777–794.
- Boeynaems, S., Bogaert, E., Van Damme, P., and Van Den Bosch, L. (2016). Inside out: the role of nucleocytoplasmic transport in ALS and FTL. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *132*, 159–173.
- Brown, R.H., and Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *377*, 162–172.
- Burberry, A., Suzuki, N., Wang, J.-Y., Moccia, R., Mordes, D.A., Stewart, M.H., Suzuki-Uematsu, S., Ghosh, S., Singh, A., Merkle, F.T., et al. (2016). Loss-of-function mutations in the C9ORF72 mouse ortholog cause fatal autoimmune disease. *Sci. Transl. Med.* *8*, 347ra93-347ra93.
- Burrell, J.R., Kiernan, M.C., Hodges, J.R., and Vucic, S. (2011). Motor Neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain* *134*, 2582–2594.
- Butow, R.A., and Avadhani, N.G. (2004). Mitochondrial Signaling: The Retrograde Response. *Mol. Cell* *14*, 1–15.
- Castell-Rodríguez, A., Piñón-Zárate, G., Herrera-Enríquez, M., Jarquín-Yáñez, K., and Medina-Solares, I. (2017). Dendritic Cells: Location, Function, and Clinical Implications. In *Biology of Myelomonocytic Cells*, A. Ghosh, ed. (InTech), p.
- Chaplin, D.D. (2010). Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S3–S23.
- Chen, S., Sayana, P., Zhang, X., and Le, W. (2013). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Mol. Neurodegener.* *8*, 28.
- Chiang, P.-M., Ling, J., Jeong, Y.H., Price, D.L., Aja, S.M., and Wong, P.C. (2010). Deletion of TDP-43 down-regulates Tbc1d1, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 16320–16324.
- Chiò, A., Traynor, B.J., Lombardo, F., Fimognari, M., Calvo, A., Ghiglione, P., Mutani, R., and Restagno, G. (2008). Prevalence of *SOD1* mutations in the Italian ALS population. *Neurology* *70*, 533.
- Chiò, A., Calvo, A., Moglia, C., Restagno, G., Ossola, I., Brunetti, M., Montuschi, A., Cistaro, A., Ticca, A., Traynor, B.J., et al. (2010). Amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal lobar dementia in 3 families with p.Ala382Thr TARDBP mutations. *Arch. Neurol.* *67*, 1002–1009.
- Chiò, A., Borghero, G., Pugliatti, M., Ticca, A., Calvo, A., Moglia, C., Mutani, R., Brunetti, M., Ossola, I., Marrosu, M.G., et al. (2011). Large proportion of amyotrophic lateral sclerosis cases in Sardinia due to a single founder mutation of the TARDBP gene. *Arch. Neurol.* *68*, 594–598.

- Chiò, A., Restagno, G., Brunetti, M., Ossola, I., Calvo, A., Canosa, A., Moglia, C., Floris, G., Tacconi, P., Marrosu, F., et al. (2012). ALS/FTD phenotype in two Sardinian families carrying both C9ORF72 and TARDBP mutations. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 83, 730–733.
- Cirulli, E.T., Lasseigne, B.N., Petrovski, S., Sapp, P.C., Dion, P.A., Leblond, C.S., Couthouis, J., Lu, Y.-F., Wang, Q., Krueger, B.J., et al. (2015). Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science* 347, 1436–1441.
- Ciura, S., Lattante, S., Le Ber, I., Latouche, M., Tostivint, H., Brice, A., and Kabashi, E. (2013). Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 74, 180–187.
- Cooper-Knock, J., Bury, J.J., Heath, P.R., Wyles, M., Higginbottom, A., Gelsthorpe, C., Highley, J.R., Hautbergue, G., Rattray, M., Kirby, J., et al. (2015). C9ORF72 GGGGCC Expanded Repeats Produce Splicing Dysregulation which Correlates with Disease Severity in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PloS One* 10, e0127376–e0127376.
- Corbier, C., and Sellier, C. (2017). C9ORF72 is a GDP/GTP exchange factor for Rab8 and Rab39 and regulates autophagy. *Small GTPases* 8, 181–186.
- Cota, A.M., and Midwinter, M.J. (2012). The immune system. *Anaesth. Intensive Care Med.* 13, 273–275.
- Coyle-Gilchrist, I.T., Dick, K.M., Patterson, K., Rodríguez, P.V., Wehmann, E., Wilcox, A., Lansdall, C.J., Dawson, K.E., Wiggins, J., and Mead, S. (2016). Prevalence, characteristics, and survival of frontotemporal lobar degeneration syndromes. *Neurology* 86, 1736–1743.
- Cudkowicz, M.E., and Brown, R.H., Jr (1996). An update on superoxide dismutase 1 in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 139, 10–15.
- Cuervo, A.M., and Wong, E. (2013). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 24, 92.
- Cui, R., Tuo, M., Li, P., and Zhou, C. (2018). Association between TBK1 mutations and risk of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia spectrum: a meta-analysis. *Neurol. Sci.* 39, 811–820.
- Deacon, S.W., and Gelfand, V.I. (2001). Of yeast, mice, and men. Rab proteins and organelle transport. *J. Cell Biol.* 152, F21–F24.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., et al. (2011). Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245–256.
- Deng, H., Gao, K., and Jankovic, J. (2014). The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 10, 337.
- Deng, H.-X., Chen, W., Hong, S.-T., Boycott, K.M., Gorrie, G.H., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H., et al. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477, 211–215.

