



**HAL**  
open science

# Développement d'outils pour la caractérisation de la TDP-43 et exploration de marqueurs indirects dans un contexte de dégénérescence lobaire frontotemporale

Jean Escal

► **To cite this version:**

Jean Escal. Développement d'outils pour la caractérisation de la TDP-43 et exploration de marqueurs indirects dans un contexte de dégénérescence lobaire frontotemporale. Neurosciences. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1235 . tel-03917524

**HAL Id: tel-03917524**

**<https://theses.hal.science/tel-03917524>**

Submitted on 2 Jan 2023

**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.



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1235

# **THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON**

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**École Doctorale N° 205**

**École Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé - EDISS**

**Spécialité de doctorat : Neurosciences**

Soutenue publiquement le 27/10/2021, par :

**Jean ESCAL**

---

## **Développement d'outils pour la caractérisation de la TDP-43 et exploration de marqueurs indirects dans un contexte de dégénérescence lobaire frontotemporale**

---

Devant le jury composé de :

Nom, prénom, grade/qualité, établissement/entreprise, Président.e (à préciser après la soutenance)

BLASCO, Helene, PU-PH, Université de Tours, Rapporteur

GABELLE, Audrey, PU-PH, Université de Montpellier, Rapporteur

FRISONI, Giovanni, PU, Université de Genève, Examineur

MEYRONET, David, PU-PH, Université de Lyon, Examineur

QUADRIO, Isabelle, PH, Hospices Civils de Lyon, Directrice de thèse

ZIMMER, Luc, PU-PH, Université de Lyon, Co-directeur de thèse

FOURIER, Anthony, MCU-PH, Université de Lyon, Invité

# Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

## COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

## COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

## Résumé

Les dégénérescences lobaires frontotemporales (DLFT) représentent la deuxième cause de troubles neurocognitifs d'origine dégénérative chez l'adulte de moins de 65 ans. Ces pathologies se caractérisent par la présence d'agrégats protéiques cérébraux composés principalement de protéine Tau ou de protéine TDP-43. Aucun biomarqueur protéique étiologique n'est aujourd'hui disponible. Malgré une littérature riche sur le potentiel intérêt de la TDP-43 dans les fluides biologiques, les résultats des études restent contrastés.

Dans ce contexte, le but de ce travail de thèse était de développer des anticorps dirigés contre la protéine TDP-43 afin de disposer d'outils plus performants pour mettre en évidence des formes de la protéine particulièrement impliquées dans la pathologie.

Dans un premier temps, de nouveaux anticorps anti-TDP-43 ont été synthétisés, dirigés contre la forme totale (TDP-43) de la protéine ou contre une de ses formes phosphorylées (p-TDP-43). Ils ont alors été caractérisés sur des échantillons cérébraux. Les profils protéiques obtenus par Western Blot étaient conformes aux résultats attendus.

Ensuite, l'évaluation des performances de ces nouveaux anticorps a été poursuivie en travaillant sur le LCS, le plasma et des lysats plaquettaires. Pour cela, une méthode de détection qualitative et semi-quantitative miniaturisée et automatisée (Simple Western) a été développée. Les profils protéiques obtenus à partir des lysats plaquettaires se sont révélés les plus informatifs car non soumis aux interférences des Ig G. Des résultats préliminaires de l'analyse du ratio p-TDP-43/TDP-43 ont mis en évidence son potentiel intérêt comme marqueur précoce des DLFT chez des sujets présymptomatiques porteurs de variants pathogènes.

Enfin, une analyse quantitative de la TDP-43 et de marqueurs non spécifiques des DLFT a été réalisée par technique SiMoA. Ce travail a été l'occasion de comparer l'utilité des neurofilaments à chaîne légère et des neurofilaments phosphorylés à chaîne lourde suivant les différents contextes cliniques rencontrés dans les DLFT. Il a aussi permis de mettre en lumière l'intérêt de l'hydrolase *Ubiquitin carboxyl-terminal 11* dans le diagnostic différentiel entre les DLFT et les maladies psychiatriques primaires.

**Mots clés :** Dégénérescences frontotemporales, TDP-43, biomarqueurs

## Abstract

Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) is the second most common cause of degenerative neurocognitive disorders in adults under the age of 65. They are characterized by cerebral protein aggregates composed mainly of Tau protein or TDP-43. No etiological protein biomarker is currently available for these diseases. Despite a rich literature on the potential interest of TDP-43 in biological fluids, the results of studies remain contrasted.

In this context, the aim of this thesis was to develop antibodies directed against the TDP-43 protein in order to have more efficient tools to highlight a specific qualitative profile of pathological forms of the protein.

First, new antibodies against TDP 43 were synthesized, directed against the total form (TDP-43) of the protein or against one of its phosphorylated forms (p-TDP-43). They were then characterized on brain samples. The protein profiles obtained by Western blot were consistent with the expected results.

Then, the evaluation of the performances of these new antibodies was continued by working on CSF, plasma and platelet lysates. For this purpose, a miniaturized and automated qualitative and semi-quantitative detection method (Simple Western) was developed. Protein profiles obtained from platelet lysates proved to be the most informative as they were not subject to interference of Ig G. Preliminary results of the analysis of the p ratio TDP 43/TDP 43 seem to be potentially interesting as an early marker of DLFT in presymptomatic subjects carrying pathogenic variants.

Finally, a quantitative analysis of TDP-43 and non-specific markers of DLFT was performed by SiMoA. This work was an opportunity to compare the usefulness of light chain neurofilaments and phosphorylated heavy chain neurofilaments according to the different clinical contexts encountered in DLFT. It also allowed to highlight the interest of the Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase L1 in the differential diagnosis between DLFT and primary psychiatric diseases.

**Keywords :** Frontotemporal lobar dementia, TDP-43, biomarkers

## Remerciements

Ce manuscrit est l'aboutissement de trois années de travail, qui furent pour moi un véritable parcours initiatique au monde truculent de la recherche. A travers ces quelques lignes, je tiens à remercier ceux qui y ont participé, de près ou de loin.

Je tiens tout d'abord à remercier les Professeures **Audrey Gabelle** et **Helene Blasco**, rapporteurs de cette thèse, pour l'intérêt que vous aurez bien voulu porter à mon travail.

Je remercie également les Professeurs **Giovanni Frisoni** et **David Meyronet** de me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Je suis également reconnaissant envers ma directrice de thèse, le Docteur **Isabelle Quadrio**, pour m'avoir proposé ce sujet audacieux et m'avoir accompagné tout au long de sa réalisation. Merci au Professeur **Luc Zimmer** d'avoir eu la gentillesse de codiriger ces travaux et de m'avoir accueilli au sein de l'équipe de recherche BIORAN. Merci enfin au Docteur **Anthony Fourier**, qui finalement était aussi un peu un directeur de thèse, pour tes idées et tes précieux conseils.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'UF de Neurochimie des HCL. Merci au Docteur **Armand Perret-Liaudet**, sans toi la collaboration avec nos partenaires de Leipzig n'aurait pas existé. **Céline, Corine, Elisabeth, Geneviève** et **Murielle**, merci pour votre implication et parfois aussi votre patience !

Mein besonderer Dank gilt auch Doktor **Ingolf Lachmann**, Doktor **Katharina Waniek** und Doktor **Max Holzer** für ihren herzlichen Empfang, ihre Verfügbarkeit und ihr Engagement für dieses Projekt. Durch die Zusammenarbeit mit Ihnen konnte ich viel lernen und einen anderen Aspekt der Forschung entdecken. Diese Erfahrung war sehr bereichernd.

Merci également à **Agathe, Amandine, Audrey, Bastien, Charles, Camille A, Camille T, Juliette, Léa, Manon, Salima, Sarah**. Vous avoir à mes côtés et partager bien plus qu'un bureau fut une source de joie au quotidien.

A ma famille, mes parents en particulier, **Philippe** et **Dominique**, qui m'ont transmis le goût de l'effort et toujours encouragé à choisir les études et la vie que je voulais mener. Merci pour votre soutien. A mes sœurs, **Laure** et **Constance**. A **Ada** bien sûr. A **Bedette** et **Jean Pierre**. A **Colette**, dont l'esprit d'indépendance est un modèle pour moi. Merci d'être là.

A mes amis : **Alban, Alberto, Barbara, Camille, Flora, Manon, Marie, Mathilde, Mélisse, Nadège, Sergio, Soizic, Sophie, Thomas, Vincent**. Nous ne nous sommes pas beaucoup vus ces derniers temps, mais j'entends rattraper ça ! Merci pour tout ce que vous m'avez apporté et tous les excellents moments passés ensemble.

## Valorisation des travaux de thèse

### Publications internationales :

**Escal J**, Fourier A, Formaglio M, Zimmer L, Bernard E, Mollion H, Bost M, Herrmann M, Ollagnon-Roman E, Quadrio I, Dorey JM. *Comparative diagnosis interest of NfL and pNfH in CSF and plasma in a context of FTD-ALS spectrum*. Journal of Neurology (2021). doi: 10.1007/s00415-021-10714-3.

Fourier A, **Escal J**, Bernard E, Lachman I, Perret-Liaudet A, Leblanc P, Quadrio I. *Development of an automated capillary nano-immunoassay - Simple Western assay - to quantify total TDP43 protein in human platelet samples*. Analytical and Bioanalytical Chemistry (2019). doi: 10.1007/s00216-018-1437-4.

### Publication nationale :

**Escal J**, Fourier A. *Les marqueurs biologiques des démences fronto-temporales*. Revue Francophone des Laboratoires (2021).

### Communication affichée internationale :

**Escal J**, Lachmann I, Waniek K, Holzer M. *CSF TDP-43/non p-TAU ratio to support the differential diagnosis of FTL D*. Poster réalisé dans le cadre du quinzième congrès de la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (AD/PD) en 2021.