Dooley, H.C., Razi, M., Polson, H.E.J., Girardin, S.E., Wilson, M.I., and Tooze, S.A. (2014). WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol. Cell* 55, 238–252.

Dormann, D., Rodde, R., Edbauer, D., Bentmann, E., Fischer, I., Hruscha, A., Than, M.E., Mackenzie, I.R.A., Capell, A., Schmid, B., et al. (2010). ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J.* 29, 2841–2857.

Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Cameroni, E., and De Virgilio, C. (2005). The TOR and EGO Protein Complexes Orchestrate Microautophagy in Yeast. *Mol. Cell* 19, 15–26.

Duran, A., Linares, J.F., Galvez, A.S., Wikenheiser, K., Flores, J.M., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2008). The Signaling Adaptor p62 Is an Important NF- $\kappa$ B Mediator in Tumorigenesis. *Cancer Cell* 13, 343–354.

de DUVE, C. (1983). Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* 137, 391–397.

Ebstein, S.Y., Yagudayeva, I., and Shneider, N.A. (2019). Mutant TDP-43 Causes Early-Stage Dose-Dependent Motor Neuron Degeneration in a TARDBP Knockin Mouse Model of ALS. *Cell Rep.* 26, 364–373.e4.

Egan, D.F., Chun, M.G.H., Vamos, M., Zou, H., Rong, J., Miller, C.J., Lou, H.J., Raveendra-Panickar, D., Yang, C.-C., Sheffler, D.J., et al. (2015). Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Mol. Cell* 59, 285–297.

Ewald, S.E., Lee, B.L., Lau, L., Wickliffe, K.E., Shi, G.-P., Chapman, H.A., and Barton, G.M. (2008). The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456, 658–662.

Farg, M.A., Sundaramoorthy, V., Sultana, J.M., Yang, S., Atkinson, R.A.K., Levina, V., Halloran, M.A., Gleeson, P.A., Blair, I.P., Soo, K.Y., et al. (2014). C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3579–3595.

Fecto, F., Yan, J., Vemula, S.P., Liu, E., Yang, Y., Chen, W., Zheng, J.G., Shi, Y., Siddique, N., Arrat, H., et al. (2011). SQSTM1 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* 68, 1440–1446.

Fratta, P., Sivakumar, P., Humphrey, J., Lo, K., Ricketts, T., Oliveira, H., Brito-Armas, J.M., Kalmar, B., Ule, A., Yu, Y., et al. (2018). Mice with endogenous TDP-43 mutations exhibit gain of splicing function and characteristics of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.* 37, e98684.

Freibaum, B.D., Lu, Y., Lopez-Gonzalez, R., Kim, N.C., Almeida, S., Lee, K.-H., Badders, N., Valentine, M., Miller, B.L., Wong, P.C., et al. (2015). GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature* 525, 129–133.

Freischmidt, A., Wieland, T., Richter, B., Ruf, W., Schaeffer, V., Müller, K., Marroquin, N., Nordin, F., Hübers, A., Weydt, P., et al. (2015). Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat. Neurosci.* 18, 631–636.

Frick, P., Sellier, C., Mackenzie, I.R.A., Cheng, C.-Y., Tahraoui-Bories, J., Martinat, C., Pasterkamp, R.J., Prudlo, J., Edbauer, D., Oulad-Abdelghani, M., et al. (2018). Novel antibodies reveal presynaptic localization of C9orf72 protein and reduced protein levels in C9orf72 mutation carriers. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 72–72.

Galimberti, D., Arosio, B., Fenoglio, C., Serpente, M., Cioffi, S.M.G., Bonsi, R., Rossi, P., Abbate, C., Mari, D., and Scarpini, E. (2014). Incomplete Penetrance of the C9ORF72 Hexanucleotide Repeat Expansions: Frequency in a Cohort of Geriatric Non-Demented Subjects. *J. Alzheimers Dis.* 39, 19–22.

Gendron, T.F., Bieniek, K.F., Zhang, Y.-J., Jansen-West, K., Ash, P.E.A., Caulfield, T., Daugherty, L., Dunmore, J.H., Castanedes-Casey, M., Chew, J., et al. (2013). Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 126, 829–844.

Giannandrea, M., Bianchi, V., Mignogna, M.L., Sirri, A., Carrabino, S., D’Elia, E., Vecellio, M., Russo, S., Cogliati, F., Larizza, L., et al. (2010). Mutations in the small GTPase gene RAB39B are responsible for X-linked mental retardation associated with autism, epilepsy, and macrocephaly. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 185–195.

Gijssels, I., Van Mossevelde, S., van der Zee, J., Sieben, A., Engelborghs, S., De Bleecker, J., Ivanoiu, A., Deryck, O., Edbauer, D., and Zhang, M. (2016). The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Mol. Psychiatry* 21, 1112.

Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221, 3–12.

Gomes, L.R., Menck, C.F.M., and Leandro, G.S. (2017). Autophagy Roles in the Modulation of DNA Repair Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2351.

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., et al. (2014). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547.

Guiducci, C., Coffman, R.L., and Barrat, F.J. (2009). Signalling pathways leading to IFN- $\alpha$  production in human plasmacytoid dendritic cell and the possible use of agonists or antagonists of TLR7 and TLR9 in clinical indications. *J. Intern. Med.* 265, 43–57.

Guo, Q., Lehmer, C., Martínez-Sánchez, A., Rudack, T., Beck, F., Hartmann, H., Pérez-Berlanga, M., Frottin, F., Hipp, M.S., Hartl, F.U., et al. (2018). In Situ Structure of Neuronal C9orf72 Poly-GA Aggregates Reveals Proteasome Recruitment. *Cell* 172, 696-705.e12.

Haeusler, A.R., Donnelly, C.J., Periz, G., Simko, E.A.J., Shaw, P.G., Kim, M.-S., Maragakis, N.J., Troncoso, J.C., Pandey, A., Sattler, R., et al. (2014). C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature* 507, 195–200.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., et al. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889.

Hayat, M.A. (2017). Chapter 1 - Overview of Autophagy. In *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, M.A. Hayat, ed. (Academic Press), pp. 3–90.

Hentges, F. (1994). B lymphocyte ontogeny and immunoglobulin production. *Clin. Exp. Immunol.* 97 Suppl 1, 3–9.

Hicks, G.G., Singh, N., Nashabi, A., Mai, S., Bozek, G., Klewes, L., Arapovic, D., White, E.K., Koury, M.J., Oltz, E.M., et al. (2000). *Fus* deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nat. Genet.* 24, 175–179.

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., et al. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772–777.

Huston, D.P. (1997). The Biology of the Immune System. *JAMA* 278, 1804–1814.

Janeway, C.J., Travers, P., and Walport, M. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (New York: Garland Science).

Jiang, J., Zhu, Q., Gendron, T.F., Saberi, S., McAlonis-Downes, M., Seelman, A., Stauffer, J.E., Jafar-Nejad, P., Drenner, K., Schulte, D., et al. (2016). Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron* 90, 535–550.

Johnson, C.W., Melia, T.J., and Yamamoto, A. (2012). Modulating macroautophagy: a neuronal perspective. *Future Med. Chem.* 4, 1715–1731.

Johnson, J.O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Gibbs, J.R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., et al. (2010). Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 68, 857–864.

Jost, P.J., and Höckendorf, U. (2019). Necroinflammation emerges as a key regulator of hematopoiesis in health and disease. *Cell Death Differ.* 26, 53–67.

Jovičić, A., Mertens, J., Boeynaems, S., Bogaert, E., Chai, N., Yamada, S.B., Paul, J.W., 3rd, Sun, S., Herdy, J.R., Bieri, G., et al. (2015). Modifiers of C9orf72 dipeptide repeat toxicity connect nucleocytoplasmic transport defects to FTD/ALS. *Nat. Neurosci.* 18, 1226–1229.

Ju, J.-S., Miller, S.E., Jackson, E., Cadwell, K., Piwnicka-Worms, D., and Weihl, C.C. (2009). Quantitation of selective autophagic protein aggregate degradation in vitro and in vivo using luciferase reporters. *Autophagy* 5, 511–519.

Kabashi, E., Valdmanis, P.N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B.J., Velde, C.V., Bouchard, J.-P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., et al. (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* 40, 572–574.

Kachaner, D. (2012). Optineurine, un nouveau régulateur de la mitose. 201.

Kaufmann, S.H.E. (2007). The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 491–504.

Kawai, T., Sato, S., Ishii, K.J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., et al. (2004). Interferon- $\alpha$  induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat. Immunol.* 5, 1061–1068.

Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* 5.