# Table des matières

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>13</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>16</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>18</b>
1. SYMPTOMATOLOGIES CLINIQUES DES DLFT .....	23
1.1. <i>Variant comportemental des DLFT.....</i>	24
1.2. <i>Aphasies primaires progressives.....</i>	24
1.3. <i>Troubles moteurs coexistant avec les DLFT .....</i>	27
2. PHYSIOPATHOLOGIE DES DLFT.....	33
2.1. <i>TAR DNA-binding protein of 43 kDa.....</i>	35
2.2. <i>Autres protéines impliquées dans les DLFT.....</i>	63
3. OUTILS COMPLEMENTAIRES A LA CLINIQUE POUR LE DIAGNOSTIC DES DLFT .....	70
3.1. <i>Recherche de variants moléculaires pathogènes.....</i>	71
3.2. <i>Imagerie médicale.....</i>	76
3.3. <i>Recherche de biomarqueurs protéiques pour le diagnostic des DLFT .....</i>	85
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....</b>	<b>105</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>107</b>
<b>SYNTHESE DE NOUVEAUX ANTICORPS ANTI-TDP-43 ET CARACTERISATION SUR PRELEVEMENTS CEREBRAUX .....</b>	<b>108</b>
1. SYNTHESE DES ANTICORPS .....	109
1.1. <i>Matériels et méthodes.....</i>	110
1.2. <i>Résultats .....</i>	120
2. CARACTERISATION DES ANTICORPS SUR PRELEVEMENTS CEREBRAUX .....	124
2.1 <i>Matériels et méthodes .....</i>	124
2.2. <i>Résultats .....</i>	129
3. DISCUSSION.....	132
<b>CARACTERISATION DE LA TDP-43 DANS LES FLUIDES BIOLOGIQUES ET LES ELEMENTS FIGURES DU SANG .....</b>	<b>135</b>
1. APPROCHE QUALITATIVE.....	136
1.1 <i>Matériels et méthodes .....</i>	137
1.2. <i>Résultats .....</i>	145
1.3. <i>Discussion .....</i>	156
2. APPROCHE SEMI-QUANTITATIVE.....	159
2.1. <i>Matériels et méthodes.....</i>	159
2.2. <i>Résultats .....</i>	163

2.3. Discussion .....	170
3. APPROCHE QUANTITATIVE.....	173
3.1 Matériels et méthodes.....	173
3.2. Résultats .....	177
3.3. Discussion .....	178
<b>EXPLORATION DE MARQUEURS PROTEIQUES NON SPECIFIQUES DES DLFT.....</b>	<b>181</b>
1. MATERIELS ET METHODES : .....	183
1.1 Patients .....	183
1.2. Réalisation des mesures .....	185
1.3. Statistiques .....	188
2. RESULTATS :.....	189
2.1 Cohorte d'échantillons de LCS/plasma couplés .....	189
2.2. Cohorte enrichie en échantillons plasmatiques.....	197
3. DISCUSSION.....	200
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>207</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>211</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>213</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Les six domaines cognitifs et leurs sous-domaines selon le DSM-5.....	19
<b>Figure 2</b> : Critères de TNC légers et majeurs selon le DSM-5. ....	20
<b>Figure 3</b> : Étiologies des troubles neurocognitifs majeurs chez l'adulte de moins de 65 ans..	20
<b>Figure 4</b> : Dans les dégénérescences lobaires frontotemporales, les lobes cérébraux frontaux et/ou temporaux sont préférentiellement atteints. ....	22
<b>Figure 5</b> : Principales pathologies motrices ou cognitivo-motrices associées aux dégénérescences lobaires frontotemporales. ....	27
<b>Figure 6</b> : Atteintes possibles dans la sclérose latérale amyotrophique. ....	28
<b>Figure 7</b> : Schéma d'illustration de la théorie du « spectre du syndrome des DLFT ».....	31
<b>Figure 8</b> : Mécanismes potentiels de transmission de petits agrégats protéiques de neurone à neurone.. ....	33
<b>Figure 9</b> : Cerveau autopsié d'un patient bvFTD.....	34
<b>Figure 10</b> : Identification de la TDP-43 comme protéine impliquée dans les DLFT.....	36
<b>Figure 11</b> : TDP-43 au niveau cérébral révélée par un anticorps anti-TDP-43.....	36
<b>Figure 12</b> : Co-localisation de l'ubiquitine et de la TDP-43 au sein d'un motoneurone d'un patient atteint de SLA.....	37
<b>Figure 13</b> : Structure de la protéine TDP-43.....	42
<b>Figure 14</b> : Prévion de la désorganisation de la structure tertiaire de la TDP-43, suivant sa composition en acides aminés.. ....	43
<b>Figure 15</b> : Physiologie de la TDP-43.....	47
<b>Figure 16</b> : Implication de la TDP-43 dans la physiopathologie des DLFT. ....	48
<b>Figure 17</b> : Profils caractéristiques des fragments carboxy-terminaux de la TDP-43. ....	54
<b>Figure 18</b> : Exemple de trois segments de la région carboxy-terminale de la <i>TAR DNA-binding protein of 43 kDa</i> , qui peuvent s'arranger en « fermeture éclair ». ....	56
<b>Figure 19</b> : Exemple d'interactions entre les cœurs amyloïdes de deux <i>TAR DNA-binding protein of 43 kDa</i> adjacentes. ....	57
<b>Figure 20</b> : Séparation en phase liquide/liquide de la TDP-43 et de son milieu.....	58
<b>Figure 21</b> : Transmission des agrégats de TDP-43 par des nanotubes dans un modèle cellulaire, révélée en microscopie à fluorescence.. ....	61
<b>Figure 22</b> : Représentation de la transcription, de l'épissage alternatif puis de la traduction des six isoformes cérébrales de la protéine Tau humaine.....	66

<b>Figure 23 :</b> Bandes obtenues par Western Blot à partir d'homogénats de cerveau humain d'un sujet contrôle âgé et de patients atteints de maladie d'Alzheimer, de dégénérescence corticobasale, de paralysie supranucléaire progressive et de maladie de Pick.....	67
<b>Figure 24 :</b> Comparaison de la structure des protéines TDP-43 et FUS..	69
<b>Figure 25 :</b> Principales associations clinico-pathologiques et génétiques dans les DLFT et leur troubles moteurs associés..	75
<b>Figure 26 :</b> Atrophies corticales caractéristiques des symptômes cliniques rencontrés dans les DLFT ..	77
<b>Figure 27 :</b> Atrophies corticales caractéristiques des mutations principales mises en évidence chez les patients atteints de DLFT. ....	78
<b>Figure 28 :</b> Mise en évidence des fibres composant le corps calleux par imagerie en tenseur de diffusion..	79
<b>Figure 29 :</b> Images cérébrales de patients atteints d'APP, obtenues en IRM classique et par TEP-FDG. ....	81
<b>Figure 30 :</b> Comparaison des images cérébrales d'un sujet contrôle et de patients atteints de MA et de bvFTD. ....	83
<b>Figure 31 :</b> Principales protéines étudiées pour le développement de biomarqueurs dans un contexte de DLFT. ....	85
<b>Figure 32 :</b> Principales étapes réalisées pour le développement de nouveaux anticorps anti-TDP-43 totale et phosphorylée. ....	109
<b>Figure 33 :</b> Chronologie de l'immunisation des souris..	112
<b>Figure 34 :</b> Réalisation du test de réactivité des sérums après la quatrième injection..	112
<b>Figure 35 :</b> Les deux voies de synthèse possible pour l'ADN dans les cellules, et action du milieu HAT..	114
<b>Figure 36 :</b> Méthode des dilutions limites pour obtenir des anticorps monoclonaux. ....	118
<b>Figure 37 :</b> Analyse de la séquence de la TDP-43 par le logiciel Bepipred 2.0.....	120
<b>Figure 38 :</b> Analyse de la séquence de la TDP-43 par le logiciel Bepipred 1.0.....	121
<b>Figure 39 :</b> Epitopes théoriques de la TDP-43 choisis pour être la cible des anticorps.....	122
<b>Figure 40 :</b> Réalisation d'un Western Blot avec révélation sur film photographique.....	125
<b>Figure 41 :</b> Interactions théoriques des anticorps avec la TDP-43.....	127
<b>Figure 42 :</b> Principe de la chimiluminescence émise avec le luminol. ....	128
<b>Figure 43 :</b> Résultats des WB réalisés à partir de fractions cérébrales frontales de patients atteints de DLFT-TDP ou de DLFT-tau.....	129

<b>Figure 44</b> : Interactions théoriques des anticorps avec la TDP-43. La police violette correspond aux anticorps anti-p-TDP-43.....	141
<b>Figure 45</b> : La « ladder » était composée de protéines de poids moléculaire égal à 12, 40, 66, 118, 180 et 230 kDa. ....	142
<b>Figure 46</b> : Exemple type d'un plan de plaque pour une analyse par Simple western.....	143
<b>Figure 47</b> : Principe de fonctionnement de l'automate Peggy Sue. ....	144
<b>Figure 48</b> : Deux visualisations des résultats sont fournies par le logiciel « Compass for simple Western ».....	144
<b>Figure 49</b> : Comparaison des profils de la TDP-43 des cellules SH SY5Y et HEK193T ....	146
<b>Figure 50</b> : Profils en WB de la TDP-43 des cellules SH SY5Y et HEK193T.....	147
<b>Figure 51</b> : Profils obtenus en WB pour la TDP-43 issue du LCS en utilisant l'anticorps 10782-2-AP comparé à une culture cellulaire et comparé entre des patients atteints de DLFT-TDP et de DLFT-Tau ou de MA. ....	148
<b>Figure 52</b> : Profils obtenus par Simple Western pour la TDP-43 en travaillant à partir du LCS d'un patient atteints de DLFT-TDP natif, concentré, ou déplété en albumine et en Ig G.....	149
<b>Figure 53</b> : Détection de la TDP-43 dans le LCS de patients atteints de DLFT-TDP ou de DLFT-Tau .....	150
<b>Figure 54</b> : Profils de la TDP-43 plasmatique révélés par l'anticorps 10782-2-AP chez des patients atteints de DLFT-TDP, de DLFT-Tau ou de MA.....	151
<b>Figure 55</b> : Profils de la TDP-43 plasmatique révélés par l'anticorps 2G10 chez des patients atteints de DLFT-TDP, de DLFT-Tau ou de MA. ....	152
<b>Figure 56</b> : Profils de la TDP-43 plasmatique révélés par l'anticorps 19C9 chez des patients atteints de DLFT-TDP ou de DLFT-Tau et révélés par l'anticorps 21B2. ....	153
<b>Figure 57</b> : Profils de la p-TDP-43 409/410 dans des plasmas dilués de patients atteints de DLFT-TDP, de DLFT-Tau ou de MA révélés par WB avec l'anticorps 11C10 et obtenus par l'automate Peggy Sue avec l'anticorps 2F11. ....	153
<b>Figure 58</b> : Profils de la p-TDP-43 409/410 dans des plasmas précipités de patients atteints de DLFT-TDP révélés par technique WB en utilisant l'anticorps 1E6, 11C10 ou 2F11. ....	154
<b>Figure 59</b> : Profils de la TDP-43 plaquettaire révélés par l'anticorps 10782-2-AP chez des patients atteints de DLFT-TDP ou de DLFT-Tau en WB et par simple Western.....	155
<b>Figure 60</b> : Profils de la TDP-43 plaquettaire révélés par l'anticorps 21B2 chez des patients atteints de DLFT-TDP ou de DLFT-Tau et avec l'automate Peggy Sue par l'anticorps 19C9 et par les anticorps anti-TDP-43 phosphorylée 1E6, 11C10 et 2F11.....	155
<b>Figure 61</b> : Données semi-quantitatives fournies par l'automate Peggy Sue. ....	161

<b>Figure 62</b> : Pour chaque pic, l'automate fournit un indicateur de l'intensité du signal par rapport au bruit de fond..	162
<b>Figure 63</b> : Electrophorégramme et représentation en bande d'une dilution en cascade d'une solution de TDP-43 recombinante.....	164
<b>Figure 64</b> : Courbes de calibration obtenues pour les hauteurs et pour les aires du pic à 57 kDa caractéristique de la TDP-43 recombinante avec l'anticorps 10782-2-AP. ....	165
<b>Figure 65</b> : Etude des performances analytiques de la détection semi-quantitative de la TDP-43 plaquettaire par Simple Western .....	165
<b>Figure 66</b> : Exemple de profils de migration protéique de la TDP-43 plaquettaire totale et (B) de la p-TDP-43 plaquettaire obtenus par Simple Western avec des anticorps commercialisés par Proteintech.....	167
<b>Figure 67</b> : Comparaison chez les sujets atteints de SLA, de DLFT-TDP et chez les sujets pré-S ou CTS du ratio p-TDP-43/TDP-43 dans des échantillons plaquettaires et des valeurs des NfL plasmatiques.....	169
<b>Figure 68</b> : Principe de fonctionnement de l'analyseur SiMoA HD-1.....	176
<b>Figure 69</b> : Corrélation de rang des concentrations mesurées dans le LCS et le plasma pour la TDP-43.....	177
<b>Figure 70</b> : Fonctionnement du multiplexage dans l'analyseur SiMoA HD-1..	188
<b>Figure 71</b> : Corrélation de rang des concentrations mesurées dans le LCS et le plasma pour les NfL et les pNfH.....	189
<b>Figure 72</b> : Concentrations de la t-Tau dans le LCS et le plasma des patients. ....	190
<b>Figure 73</b> : Concentrations des NfL dans le LCS et le plasma des patients.....	191
<b>Figure 74</b> : Concentrations des pNfH dans le LCS de tous les patients et au sein du spectre DLFT-SLA. ....	192
<b>Figure 75</b> : Concentrations d'UCH L1 dans le LCS et le plasma des patients..	193
<b>Figure 76</b> : Concentrations de la GFAP dans le LCS et le plasma des patients.....	194
<b>Figure 77</b> : Corrélation de rang entre les NfL et les pNfH dans le LCS et dans le plasma...	195
<b>Figure 78</b> : Courbes ROC pour les concentrations des NfL, d'UCH L1, de la t-Tau .....	196
<b>Figure 79</b> : Concentrations des NfL dans le plasma des patients atteints de SLA, de DLFT+SLA, de DLFT ou de MPP et des sujets pré-S ou CTS. ....	198
<b>Figure 80</b> : Concentrations des NfL dans le plasma des patients atteints de SLA, de DLFT+SLA, de DLFT pure ou de MPP et des sujets pré-S ou CTS..	199

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Classification actuelle des DLFT-TDP, suivant les caractéristiques des inclusions de TDP-43 néocorticales et phénotypes cliniques associés.....	40
<b>Tableau II</b> : Motifs sous-corticaux aidant au diagnostic des DLFT-TDP. ....	41
<b>Tableau III</b> : Principaux anticorps pour l'étude de la TDP-43 phosphorylée publiés dans la littérature. ....	52
<b>Tableau IV</b> : Comparaison des anomalies de la protéine tau entre les principales tauopathies primaires par analyse immunohistochimique du tissu cérébral. ....	67
<b>Tableau V</b> : Les trois principales mutations mises en évidence dans les DLFT.....	72
<b>Tableau VI</b> : Exemples de mutations peu fréquentes identifiées dans les DLFT-TDP. ....	73
<b>Tableau VII</b> : Exemples de mutations peu fréquentes identifiées dans des DLFT ne présentant pas d'inclusions de TDP-43, ou des inclusions à la composition hétérogène.....	74
<b>Tableau VIII</b> : Comparaison des profils de TDP-43 retrouvés en Western Blot au niveau cérébral et dans le LCS.....	87
<b>Tableau IX</b> : Comparaison des concentrations de TDP-43 mesurée dans le LCS obtenu par ponction lombaire.....	88
<b>Tableau X</b> : Comparaison des concentrations de TDP-43 mesurée dans le plasma de patients DLFT, MA et de cohortes de contrôles.....	92
<b>Tableau XI</b> : Exemples des valeurs de t-Tau dans le LCS retrouvées dans la littérature.. ...	101
<b>Tableau XII</b> : Peptides immunogènes prédits par le logiciel Bepipred 2.0. ....	120
<b>Tableau XIII</b> : Peptides immunogènes prédits par le logiciel Bepipred 1.0. ....	121
<b>Tableau XIV</b> : Densités optiques des sérums des souris, obtenues par des tests ELISA réalisés 60 jours après le début de l'immunisation.. ....	122
<b>Tableau XV</b> : Concentrations cellulaires et volumes prélevés pour la fusion des cellules myélomateuses avec les lymphocytes issus de la rate des souris.....	123
<b>Tableau XVI</b> : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés dans cette étude.....	127
<b>Tableau XVII</b> : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés dans cette étude.. ....	141
<b>Tableau XVIII</b> : Profils protéiques de la TDP-43 et de la p-TDP-43. R : non réalisé. ....	145
<b>Tableau XIX</b> : Données épidémiologiques des patients constituant la cohorte pour l'étude de l'intérêt de la mesure semi-quantitative de la TDP-43 par technique Simple Western.. ....	160
<b>Tableau XX</b> : Hauteurs du pic à 57 kDa et valeurs d'aire de solutions de TDP-43 recombinante après 4 secondes d'exposition. ....	163

<b>Tableau XXI</b> : Résultats du dosage semi-quantitatif de la TDP-43 plaquettaire en duplicat chez neuf patients. ....	166
<b>Tableau XXII</b> : Somme des aires des pics de la TDP-43 et de la p-TDP-43 plaquettaires chez des patients atteints de SLA, de DLFT-TDP et chez des sujets pré-S ou CTS.....	167
<b>Tableau XXIII</b> : Ratio entre la somme de l'aire des pics de la p-TDP-43 et celle de la TDP-43, et valeurs des NfL plasmatiques chez les patients atteints de SLA, de DLFT-TDP et chez les sujets pré-S ou CTS mesurées par MSD.. ....	168
<b>Tableau XXIV</b> : Données épidémiologiques des patients inclus dans la cohorte des échantillons couplés plasma/LCS pour le dosage de la TDP-43. ....	173
<b>Tableau XXV</b> : Dilutions réalisées pour la mesure par le SiMoA HD-1 des protéines t-Tau, NfL, pNfH, UCHL1 et GFAP.....	174
<b>Tableau XXVI</b> : Concentrations des pNfH dans le LCS et le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP.....	177
<b>Tableau XXVII</b> : Données épidémiologiques des patients inclus dans la cohorte des échantillons de LCS/plasma couplés pour la mesure de la t-Tau, des NfL, des pNfH, d'UCH L1 et de la GFAP.....	184
<b>Tableau XXVIII</b> : Données épidémiologiques des patients inclus dans la cohorte enrichies en échantillons plasmatiques.....	185
<b>Tableau XXIX</b> : Dilutions réalisées pour la mesure par le SiMoA HD-1 des protéines t-Tau, NfL, pNfH, UCHL1 et GFAP.....	186
<b>Tableau XXX</b> : Résultats du test de corrélation de rang de Spearman appliqué aux concentrations des cinq protéines d'intérêt mesurées dans le LCS et le plasma.....	189
<b>Tableau XXXI</b> : Concentrations de la t-Tau dans le LCS et le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP.....	190
<b>Tableau XXXII</b> : Concentrations des NfL dans le LCS et le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP.....	191
<b>Tableau XXXIII</b> : Concentrations des pNfH dans le LCS et le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP.....	192
<b>Tableau XXXIV</b> : Concentrations d'UCH L1 dans le LCS et le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP.....	193
<b>Tableau XXXV</b> : Concentrations de la GFAP dans le LCS et le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP.....	194



<b>Tableau XXXVI :</b> Valeurs de concentration de chaque analyte offrant le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité pour la différenciation des maladies du spectre DLFT-SLA et des maladies psychiatriques primaires. ....	195
<b>Tableau XXXVII :</b> Concentrations des NfL et des pNfH dans le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP et des sujets Pré-S et CTS.. ....	197

# Abréviations

## A

**Ab-42** : peptide beta-amyloïde de 42 acides aminés  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**APP** : Aphasie primaire progressive  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ARNm** : Acide ribonucléique messenger  
**AUC** : Aire sous la courbe

## B

**BDNF** : *Brain-Derived Neurotrophic Factor*  
**BHE** : Barrière hémato-encéphalique  
**BHM** : Barrière hémato-méningée  
**PiB** : *Pittsburgh compound B*  
**bvFTD** : *behavioral variant frontotemporal dementia*

## C

**C9ORF72** : Gène *Chromosome 9 open reading frame 72*  
**CA** : Cœur amyloïde  
**CFTR** : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*  
**CMRR** : Centre mémoire ressource recherche  
**CTS** : Contrôles sains

## D

**DLFT** : Dégénérescence lobaire frontotemporale  
**DLFT-Tau** : DLFT associée à des inclusions de protéine *tubule associated unit*  
**DLFT-TDP** : DLFT associée à des inclusions de *TAR DNA-binding protein of 43 kDa*  
**DLFT-UPS** : DLFT associée à des inclusions d'*ubiquitin-proteasome system markers*  
**DO** : densité optique  
**DSM-5** : *Fifth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

## E

**ELISA** : *Enzyme-linked immunosorbent assay*  
**EWS** : Protéine *Ewing Sarcoma*

## F

**FDG** : <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose  
**FUS** ou **FUS/TL** : Protéine et gène *fused in sarcoma/translocated in liposarcoma*

## G

**GABA** : *Gamma-aminobutyric acid*  
**GDS** : Granules de stress  
**GFAP** : *Glial Fibrillary Acidic Protein*  
**GRN** : Gène *Progranulin*

## H

**HAT** : Milieu enrichi en hypoxanthine, aminoptérine et thymidine  
**HCL** : Hospices civils de Lyon  
**HEK 293 T** : *Cellules Human embryonic kidney*  
**HFCS** : Milieu de culture « hybridoma fusion and cloning supplement »  
**HGPRT** : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase  
**HRP** : Peroxydase de Raifort

## I

**Ig G** : immunoglobulines de type G  
**IL-6** : Interleukine 6  
**IRM** : Imagerie par résonance magnétique  
**IRM-fer** : Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle à l'état de repos  
**ITD** : Imagerie en « tenseur de diffusion »

## K

**KPNA** : Karyophérine-alpha  
**KPNB** : Karyophérine-beta 1

## L

**LC-MS/MS** : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse  
**LCS** : Liquide cérébrospinal

## M

**MA** : Maladie d'Alzheimer  
**MAPT** : Gène *Microtubule associated protein Tau*  
**MPi** : Maladie de Pick  
**MPP** : Maladie psychiatrique primaire  
**MPT** : Modifications post-traductionnelles  
**MRA** : Motif de reconnaissance des acides nucléiques  
**MSA** : Marquage de spins artériels  
**MTU** : Microtubules