- Khosravi, B., Hartmann, H., May, S., Möhl, C., Ederle, H., Michaelson, M., Schludi, M.H., Dormann, D., and Edbauer, D. (2016). Cytoplasmic poly-GA aggregates impair nuclear import of TDP-43 in *C9orf72* ALS/FTLD. *Hum. Mol. Genet.* *ddw432*.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* *13*, 132–141.
- Kino, Y., Washizu, C., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Akagi, T., Hashikawa, T., Doi, H., Takumi, T., Hicks, G.G., et al. (2015). FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. Commun.* *3*.
- Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I., and Dikic, I. (2009). A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Mol. Cell* *34*, 259–269.
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., et al. (2007). Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice. *Cell* *131*, 1149–1163.
- Koppers, M., Blokhuis, A.M., Westeneng, H.-J., Terpstra, M.L., Zundel, C.A.C., Vieira de Sá, R., Schellevis, R.D., Waite, A.J., Blake, D.J., Veldink, J.H., et al. (2015). *C9orf72* ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann. Neurol.* *78*, 426–438.
- Kovacs, G.G., van der Zee, J., Hort, J., Kristoferitsch, W., Leitha, T., Höftberger, R., Ströbel, T., Van Broeckhoven, C., and Matej, R. (2016). Clinicopathological description of two cases with SQSTM1 gene mutation associated with frontotemporal dementia. *Neuropathology* *36*, 27–38.
- Kraemer, B.C., Schuck, T., Wheeler, J.M., Robinson, L.C., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., and Schellenberg, G.D. (2010). Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *119*, 409–419.
- Kühnlein, P., Gdynia, H.-J., Sperfeld, A.-D., Lindner-Pfleghar, B., Ludolph, A.C., Prossiegel, M., and Riecker, A. (2008). Diagnosis and treatment of bulbar symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* *4*, 366–374.
- Kuroda, M., Sok, J., Webb, L., Baechtold, H., Urano, F., Yin, Y., Chung, P., de Rooij, D.G., Akhmedov, A., Ashley, T., et al. (2000). Male sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS(-/-) mice. *EMBO J.* *19*, 453–462.
- Kwiatkowski, T.J., Bosco, D.A., LeClerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., et al. (2009). Mutations in the *FUS/TLS* Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* *323*, 1205.
- Kwon, I., Xiang, S., Kato, M., Wu, L., Theodoropoulos, P., Wang, T., Kim, J., Yun, J., Xie, Y., and McKnight, S.L. (2014). Poly-dipeptides encoded by the *C9orf72* repeats bind nucleoli, impede RNA biogenesis, and kill cells. *Science* *345*, 1139–1145.
- Lagier-Tourenne, C., Baughn, M., Rigo, F., Sun, S., Liu, P., Li, H.-R., Jiang, J., Watt, A.T., Chun, S., Katz, M., et al. (2013). Targeted degradation of sense and antisense *C9orf72* RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E4530–E4539.
- Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H., and Finkel, P. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int. J. Cosmet. Sci.* *28*, 359–370.

- Lan, Y., Sullivan, P.M., and Hu, F. (2019). SMCR8 negatively regulates AKT and MTORC1 signaling to modulate lysosome biogenesis and tissue homeostasis. *Autophagy* 15, 871–885.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T., and Golenbock, D.T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* 5, 190–198.
- Le Ber, I., Camuzat, A., Guerreiro, R., Bouya-Ahmed, K., Bras, J., Nicolas, G., Gabelle, A., Didic, M., De Septenville, A., Millecamps, S., et al. (2013). SQSTM1 mutations in French patients with frontotemporal dementia or frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol.* 70, 1403–1410.
- Leopold Wager, C.M., and Wormley Jr, F.L. (2014). Classical versus alternative macrophage activation: the Ying and the Yang in host defense against pulmonary fungal infections. *Mucosal Immunol.* 7, 1023.
- Levine, T.P., Daniels, R.D., Gatta, A.T., Wong, L.H., and Hayes, M.J. (2013). The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29, 499–503.
- Li, S., Wu, J., Zhu, S., Liu, Y.-J., and Chen, J. (2017). Disease-Associated Plasmacytoid Dendritic Cells. *Front. Immunol.* 8.
- Ling, S.-C., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2013). Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* 79, 416–438.
- Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunol. Rev.* 234, 45–54.
- Logroscino, G., Traynor, B.J., Hardiman, O., Chio, A., Mitchell, D., Swingler, R.J., Millul, A., Benn, E., Beghi, E., and for EURALS (2010). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81, 385–390.
- López-Erauskin, J., Tadokoro, T., Baughn, M.W., Myers, B., McAlonis-Downes, M., Chillon-Marinas, C., Asiaban, J.N., Artates, J., Bui, A.T., Vetto, A.P., et al. (2018). ALS/FTD-Linked Mutation in FUS Suppresses Intra-axonal Protein Synthesis and Drives Disease Without Nuclear Loss-of-Function of FUS. *Neuron* 100, 816-830.e7.
- Lui, G., Manches, O., Angel, J., Molens, J.-P., Chaperot, L., and Plumas, J. (2009). Plasmacytoid Dendritic Cells Capture and Cross-Present Viral Antigens from Influenza-Virus Exposed Cells. *PLoS ONE* 4, e7111.
- Mackenzie, I.R.A., Frick, P., Grässer, F.A., Gendron, T.F., Petrucelli, L., Cashman, N.R., Edbauer, D., Kremmer, E., Prudlo, J., Troost, D., et al. (2015). Quantitative analysis and clinico-pathological correlations of different dipeptide repeat protein pathologies in C9ORF72 mutation carriers. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 130, 845–861.
- Majounie, E., Renton, A.E., Mok, K., Dopper, E.G., Waite, A., Rollinson, S., Chiò, A., Restagno, G., Nicolaou, N., and Simon-Sanchez, J. (2012). Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 11, 323–330.
- Marshak-Rothstein, A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 823–835.

Maruyama, H., and Kawakami, H. (2013). Optineurin and amyotrophic lateral sclerosis: Optineurin and ALS. *Geriatr. Gerontol. Int.* 13, 528–532.

Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., et al. (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465, 223.