## N

**NfL** : *Neurofilament light chain*

## O

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

## P

**p-Tau** : Forme phosphorylée en position 181 de la protéine Tau  
**p-TDP-43** : Forme phosphorylée de la TDP-43  
**p62** : Protéine sequestosome 1  
**PBS** : Tampon *Phosphate Buffer Saline*  
**PEG** : Polyéthylène glycol  
**pNfH** : *phosphorylated neurofilament heavy chain*  
**poly-GP** : Protéine formée de motifs glycine-proline  
**pré-S** : Sujets présymptomatiques  
**PSP** : Paralyse supranucléaire progressive

## R

**R** : Domaine d'attachement de la protéine Tau aux microtubules composés des motifs répétés  
**RI** : Régions intrinsèquement désordonnées  
**RMPD** : Réseau du « mode par défaut »  
**ROC curve** : Courbe *Receiver Operating Characteristics*  
**RR-G** : Région riche en glycine

## S

**SCB** : Syndrome corticobasal  
**SDS** : Sodium dodécyl sulfate  
**SEN** : Signal d'exportation nucléaire  
**SiMoA** : *Single molecule array*  
**SLA** : Sclérose latérale amyotrophique  
**SLN** : Signal de localisation nucléaire  
**SNC** : Système nerveux central  
**SUP** : Système ubiquitine-protéasome  
**SFV** : sérum fœtal de veau

## T

**t-Tau** : Tau totale  
**TAF 15** : *TATA-binding protein-associated factor 15*  
**TAR** : *TransActivation Response element*  
**TARDBP** : Gène *TAR DNA-binding protein 43*  
**Tau** : *Tubule associated unit*  
**TDP-43** : *TransActivation Response DNA-binding Protein of 43 kDa*  
**TEP** : Tomographie par émission de positons

## T

**TG** : Motifs « thymine-guanine » répétés des ADN  
**TNC** : Troubles neurocognitifs  
**TREX** : Complexe *TRanscription EXport*

## U

**UCH L1** : Hydrolase *Ubiquitin carboxyl-terminal L1*  
**UG** : Motifs « uracile-guanine » répétés des ARN

## W

**WB** : Western Blot

## X

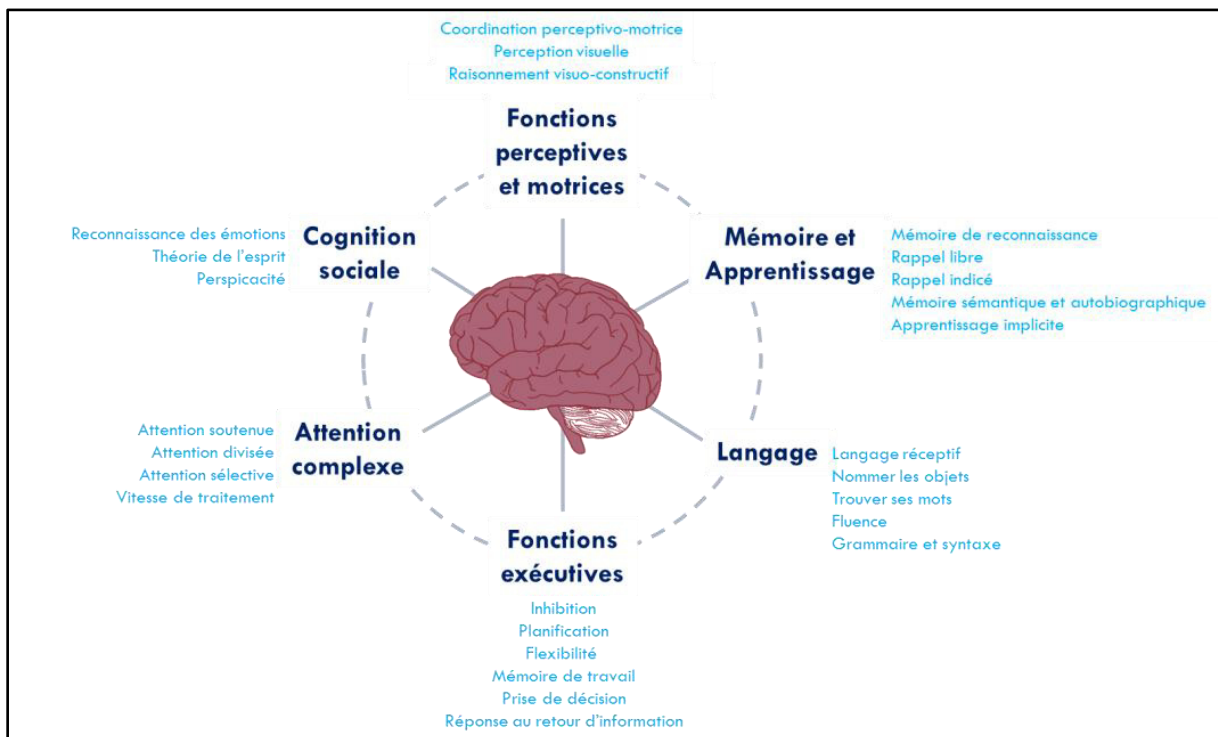
**XPO1** : Exportine 1

# **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

## A. TROUBLES NEUROCOGNITIFS

La cognition, du latin *cognoscere* signifiant « connaître », peut être décrite comme l'ensemble des processus mentaux permettant l'assimilation d'informations arrivant via différentes voies, leur conversion en connaissances, puis leur utilisation pour assurer la survie des êtres vivants (1).

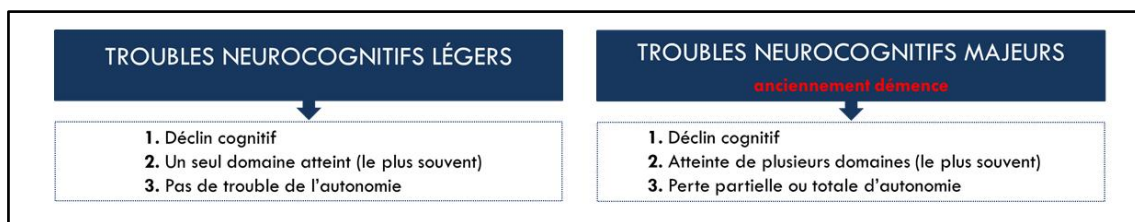
Dans la cinquième édition du Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux (DSM-5 pour *fifth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), publiée en 2013 par l'Association Américaine de Psychiatrie, six domaines cognitifs ont été décrits: les fonctions perceptives et motrices, la mémoire et l'apprentissage, le langage, les fonctions exécutives, l'attention complexe et la cognition sociale (figure 1) (2).



**Figure 1 :** Les six domaines cognitifs et leurs sous-domaines selon le DSM-5.

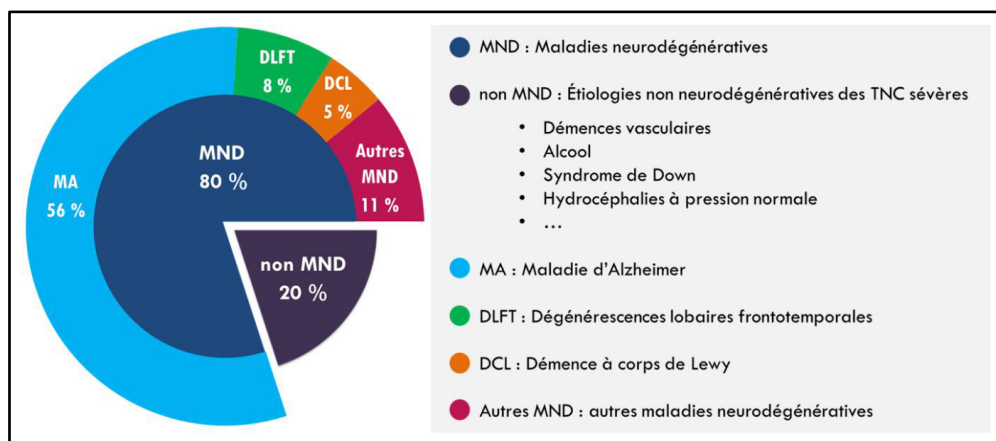
Les troubles cognitifs se définissent alors comme l'altération d'un ou plusieurs domaines cognitifs, sans distinction de cause (neurodégénérative, psychiatrique, toxique, infectieuse, médicamenteuse, traumatique...) ni de réversibilité. Pour parler spécifiquement de troubles neurocognitifs (TNC), il faut que ces troubles soient acquis, évolutifs et non expliqués par une atteinte psychiatrique chronique.

Les TNC sont dits mineurs, ou légers, lorsque les patients conservent une certaine capacité à gérer leur vie quotidienne. Cependant, étant par définition évolutifs, les TNC vont engendrer des difficultés croissantes à réaliser des activités courantes et pourront progressivement aboutir à une perte d'autonomie des patients. À ce stade, ces troubles sont alors qualifiés de majeurs et correspondent au terme désuet de démence (figure 2). Ce mot est en effet de moins en moins utilisé, en raison de son caractère jugé péjoratif, et car il est historiquement plutôt associé à la description de la forme classique de la maladie d'Alzheimer (MA), dans laquelle l'atteinte mnésique prédomine (3).



**Figure 2 :** Critères de TNC légers et majeurs selon le DSM-5.

La confusion entre TNC majeurs et atteinte mnésique peut s'expliquer par le fait que la MA soit l'étiologie principale de ces troubles. Cependant, d'autres maladies neurodégénératives en sont également fréquemment responsables. Dans la population générale, les dégénérescences lobaires frontotemporales (DLFT) en seraient ainsi la troisième cause, juste après les démences à corps de Lewy et la MA (4). Dans une étude récente, n'incluant que des adultes « jeunes », c'est-à-dire de moins de 65 ans, il a été rapporté que 8 % des TNC sévères seraient imputables aux DLFT, représentant alors la deuxième étiologie la plus courante dans cette classe d'âge (figure 3) (5).



**Figure 3 :** Étiologies des troubles neurocognitifs majeurs chez l'adulte de moins de 65 ans. D'après les données de Kvello et al (5).

Quelle que soit leur origine, les TNC majeurs ont de lourdes conséquences psychologiques et sociales pour les malades, leurs familles et le personnel soignant (6). Ils ont également un impact économique très important pour la société, celui-ci ayant été estimé à plus de 800 milliards de dollars à l'échelle mondiale en 2015 (7). Ce montant s'explique, entre autres, par le fait que 47 millions de personnes souffraient de TNC majeurs dans le monde en 2017 selon l'organisation mondiale de la santé (OMS). Parmi les malades, 60 % vivaient dans des pays à revenu faible ou intermédiaire, dans lesquels la population subit une influence plus forte des facteurs de risque de TNC (8). En effet, une corrélation a été établie entre le développement de ces troubles et l'inactivité physique, l'hypertension artérielle, l'obésité, le diabète, le tabac ou encore l'abus d'alcool (9–12). Toujours selon l'OMS, avec le vieillissement de la population, et puisque les TNC touchent essentiellement les sujets âgés, le nombre de malades pourrait être de plus de 130 millions en 2050 (7). Certains observateurs tempèrent néanmoins cette prévision, car des études épidémiologiques récentes font état d'une diminution de leur incidence, essentiellement dans les pays à fort revenu, grâce à l'augmentation du niveau d'éducation de la population et une meilleure prise en charge, notamment médicamenteuse, des facteurs de risque cérébrovasculaires (12–15). Des chercheurs ont néanmoins conclu par un modèle mathématique qu'aux États-Unis, une baisse de l'incidence du diabète et de l'hypertension artérielle pourrait conduire à terme à une augmentation de l'incidence des TNC, par simple augmentation de l'espérance de vie (16). Au-delà de ces contradictions, tous les experts s'accordent à dire que dans les conditions actuelles, un grand nombre d'individus présenteront des TNC dans un futur proche, rendant impératif l'amélioration de leur prise en charge globale, du diagnostic jusqu'au traitement.

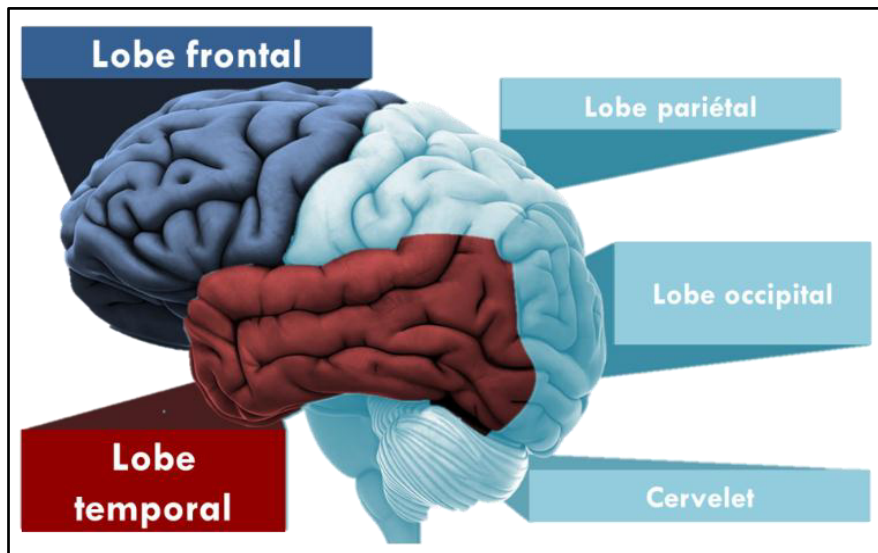
Fait encourageant, après plusieurs décennies d'étude de la MA, certaines avancées ont permis l'émergence puis la validation de marqueurs protéiques mesurés dans le liquide cébrospinal (LCS) des patients (17). Le dosage de ces biomarqueurs a alors été proposé comme critère dans les recommandations pour le diagnostic de cette maladie en 2007, puis officialisé en 2011 (18,19). La mesure de ces protéines est particulièrement utile pour améliorer le degré de probabilité du diagnostic de présomption ante-mortem chez les patients jeunes, en cas de présentation clinique atypique ou de troubles débutants (20,21). Devant ce succès, l'objectif est maintenant de progresser dans la compréhension de la physiopathologie des DLFT pour espérer, entre autres, l'identification de marqueurs protéiques renforçant le diagnostic de ces pathologies et l'émergence de thérapies ciblées efficaces.

## B. DEGENERESCENCES LOBAIRES FRONTOTEMPORALES

Les DLFT constituent un groupe de maladies neurodégénératives cliniquement, génétiquement et pathologiquement hétérogènes. Cependant, elles se caractérisent toutes par une atrophie cérébrale, progressive mais néanmoins relativement circonscrite aux lobes frontaux et/ou temporaux antérieurs (figure 4) (22).

Au niveau mondial, leur prévalence s'établit entre 2 et 31/100 000 chez les 45-64 ans (23). L'incidence, quant à elle, est comprise entre 3 et 4/100 000 par an chez les moins de 70 ans. La durée de survie des patients atteints de DLFT se situe entre 3 et 14 ans une fois le diagnostic établi, et ne semble être associée ni à l'âge au moment du diagnostic, ni au sexe, ni au niveau socio-culturel des malades (24).

Les écarts importants observés pour les marqueurs épidémiologiques des DLFT sont en partie dus au fait que les données concernant ces maladies sont relativement difficiles à recueillir, s'agissant de maladies rares, dont le diagnostic repose sur des cliniciens experts, et dont la terminologie a beaucoup évolué au cours du temps. Pour éviter toute confusion, la nomenclature utilisée dans ce travail correspond à celle des derniers critères diagnostiques de consensus publiés (25,26).



**Figure 4** : Dans les dégénérescences lobaires frontotemporales, les lobes cérébraux frontaux et/ou temporaux sont préférentiellement atteints.



## 1. Symptomatologies cliniques des DLFT

Chez l'être humain, les lobes cérébraux frontaux sont le siège de la conscience de soi, de la régulation du comportement social, du raisonnement, de la planification et de l'analyse des émotions.

Les lobes cérébraux temporaux sont quant à eux très impliqués dans le langage, par le traitement des informations auditives permettant la reconnaissance du sens des mots via l'aire de Wernicke, et la possibilité de dénomination via l'aire de Broca. Ils interviennent également dans la reconnaissance complexe des objets et des personnes, par le traitement d'informations visuelles via le cortex inférieur.

Cette répartition topographique des fonctions cognitives et les larges régions touchées dans les DLFT expliquent que les patients puissent présenter deux phénotypes cliniques principaux très différents. En effet, dans 60 % des cas, la dégénérescence neuronale est majoritairement localisée au niveau des lobes cérébraux frontaux. Elle se traduit alors par des troubles progressifs du comportement et de la personnalité au premier plan. La prévalence du variant comportemental des DLFT a été estimée à 15/100 000, représentant environ 5 000 patients en France (27,28). Dans 40 % des cas, on observe plutôt un déclin progressif du langage, consécutif à une atteinte cérébrale prédominante au niveau des lobes cérébraux temporaux. La prévalence de cette forme clinique de DLFT a été établie à 7/100 000, représentant entre 3 000 et 4 000 patients en France (29).

Devant ce large spectre de symptômes, des critères cliniques les plus spécifiques possible ont été définis au cours des vingt dernières années pour harmoniser le diagnostic des DLFT. Ce travail s'est effectué grâce aux observations des cliniciens, comparées rétrospectivement aux études histopathologiques des cerveaux de patients décédés.

## **1.1. Variant comportemental des DLFT**

Dans cette forme clinique de DLFT, abrégée en bvFTD dans la littérature (pour *behavioral variant frontotemporal dementia*), les patients pourront présenter un mélange de six types d'atteinte du comportement : une désinhibition, de l'apathie ou de l'inertie, une perte d'empathie ou de sympathie, une baisse du contrôle émotionnel, des comportements compulsifs ou rituels, une hyperoralité et un syndrome dysexécutif. Ce dernier trouble correspond à une impossibilité de s'adapter aux situations nouvelles et/ou complexes (25).

Ainsi, les patients pourront montrer une baisse d'intérêt pour les activités de la vie quotidienne ou leur hygiène, un retrait social et une attitude froide y compris vis-à-vis de leurs proches, ou à l'inverse une grande familiarité et la formulation de remarques déplacées. Certains patients souffriront d'un défaut de jugement pouvant conduire à des conduites dangereuses et/ou illégales (gloutonnerie immodérée, vol, infractions au code de la route...). Les malades pourront également développer des croyances extrêmes concernant la religion ou la politique. Enfin, ils présenteront souvent une anosognosie, et se montreront incapables de se concentrer, de s'organiser et de prendre des décisions.

La réalisation d'un bilan neuropsychologique mettra généralement en évidence un déficit dans les tâches nécessitant une mobilisation du lobe frontal, comme le raisonnement abstrait. En revanche, la mémoire épisodique et les fonctions visuo-spatiales seront souvent préservées, au moins au début de la maladie (22).

Des troubles moteurs sont associés aux troubles du comportement chez près d'un sujet sur deux (30). Il se peut également que des manifestations cliniques de type psychiatrique s'associent aux manifestations des bvFTD, voire se manifestent au premier plan (31,32).

## **1.2. Aphasies primaires progressives**

Les atteintes du langage rencontrées dans les DLFT sont regroupées sous le terme d'aphasies primaires progressives (APP). Si ces troubles sont souvent la conséquence d'une DLFT, les autopsies cérébrales des patients réalisées en post-mortem ont néanmoins montré que d'autres maladies neurodégénératives peuvent également en être à l'origine (33).

Le terme d'aphasie a été décrit en 1864, par le clinicien Armand Trousseau, comme un trouble acquis de la production et/ou de la compréhension du langage oral et/ou écrit.

En 1982, Mesulam définit l'APP comme une détérioration progressive du langage sans autres troubles cognitifs majeurs (34).

En 2001, il en précisera les critères diagnostiques. Le langage pré-morbide doit ainsi être normal et le début des troubles insidieux. L'atteinte du langage est isolée au moins durant les deux premières années de la maladie, et reste plus tard le trouble cognitif prédominant. Il peut y avoir un retentissement progressif sur les activités instrumentales de la vie quotidienne, mais essentiellement sur celles qui sont liées au langage.

Ainsi, la présence d'épisodes de perte de mémoire ou de troubles des fonctions visuo-perceptives comme manifestations inaugurales écartent d'emblée le diagnostic d'APP. Ces fonctions cognitives peuvent néanmoins être touchées après quelques années d'évolution, en restant au second plan. Une atteinte majeure du comportement est également un critère d'exclusion, mais des atteintes modérées sont possibles pourvu qu'elles ne soient pas le motif de plainte principal. Au-delà des troubles cognitifs, le patient ne doit pas présenter de signes évoquant une maladie psychiatrique (35).

La dernière révision des critères diagnostique des APP date de 2011. Ceux-ci définissent trois sous-types d'APP principaux, se différenciant notamment par la fluence des patients, c'est-à-dire de la fluidité de leur débit de parole (26).

### **1.2.1 Premier sous-type d'APP : Aphasie non fluente**

Le premier sous-type d'APP, appelé APP non fluente, ou parfois APP agrammatique, se caractérise par une vitesse de conversation progressivement ralentie et une perte de la capacité à communiquer avec aisance, aboutissant à un mutisme aux stades avancés de la maladie.

Le diagnostic de l'APP non fluente nécessite la présence de signes d'agrammatisme (production de phrases courtes, avec des omissions de morphèmes grammaticaux) et/ou un discours lent, hésitant, demandant un effort important et contenant des erreurs phonémiques. Les patients doivent également présenter au moins deux des trois caractéristiques suivantes : un trouble de la compréhension des phrases de complexité syntaxique élevée, ou la préservation de la compréhension des mots uniques, ou la reconnaissance des objets conservée.

### **1.2.2 Deuxième sous-type d'APP : Aphasie fluente**

Dans le deuxième sous-type d'APP, dénommé APP fluente, ou encore démence sémantique, le discours est fluide et le débit de parole est normal, permettant généralement une appétence au langage conservée.