May, S., Hornburg, D., Schludi, M.H., Arzberger, T., Rentzsch, K., Schwenk, B.M., Grässer, F.A., Mori, K., Kremmer, E., Banzhaf-Strathmann, J., et al. (2014). C9orf72 FTLD/ALS-associated Gly-Ala dipeptide repeat proteins cause neuronal toxicity and Unc119 sequestration. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 128, 485–503.

McAlpine, W., Sun, L., Wang, K., Liu, A., Jain, R., San Miguel, M., Wang, J., Zhang, Z., Hayse, B., McAlpine, S.G., et al. (2018a). Excessive endosomal TLR signaling causes inflammatory disease in mice with defective SMCR8-WDR41-C9ORF72 complex function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E11523–E11531.

McAlpine, W., Sun, L., Wang, K., Liu, A., Jain, R., San Miguel, M., Wang, J., Zhang, Z., Hayse, B., McAlpine, S.G., et al. (2018b). Excessive endosomal TLR signaling causes inflammatory disease in mice with defective SMCR8-WDR41-C9ORF72 complex function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E11523–E11531.

Medina, K.L. (2016). Chapter 4 - Overview of the immune system. In *Handbook of Clinical Neurology*, S.J. Pittock, and A. Vincent, eds. (Elsevier), pp. 61–76.

Mei, Y., Thompson, M.D., Cohen, R.A., and Tong, X. (2015). Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 243–251.

Mercy, L., Hodges, J.R., Dawson, K., Barker, R.A., and Brayne, C. (2008). Incidence of early-onset dementias in Cambridgeshire, United Kingdom. *Neurology* 71, 1496–1499.

Mitchell, J.C., McGoldrick, P., Vance, C., Hortobagyi, T., Sreedharan, J., Rogelj, B., Tudor, E.L., Smith, B.N., Klasen, C., Miller, C.C.J., et al. (2013). Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 125, 273–288.

Mizielinska, S., Grönke, S., Niccoli, T., Ridler, C.E., Clayton, E.L., Devoy, A., Moens, T., Norona, F.E., Woollacott, I.O.C., Pietrzyk, J., et al. (2014). C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in *Drosophila* through arginine-rich proteins. *Science* 345, 1192–1194.

Mori, K., Lammich, S., Mackenzie, I.R.A., Forné, I., Zilow, S., Kretschmar, H., Edbauer, D., Janssens, J., Kleinberger, G., Cruts, M., et al. (2013). hnRNP A3 binds to GGGGCC repeats and is a constituent of p62-positive/TDP43-negative inclusions in the hippocampus of patients with C9orf72 mutations. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 125, 413–423.

Moscat, J., Karin, M., and Diaz-Meco, M.T. (2016). p62 in Cancer: Signaling Adaptor Beyond Autophagy. *Cell* 167, 606–609.

Nazio, F., Strappazzon, F., Antonioli, M., Bielli, P., Cianfanelli, V., Bordi, M., Gretzmeier, C., Dengjel, J., Piacentini, M., Fimia, G.M., et al. (2013). mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat. Cell Biol.* 15, 406.

Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., et al. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* 314, 130.

- Novick, P., and Brennwald, P. (1993). Friends and family: The role of the rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* 75, 597–601.
- Olney, N.T., Spina, S., and Miller, B.L. (2017). Frontotemporal Dementia. *Neurol. Clin.* 35, 339–374.
- Olszewska, D.A., Lonergan, R., Fallon, E.M., and Lynch, T. (2016). Genetics of Frontotemporal Dementia. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 16.
- Orkin, S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* 1, 57–64.
- Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631–644.
- O’Rourke, J.G., Bogdanik, L., Yáñez, A., Lall, D., Wolf, A.J., Muhammad, A., Ho, R., Carmona, S., Vit, J.P., and Zarrow, J. (2016). C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science* 351, 1324–1329.
- Park, B., Brinkmann, M.M., Spooner, E., Lee, C.C., Kim, Y.-M., and Ploegh, H.L. (2008). Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* 9, 1407–1414.
- Parkin, J., and Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet* 357, 1777–1789.
- Peters, O.M., Cabrera, G.T., Tran, H., Gendron, T.F., McKeon, J.E., Metterville, J., Weiss, A., Wightman, N., Salameh, J., Kim, J., et al. (2015). Human C9ORF72 Hexanucleotide Expansion Reproduces RNA Foci and Dipeptide Repeat Proteins but Not Neurodegeneration in BAC Transgenic Mice. *Neuron* 88, 902–909.
- Pilli, M., Arko-Mensah, J., Ponpuak, M., Roberts, E., Master, S., Mandell, M.A., Dupont, N., Ornatowski, W., Jiang, S., Bradfute, S.B., et al. (2012). TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation. *Immunity* 37, 223–234.
- Podcasy, J.L., and Epperson, C.N. (2016). Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias. *Dialogues Clin. Neurosci.* 18, 437.
- Rademakers, R., Cruts, M., and van Broeckhoven, C. (2004). The role of tau (MAPT) in frontotemporal dementia and related tauopathies. *Hum. Mutat.* 24, 277–295.
- Reizis, B. (2019). Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity* 50, 37–50.
- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., et al. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72, 257–268.
- Renton, A.E., Chiò, A., and Traynor, B.J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* 17, 17–23.
- Ringholz, G.M., Appel, S.H., Bradshaw, M., Cooke, N.A., Mosnik, D.M., and Schulz, P.E. (2005). Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* 65, 586.