En revanche, il est mis en évidence une aphasie nominale au premier plan lors du bilan neuropsychologique. Les patients sont par exemple dans l'incapacité de nommer des objets en confrontation visuelle, ou de relier un mot à une image. Cette aphasie nominale est systématiquement associée à des difficultés de compréhension des mots isolés, et s'aggrave irrémédiablement avec la progression de la maladie. Ainsi, un patient peut dans un premier temps ne plus être capable de discriminer les différentes races de chien, puis ne plus faire de différence entre les chiens et les autres animaux, qui seront alors tous nommés « choses » (36). En plus d'un discours pauvre en vocabulaire, les sujets doivent présenter trois signes parmi les suivants : des troubles dans la connaissance des objets (incapacité à les reconnaître), ou des signes de dyslexie (troubles de lecture) et de dysgraphie (trouble de l'écriture), mais une préservation de la production du discours, notamment d'un point de vue de la grammaire.

### **1.2.3 Troisième sous-type d'APP : Aphasie logopénique**

Jusqu'au milieu des années 2000, les APP étaient divisées en APP fluentes et non fluentes. Comme un tiers des patients étaient exclus de cette classification binaire, un troisième sous-type a été décrit en 2004, et nommé empiriquement APP logopénique (37). Il a ensuite été intégré à la classification officielle des APP en 2011.

Au niveau clinique, les APP logopéniques se caractérisent par un manque du mot dans le discours spontané (qui sera alors ralenti par des pauses durant la recherche de mots) et en dénomination, associé à un trouble de la répétition des phrases.

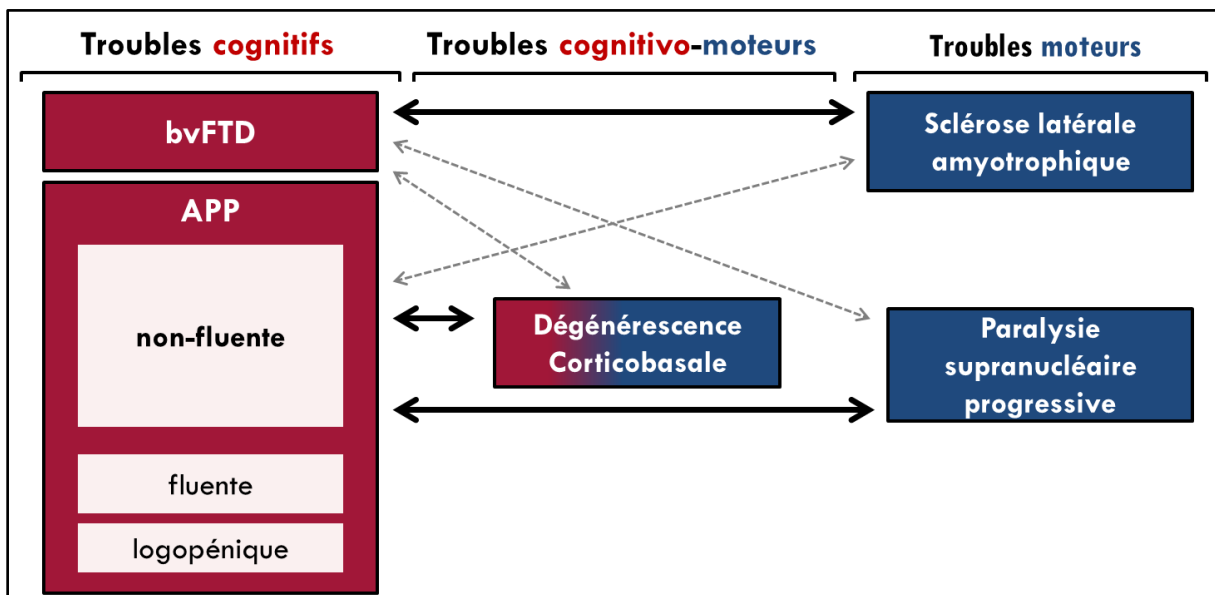
De plus, pour valider un diagnostic d'APP logopénique, les patients devront présenter au moins trois caractéristiques parmi les suivantes : la production d'erreurs phonémiques en discours spontané ou en dénomination, mais sans agrammatisme franc ni atteinte des aspects moteurs de langage et sans trouble de la compréhension des mots isolés ou de la connaissance des objets.

Fait important, dans la littérature les APP logopéniques ne sont pas toujours décrites comme une manifestation clinique des DLFT, car l'autopsie cérébrale post-mortem des patients et leurs résultats d'imagerie cérébrale en ante-mortem permettent très souvent de diagnostiquer une MA (38). D'autre part, les biomarqueurs protéiques mesurés dans le LCS des patients sont également souvent caractéristiques d'une MA biologique (39,40).

Si cette division des APP en trois sous-types permet désormais de catégoriser la plupart des patients, certains d'entre eux restent néanmoins inclassables, ou présentent des troubles du comportement associés (41). De plus, dans les APP, comme dans le variant comportemental des DLFT, des troubles moteurs pourront s'ajouter (42).

### 1.3. Troubles moteurs coexistant avec les DLFT

Les phénotypes cliniques classiques des DLFT peuvent parfois s'accompagner d'autres manifestations, en raison de pathologies cognitivo-motrices concomitantes. Dans ce contexte, les trois pathologies les plus souvent associées aux DLFT sont la sclérose latérale amyotrophique, la paralysie supranucléaire progressive et la dégénérescence corticobasale (figure 5) (43).



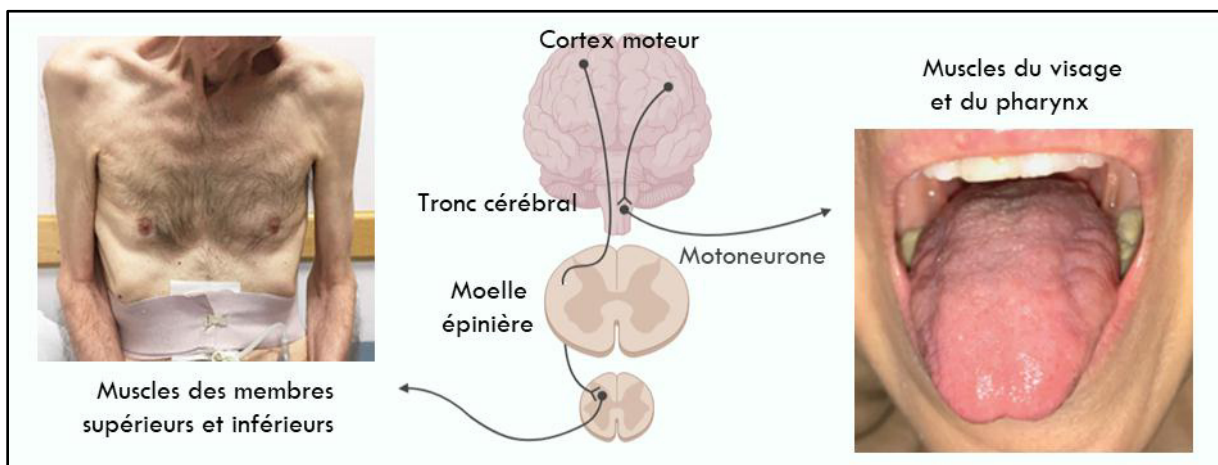
**Figure 5 :** Principales pathologies motrices ou cognitivo-motrices associées aux DLFT. Les associations fréquentes sont symbolisées par des flèches pleines, celles moins courantes sont représentées par des flèches en pointillé. **Abréviations :** APP : aphasie primaire progressive ; bvFTD : variant comportemental des dégénérescences lobaires frontotemporales.

### 1.3.1 Sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie caractérisée par la dégénérescence progressive des motoneurones périphériques et centraux. On la trouve également dans la littérature francophone sous le terme de maladie de Charcot (du nom de l'un des neurologues qui l'a initialement décrite en 1869) ou maladie de Lou Gehrig en Amérique du Nord (en mémoire d'un joueur de baseball célèbre décédé de cette maladie en 1941).

Avec une prévalence estimée à 5,4/100 000, et une incidence estimée à 2/100 000 par an, cette pathologie est la plus fréquente des maladies du motoneurone chez l'adulte (44).

L'entrée dans la maladie se fait classiquement de manière insidieuse, entre 50 et 60 ans. Dans environ 70 % des cas, la SLA altère en premier lieu les motoneurones spinaux, et se manifeste par une faiblesse musculaire généralement asymétrique des membres supérieurs ou inférieurs. Chez 30 % des malades, l'atteinte des motoneurones n'est initialement pas localisée dans la moelle épinière mais dans le tronc cérébral. Cette structure étant impliquée notamment dans l'activité des muscles oro-pharyngés, les patients peuvent alors présenter une dysarthrie, une hypersialorrhée et/ou une dysphagie (figure 6). Ceux-ci peuvent également souffrir de labilité émotionnelle, caractérisée par une tendance excessive à rire ou à pleurer en réponse à un stimulus minime.



**Figure 6 :** Atteintes possibles dans la sclérose latérale amyotrophique.

Que la SLA soit initialement spinale ou bulbaire, la paralysie musculaire progresse rapidement par absence de stimulation nerveuse, et aboutit à une atrophie généralisée des muscles. Après 2 à 5 ans d'évolution en moyenne, l'atteinte de l'innervation des muscles du diaphragme cause classiquement une paralysie respiratoire, entraînant le décès du patient (45). Cependant, environ 10 % des malades peuvent vivre avec la maladie pendant plus de 10 ans. Si les raisons exactes d'une telle longévité sont inconnues, il semblerait néanmoins que chez ces patients, le processus physiopathologique soit ralenti et les lésions nerveuses présentent une distribution limitée (46). Dans les critères de diagnostic de référence, édités pour la première fois en 1994 et révisés en 2000, la SLA est considérée essentiellement comme une pathologie motrice (47). Cependant, on estime aujourd'hui que des troubles cognitifs sont associés aux troubles moteurs chez la moitié des patients atteints de SLA, et que 15 % d'entre eux présentent tous les critères cliniques d'un variant comportemental des DLFT (48). Ce chevauchement symptomatologique, associé à la mise en évidence de variants moléculaires pathogènes communs à la SLA et aux DLFT, a remis en question l'idée d'entités pathologiques distinctes (49). Certains auteurs parlent alors de « spectre SLA-DLFT », dans lequel ces deux maladies seraient en fait le continuum d'une même maladie polymorphe (50).

### **1.3.2 Syndromes parkinsoniens atypiques**

La dégénérescence corticobasale et la paralysie supranucléaire progressive sont deux syndromes parkinsoniens atypiques, dont la prévalence s'établit à 1/100 000 et 8/100 000 respectivement (51). Les syndromes parkinsoniens atypiques regroupent des pathologies qui s'apparentent cliniquement à la maladie de Parkinson, mais qui présentent généralement une durée d'évolution plus courte, des complications plus fréquentes et plus rapides, ainsi qu'un effet thérapeutique limité voire nul du traitement par Lévodopa.