- Rohrer, J.D., Isaacs, A.M., Mizielska, S., Mead, S., Lashley, T., Wray, S., Sidle, K., Fratta, P., Orrell, R.W., Hardy, J., et al. (2015). C9orf72 expansions in frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 14, 291–301.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.-X., et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
- Rubtsov, A.V., Rubtsova, K., Kappler, J.W., Jacobelli, J., Friedman, R.S., and Marrack, P. (2015). CD11c-Expressing B Cells Are Located at the T Cell/B Cell Border in Spleen and Are Potent APCs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 195, 71–79.
- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., and Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* 15, 741–750.
- Salvador, N. (2000). Import of a Cytosolic Protein into Lysosomes by Chaperone-Mediated Autophagy depends on its Folding State. *J. Biol. Chem.*
- Santarasci, V., Cosmi, L., Maggi, L., Liotta, F., and Annunziato, F. (2013). IL-1 and T Helper Immune Responses. *Front. Immunol.* 4, 182–182.
- Sasaki, S. (2011). Autophagy in Spinal Cord Motor Neurons in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 349–359.
- Sathe, P., Metcalf, D., Vremec, D., Naik, S.H., Langdon, W.Y., Huntington, N.D., Wu, L., and Shortman, K. (2014). Lymphoid Tissue and Plasmacytoid Dendritic Cells and Macrophages Do Not Share a Common Macrophage-Dendritic Cell-Restricted Progenitor. *Immunity* 41, 104–115.
- Scekic-Zahirovic, J., Sendscheid, O., El Oussini, H., Jambeau, M., Sun, Y., Mersmann, S., Wagner, M., Dieterlé, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., et al. (2016). Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J.* 35, 1077–1097.
- Scekic-Zahirovic, J., Oussini, H.E., Mersmann, S., Drenner, K., Wagner, M., Sun, Y., Allmeroth, K., Dieterlé, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., et al. (2017). Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133, 887–906.
- Schwartz, S.L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A., and Wandinger-Ness, A. (2007). Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci.* 120, 3905.
- Sellier, C., Campanari, M., Julie Corbier, C., Gaucherot, A., Kolb-Cheynel, I., Oulad-Abdelghani, M., Ruffenach, F., Page, A., Ciura, S., Kabashi, E., et al. (2016). Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death. *EMBO J.* 35, 1276–1297.
- Sephton, C.F., Good, S.K., Atkin, S., Dewey, C.M., Mayer, P., Herz, J., and Yu, G. (2010). TDP-43 Is a Developmentally Regulated Protein Essential for Early Embryonic Development. *J. Biol. Chem.* 285, 6826–6834.
- Sheng, Y., Chattopadhyay, M., Whitelegge, J., and Selverstone Valentine, J. (2012). SOD1 Aggregation and ALS: Role of Metallation States and Disulfide Status. *Curr. Top. Med. Chem.* 12, 2560–2572.

- Shi, Y., Lin, S., Staats, K.A., Li, Y., Chang, W.-H., Hung, S.-T., Hendricks, E., Linares, G.R., Wang, Y., Son, E.Y., et al. (2018). Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. *Nat. Med.*
- Snowden, J.S., Neary, D., and Mann, D.M. (2002). Frontotemporal dementia. *Br. J. Psychiatry* *180*, 140–143.
- Soumelis, V., and Liu, Y.-J. (2006). From plasmacytoid to dendritic cell: Morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur. J. Immunol.* *36*, 2286–2292.
- Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., et al. (2008). TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* *319*, 1668.
- Stallings, N.R., Puttaparthi, K., Luther, C.M., Burns, D.K., and Elliott, J.L. (2010). Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiol. Dis.* *40*, 404–414.
- Stenmark, H., and Olkkonen, V.M. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biol.* *2*, REVIEWS3007–REVIEWS3007.
- Sudria-Lopez, E., Koppers, M., de Wit, M., van der Meer, C., Westeneng, H.-J., Zundel, C.A.C., Youssef, S.A., Harkema, L., de Bruin, A., Veldink, J.H., et al. (2016). Full ablation of C9orf72 in mice causes immune system-related pathology and neoplastic events but no motor neuron defects. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *132*, 145–147.
- Sullivan, P.M., Zhou, X., Robins, A.M., Paushter, D.H., Kim, D., Smolka, M.B., and Hu, F. (2016). The ALS/FTLD associated protein C9orf72 associates with SMCR8 and WDR41 to regulate the autophagy-lysosome pathway. *Acta Neuropathol. Commun.* *4*, 51–51.
- Swash, M., and Desai, J. (2000). Motor neuron disease: classification and nomenclature. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* *1*, 105–112.
- Tao, Z., Wang, H., Xia, Q., Li, K., Li, K., Jiang, X., Xu, G., Wang, G., and Ying, Z. (2015). Nucleolar stress and impaired stress granule formation contribute to C9orf72 RAN translation-induced cytotoxicity. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 2426–2441.
- Tekirdag, K., and Cuervo, A.M. (2018). Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Jointed by a chaperone. *J. Biol. Chem.* *293*, 5414–5424.
- Van Deerlin, V.M., Leverenz, J.B., Bekris, L.M., Bird, T.D., Yuan, W., Elman, L.B., Clay, D., Wood, E.M., Chen-Plotkin, A.S., Martinez-Lage, M., et al. (2008). TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet Neurol.* *7*, 409–416.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., et al. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* *323*, 1208–1211.
- Vance, C., Scotter, E.L., Nishimura, A.L., Troakes, C., Mitchell, J.C., Kathe, C., Urwin, H., Manser, C., Miller, C.C., Hortobágyi, T., et al. (2013). ALS mutant FUS disrupts nuclear localization and sequesters wild-type FUS within cytoplasmic stress granules. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 2676–2688.
- Vandal, S.E., Zheng, X., and Ahmad, S.T. (2018). Molecular Genetics of Frontotemporal Dementia Elucidated by *Drosophila* Models-Defects in Endosomal-Lysosomal Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 1714.