- ***Dégénérescence corticobasale***

La dégénérescence corticobasale a été décrite dès 1968 chez trois patients, qui présentaient des troubles moteurs sans faiblesse musculaire et sans atteinte cognitive majeure (52). Son existence en tant que pathologie a été établie dans les années 1990, grâce à des études de plus grandes cohortes (53,54). Depuis ces premières descriptions très homogènes, des formes plus polymorphes ont été décrites et l'on parle plutôt aujourd'hui de syndrome corticobasal (SCB).

Il est aujourd'hui admis que le SCB débute entre 60 et 70 ans par des signes discrets et progressifs. Cette maladie évolue ensuite pendant une durée moyenne de 8 ans avant décès. Elle s'exprime par des troubles cognitivo-moteurs en relation avec des lésions histopathologiques corticales (pariétales et frontales) et sous-corticales (au niveau des ganglions de la base) souvent asymétriques. L'atteinte motrice se traduit classiquement par une apraxie sensitive des membres, associée à une rigidité et une akinésie, mais aussi parfois par des myoclonies et des dystonies entraînant une instabilité de la posture, des chutes et des troubles de la marche. Des signes de dysarthrie et de dysphagie peuvent être observés chez certains malades, ainsi que des mouvements oculaires anormaux et des troubles visuels (55). Lorsque le SCB progresse, les patients peuvent présenter le « signe de la main étrangère », c'est-à-dire perdre le contrôle des mouvements de l'une de leurs mains, qui semble alors avoir sa volonté propre dans les cas les plus graves (56).

Les perturbations cognitives associées au SCB ont longtemps été considérées comme rares et tardives. Elles sont en fait courantes, et s'expriment parfois au premier plan (57). En effet, il a été fréquemment rapporté un syndrome dysexécutif, une acalculie et des troubles visuo-spaciaux chez les patients. Ceux-ci présentent également régulièrement des signes d'aphasie, essentiellement non fluente. Plus rarement, une désinhibition comportementale, ou des troubles de la mémoire peuvent être observés (55).

- ***Paralysie supranucléaire progressive***

La paralysie supranucléaire progressive (PSP), ou syndrome de Steele-Richardson-Olszewski, a été définie pour la première fois en 1964, lors de l'étude d'un petit nombre de patients qui présentaient principalement une paralysie verticale du regard associée à une instabilité posturale. Ces syndromes ont alors été reliés à une neuropathologie dégénérative affectant le tronc cérébral, les ganglions de la base et le cervelet. Ces observations ont servi de socle à l'élaboration de critères cliniques de référence publiés en 1996 (58).

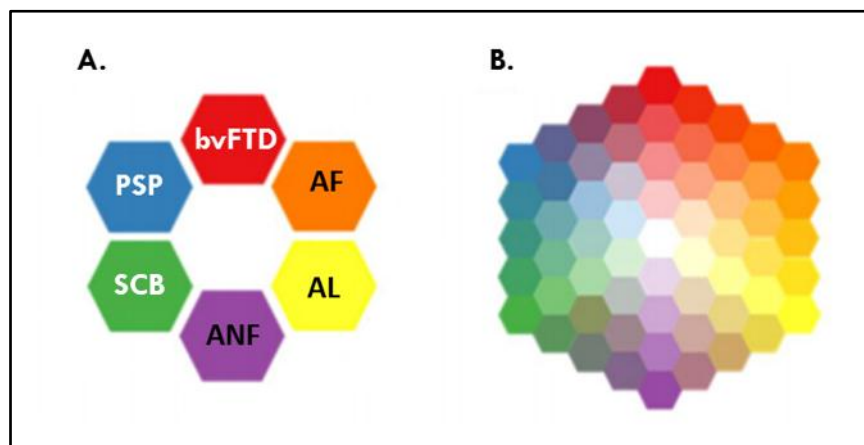
La PSP débute le plus souvent entre 60 et 70 ans, et présente une durée d'évolution progressive d'environ 6 ans avant décès. Dans sa forme classique, elle se caractérise par une atteinte du contrôle de l'oculomotricité, et en particulier par une paralysie verticale du regard, et des troubles de la vision, associés à une certaine rigidité corporelle, notamment de la nuque, et à un défaut du rétablissement postural du corps entraînant des chutes essentiellement vers l'arrière.



Des difficultés à la marche sont également possibles, se traduisant par des mouvements ralentis et maladroits. Contrairement à la maladie de Parkinson, les patients ne présentent pas de tremblement. En revanche, ils peuvent présenter un léger syndrome dysexécutif et une apathie qui s'aggrave généralement au cours de la maladie (59).

Si les critères diagnostiques actuels permettent un dépistage efficace des formes classiques des PSP, il existe néanmoins des formes moins typiques, de diagnostic ante-mortem moins évident (60). En effet, des signes de dystonie, d'apraxie, d'akinésie, de dysarthrie et de dysphagie ont été rapportés, pouvant évoquer un SCB (61). Il est également possible d'observer chez les patients atteints de PSP des atteintes cognitives typiques des DLFT, dont des troubles comportementaux dans 15 % des cas (62), ou parfois des signes d'APP essentiellement non fluente (63).

Le recouvrement symptomatologique des PSP, des SCB et des DLFT n'est pas sans poser de difficultés pour leur diagnostic. A titre d'exemple, seulement 25 % à 50 % des patients atteints de SCB seraient correctement diagnostiqués en ante-mortem. Une solution évoquée pour améliorer ce diagnostic serait alors de prendre en compte l'intensité de chaque trouble plutôt que leur présence (64). De plus, des considérations sur l'existence des PSP et des SCB comme pathologies distinctes des DLFT ont abouti à l'émergence de la notion de « spectre du syndrome des DLFT » (figure 7).



**Figure 7 :** Schéma d'illustration de la théorie du « spectre du syndrome des DLFT ». (A) Représentation historique des critères diagnostiques et (B) Représentation de la notion de spectre, faite de nuances entre les syndromes parkinsoniens atypiques, et les différents phénotypes cliniques des DLFT. **Abbréviations :** AF : aphasie fluente ; AL : aphasie logopénique ; ANF : aphasie non fluente ; bvFTD : variant comportemental des dégénérescences lobaires frontotemporales ; PSP : paralysie supranucléaire progressive SCB : syndrome corticobasal. Adapté de Murley *et al* (42).

Cette notion de spectre syndromique met finalement en lumière l'intérêt des analyses immunohistologiques cérébrales post-mortem des patients pour renforcer le diagnostic des différentes composantes de ce spectre. En effet, ces examens permettent souvent de révéler des lésions dans des zones cérébrales spécifiques aux DLFT, dues à des processus physiopathologiques particuliers.

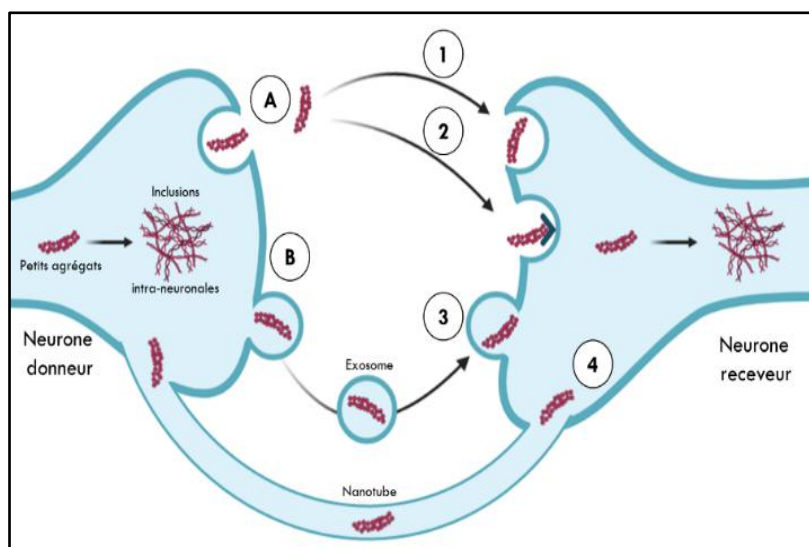
## 2. Physiopathologie des DLFT

Les DLFT sont, comme la majorité des maladies neurodégénératives, des protéinopathies. Ce terme générique désigne des pathologies se caractérisant par l'accumulation de protéines altérées, notamment au niveau cérébral (65).

Ces protéines sont retrouvées chez tous les individus, et assurent des fonctions physiologiques en conditions normales. Mais différentes conditions pathologiques, telles que des mutations génétiques ou des modifications post-traductionnelles inadaptées, peuvent entraîner chez ces protéines des changements de structures primaire, secondaire ou tertiaire. De façon générale, elles auront alors tendance à ne plus assurer leurs fonctions naturelles, et pourront à l'inverse acquérir des fonctions délétères.

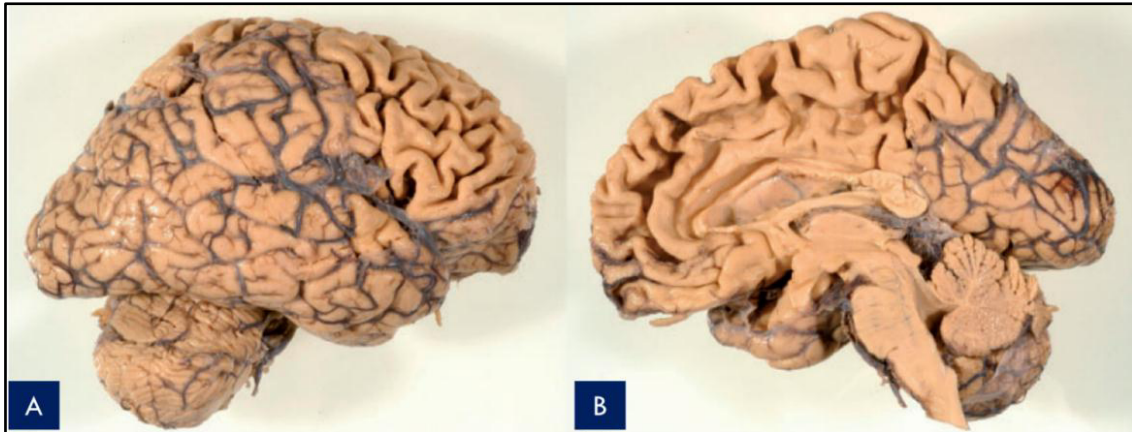
Par ailleurs, dans ces conditions, elles pourront être moins et/ou anormalement clivées, former des oligomères par défaut de clairance, puis éventuellement des polymères insolubles qui s'accumuleront, recruteront d'autres monomères ou oligomères qui s'agrègeront, formant ainsi des inclusions définitives cellulaires ou extracellulaires (66).

Des mécanismes additionnels permettent en outre la dissémination des protéines intracellulaires anormales et des petits agrégats de neurone à neurone (figure 8).