Vandenberghe, R. (2016). Classification of the primary progressive aphasia: principles and review of progress since 2011. *Alzheimers Res. Ther.* 8.

Vats, A., Verma, M., Gourie-Devi, M., and Taneja, V. (2014). C9ORF72 repeat expansion: a genetic mutation associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Med. Res. Pract.* 4, 161–167.

Verbeeck, C., Deng, Q., DeJesus-Hernandez, M., Taylor, G., Ceballos-Diaz, C., Kocerha, J., Golde, T., Das, P., Rademakers, R., Dickson, D.W., et al. (2012). Expression of Fused in sarcoma mutations in mice recapitulates the neuropathology of FUS proteinopathies and provides insight into disease pathogenesis. *Mol. Neurodegener.* 7, 53–53.

Vieira, R.T., Caixeta, L., Machado, S., Silva, A.C., Nardi, A.E., Arias-Carrión, O., and Carta, M.G. (2013). Epidemiology of early-onset dementia: a review of the literature. *Clin. Pract. Epidemiol. Ment. Health CP EMH* 9, 88.

Villadangos, J.A., and Young, L. (2008). Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* 29, 352–361.

Waite, A.J., Bäumer, D., East, S., Neal, J., Morris, H.R., Ansorge, O., and Blake, D.J. (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, 1779.e5-1779.e13.

Wang, I.-F., Chang, H.-Y., Hou, S.-C., Liou, G.-G., Way, T.-D., and James Shen, C.-K. (2012). The self-interaction of native TDP-43 C terminus inhibits its degradation and contributes to early proteinopathies. *Nat. Commun.* 3, 766.

Wegorzewska, I., and Baloh, R.H. (2011). TDP-43-Based Animal Models of Neurodegeneration: New Insights into ALS Pathology and Pathophysiology. *Neurodegener. Dis.* 8, 262–274.

Wen, X., Tan, W., Westergard, T., Krishnamurthy, K., Markandaiah, S.S., Shi, Y., Lin, S., Shneider, N.A., Monaghan, J., Pandey, U.B., et al. (2014). Antisense proline-arginine RAN dipeptides linked to C9ORF72-ALS/FTD form toxic nuclear aggregates that initiate in vitro and in vivo neuronal death. *Neuron* 84, 1213–1225.

West, R.J.H., Lu, Y., Marie, B., Gao, F.-B., and Sweeney, S.T. (2015). Rab8, POSH, and TAK1 regulate synaptic growth in a Drosophila model of frontotemporal dementia. *J. Cell Biol.* 208, 931–947.

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

Williams, K.L., Topp, S., Yang, S., Smith, B., Fifita, J.A., Warraich, S.T., Zhang, K.Y., Farrawell, N., Vance, C., Hu, X., et al. (2016). C9NF mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Nat. Commun.* 7, 11253–11253.

Wils, H., Kleinberger, G., Janssens, J., Pereson, S., Joris, G., Cuijt, I., Smits, V., Ceuterick-de Groote, C., Van Broeckhoven, C., and Kumar-Singh, S. (2010). TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 3858–3863.

Wilson, C.B. (1991). The ontogeny of T lymphocyte maturation and function. *J. Pediatr.* 118, S4–S9.

Woollacott, I.O.C., and Rohrer, J.D. (2016). The clinical spectrum of sporadic and familial forms of frontotemporal dementia. *J. Neurochem.* 138, 6–31.

- Wu, L.-S., Cheng, W.-C., Hou, S.-C., Yan, Y.-T., Jiang, S.-T., and Shen, C.-K.J. (2009). TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *Genesis* n/a-n/a.
- Xi, Z., Zinman, L., Moreno, D., Schymick, J., Liang, Y., Sato, C., Zheng, Y., Ghani, M., Dib, S., Keith, J., et al. (2013). Hypermethylation of the CpG island near the G4C2 repeat in ALS with a C9orf72 expansion. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 981–989.
- Xi, Z., van Blitterswijk, M., Zhang, M., McGoldrick, P., McLean, J.R., Yunusova, Y., Knock, E., Moreno, D., Sato, C., McKeever, P.M., et al. (2015). Jump from Pre-mutation to Pathologic Expansion in C9orf72. *Am. J. Hum. Genet.* 96, 962–970.
- Xiao, S., MacNair, L., McGoldrick, P., McKeever, P.M., McLean, J.R., Zhang, M., Keith, J., Zinman, L., Rogaeva, E., and Robertson, J. (2015). Isoform-specific antibodies reveal distinct subcellular localizations of C9orf72 in amyotrophic lateral sclerosis: C9orf72 Isoforms in ALS. *Ann. Neurol.* 78, 568–583.
- Xiao, S., MacNair, L., McLean, J., McGoldrick, P., McKeever, P., Soleimani, S., Keith, J., Zinman, L., Rogaeva, E., and Robertson, J. (2016). C9orf72 isoforms in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Lobar Degeneration. *Brain Res.* 1647, 43–49.
- Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 9, 1102.
- Xu, Z., and Yang, C. (2014). TDP-43-The key to understanding amyotrophic lateral sclerosis. *Rare Dis. Austin Tex* 2, e944443–e944443.
- Xu, Y.-F., Gendron, T.F., Zhang, Y.-J., Lin, W.-L., D’Alton, S., Sheng, H., Casey, M.C., Tong, J., Knight, J., Yu, X., et al. (2010). Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 10851–10859.
- Xu, Z., Poidevin, M., Li, X., Li, Y., Shu, L., Nelson, D.L., Li, H., Hales, C.M., Gearing, M., and Wingo, T.S. (2013). Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 7778–7783.
- Yamashita, S., and Ando, Y. (2015). Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. *Transl. Neurodegener.* 4.
- Yao, M., Liu, X., Li, D., Chen, T., Cai, Z., and Cao, X. (2009). Late Endosome/Lysosome-Localized Rab7b Suppresses TLR9-Initiated Proinflammatory Cytokine and Type I IFN Production in Macrophages. *J. Immunol.* 183, 1751–1758.
- Yatim, K.M., and Lakkis, F.G. (2015). A Brief Journey through the Immune System. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1274–1281.
- Yeo, B.K., and Yu, S.-W. (2016). Valosin-containing protein (VCP): structure, functions, and implications in neurodegenerative diseases. *Anim. Cells Syst.* 20, 303–309.
- Ying, H., and Yue, B.Y.J.T. (2016). Optineurin: The autophagy connection. *Exp. Eye Res.* 144, 73–80.
- Zago, S., Poletti, B., Morelli, C., Doretto, A., and Silani, V. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia (ALS-FTD). *Arch. Ital. Biol.* 149, 39–56.

- Zhan, Y., Chow, K.V., Soo, P., Xu, Z., Brady, J.L., Lawlor, K.E., Masters, S.L., O'keeffe, M., Shortman, K., Zhang, J.-G., et al. (2016). Plasmacytoid dendritic cells are short-lived: reappraising the influence of migration, genetic factors and activation on estimation of lifespan. *Sci. Rep.* 6, 25060.
- Zhang, N., and Bevan, M.J. (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 35, 161–168.
- Zhang, D., Iyer, L.M., He, F., and Aravind, L. (2012). Discovery of Novel DENN Proteins: Implications for the Evolution of Eukaryotic Intracellular Membrane Structures and Human Disease. *Front. Genet.* 3, 283–283.
- Zhang, K.Y., Yang, S., Warraich, S.T., and Blair, I.P. (2014). Ubiquilin 2: A component of the ubiquitin–proteasome system with an emerging role in neurodegeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 50, 123–126.
- Zhang, Y., Burberry, A., Wang, J.-Y., Sandoe, J., Ghosh, S., Udeshi, N.D., Svinkina, T., Mordes, D.A., Mok, J., Charlton, M., et al. (2018). The C9orf72-interacting protein Smcr8 is a negative regulator of autoimmunity and lysosomal exocytosis. *Genes Dev.* 32, 929–943.
- Zhang, Y.-J., Gendron, T.F., Grima, J.C., Sasaguri, H., Jansen-West, K., Xu, Y.-F., Katzman, R.B., Gass, J., Murray, M.E., Shinohara, M., et al. (2016). C9ORF72 poly(GA) aggregates sequester and impair HR23 and nucleocytoplasmic transport proteins. *Nat. Neurosci.* 19, 668–677.
- Zhou, H., Huang, C., Chen, H., Wang, D., Landel, C.P., Xia, P.Y., Bowser, R., Liu, Y.-J., and Xia, X.G. (2010). Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene. *PLoS Genet.* 6, e1000887–e1000887.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2010). Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol. Rev.* 238, 247–262.
- Zhu, Y., and Chen, L. (2009). Turning the Tide of Lymphocyte Costimulation. *J. Immunol.* 182, 2557.
- Zu, T., Liu, Y., Bañez-Coronel, M., Reid, T., Pletnikova, O., Lewis, J., Miller, T.M., Harms, M.B., Falchook, A.E., Subramony, S.H., et al. (2013). RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E4968–E4977.