**Figure 8 :** Mécanismes potentiels de transmission de petits agrégats protéiques de neurone à neurone. Des oligomères ou des protofibrilles peuvent être relâchés (A) librement dans l'espace intercellulaire ou (B) dans des vésicules comme les exosomes. Ceci permet à ces formations de pénétrer dans un neurone voisin soit (1) par endocytose non spécifique ou (2) par endocytose via un récepteur spécifique, tandis que (3) les exosomes peuvent fusionner avec la membrane du neurone voisin. Il existerait également une possibilité de transfert (4) via des nanotubes reliant les cytoplasmes des deux neurones. D'après Guo *et al* (67). Figure réalisée avec l'outil de dessin Biorender (<https://biorender.com/>).

Ces événements sont associés d'une manière complexe, directe ou indirecte, au dysfonctionnement et à la dégénérescence progressive des neurones, se traduisant macroscopiquement par une atrophie cérébrale. Chez les patients souffrant de DLFT, cette atrophie prédomine au niveau des lobes frontaux ou temporaux (Figure 9).



**Figure 9 :** Cerveau autopsié d'un patient bvFTD présentant une dégénérescence cérébrale marquée au niveau frontal, diffusant vers le lobe temporal (A) en vue latérale et (B) en plan médian. D'après Van Mossevelde et al (68).

Les mécanismes pathologiques sous-jacents semblent être divers au sein des DLFT. En effet, les examens immunohistologiques post-mortem du tissu cérébral des patients ont révélé des inclusions protéiques de différentes natures, essentiellement intracellulaires (43).

A la fin des années 1980, la *Tubule associated unit* (Tau) a été la première protéine identifiée comme composante principale de ces inclusions (69). A cette époque, les inclusions cérébrales caractéristiques des DLFT pouvaient alors être de trois types : soit composées majoritairement de protéine Tau chez les patients souffrant de DLFT dites « DLFT-Tau », soit composées d'une ou plusieurs protéines ubiquitinylées non identifiées mais étant ni de la Tau ni de l'alpha-synucléine, soit sans distinction histologique particulière.

Au milieu des années 2000, la *TransActivation Response DNA-binding Protein of 43 kDa* (TDP-43) a été identifiée comme composante majoritaire des inclusions « ubiquitine positives, Tau et alpha-synucléine négatives » chez les patients atteints d'un sous-type de DLFT alors dénommé « DLFT-TDP » (70). Il est par ailleurs établi aujourd'hui que des inclusions de cette protéine sont présentes dans 97 % des cas de SLA (71), et dans 30 % des cas de MA (72). Cependant, elles ne sont pas forcément localisées dans les mêmes régions cérébrales dans ces deux pathologies et dans les DFLT.

## **2.1. TAR DNA-binding protein of 43 kDa**

La TDP-43 est une protéine de 414 acides aminés, très conservée au cours de l'évolution. Elle est codée par le gène *TAR DNA-binding protein 43 (TARDBP)*, localisé sur le bras court du chromosome 1 (73). L'analyse de son expression tissulaire a montré que cette protéine est ubiquitaire, avec une haute concentration cérébrale, mais également des taux élevés dans le pancréas, la rate, les ovaires ou encore les reins (74).

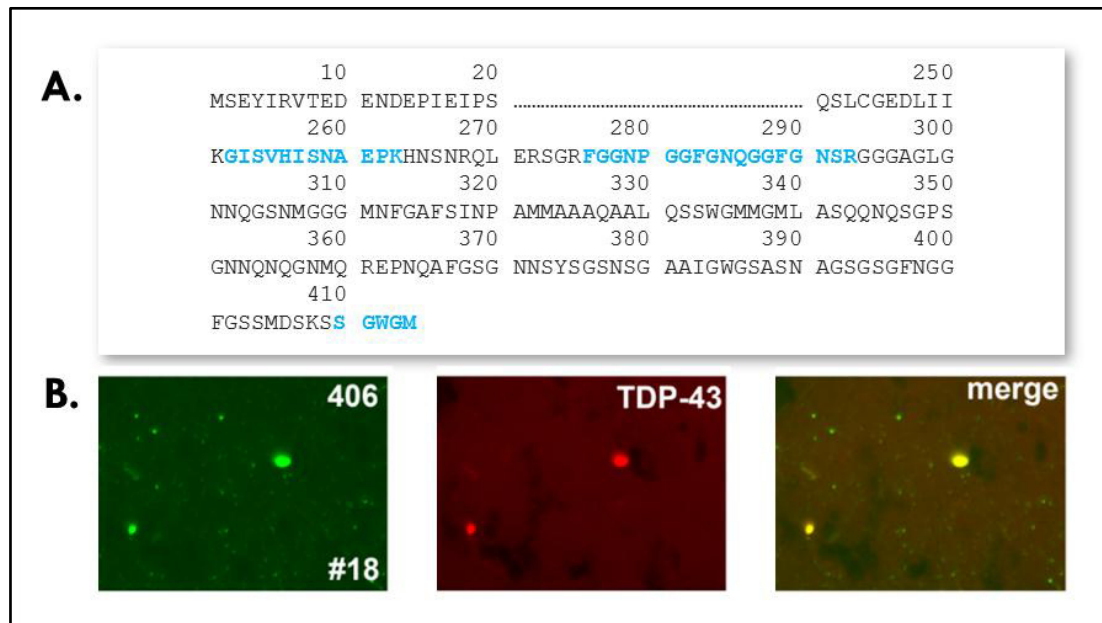
### **2.1.1 Première identification dans les DLFT**

En 2006, l'identification de la TDP-43 par deux équipes indépendantes, dans des inclusions cérébrales chez des patients autopsiés ayant souffert de DLFT et/ou de SLA, a été une avancée majeure dans l'étude de ces maladies (75,76).

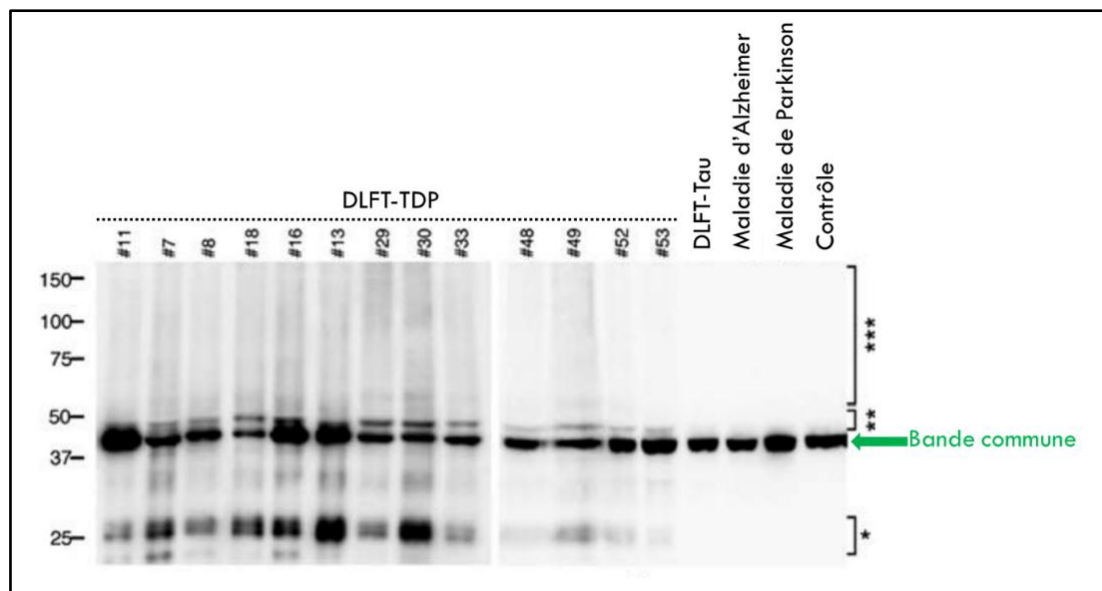
La première équipe a tout d'abord réalisé une extraction à l'urée des protéines du cortex frontal de deux patients, qui présentaient des troubles neurocognitifs sévères avant leur mort et chez lesquels des études neuropathologiques avaient permis de mettre en évidence des inclusions cérébrales « ubiquitine positives, Tau et alpha-synucléine négatives ». En utilisant des anticorps anti-ubiquitine, l'analyse par western blot (WB) des protéines extraites a alors révélé une bande d'environ 25 kDa. L'analyse du contenu protéique de cette bande en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) a mis en évidence trois peptides de la TDP-43 (figure 10 A). En outre, l'analyse par fluorescence in situ du cortex frontal de ces patients a montré une colocalisation entre les marquages obtenus avec des anticorps anti-ubiquitine et anti-TDP-43 (figure 10 B). Ces observations ont permis d'envisager la TDP-43 comme la protéine ubiquitylée non encore identifiée chez ces patients.

Dans cette même étude, une extraction des protéines cérébrales a été réalisée chez d'autres patients DLFT-TDP, mais aussi chez des sujets DLFT-Tau, souffrant de MA ou de maladie de Parkinson, ainsi que chez des individus contrôles. Les protéines n'ont pas forcément été extraites du cortex frontal des patients, mais étaient systématiquement issues de zones cérébrales caractérisées par un processus neurodégénératif. La réalisation de WB à partir des fractions recueillies, avec un anticorps anti-TDP-43, mit alors en évidence une bande d'environ 43 kDa chez tous les sujets. En revanche, des bandes spécifiques à 25 et 45 kDa, ainsi qu'une traînée à partir de 60 kDa, n'ont été observées que chez les patients DLFT-TDP (figure 11).

L'hypothèse de fragments carboxy-terminaux de la TDP-43 composant, au moins en partie, la bande de 25 kDa a été émise par les auteurs, car un des peptides mis en évidence en LC-MS/MS, formé des acides aminés 409 à 414, se trouve à l'extrémité carboxy-terminale de cette protéine.



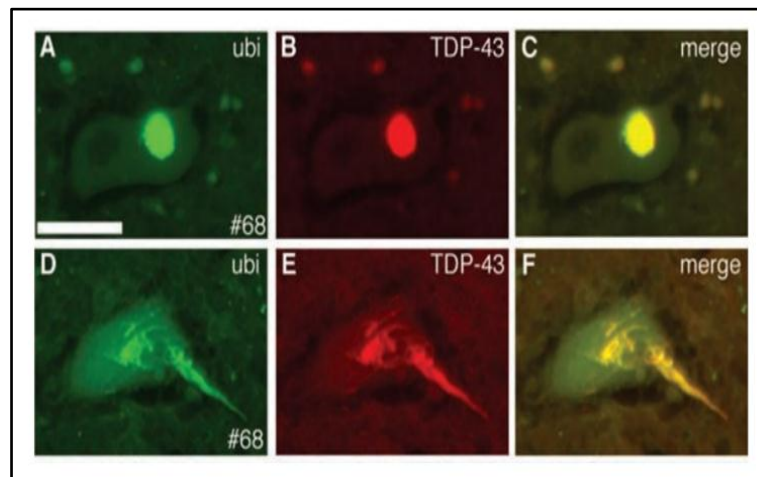
**Figure 10 :** Identification de la TDP-43 comme protéine impliquée dans les DLFT. (A) En bleu : peptides identifiés en LC-MS/MS. (B) Colocalisation de l'ubiquitine (spots verts) et de la TDP-43 (spots rouges) au niveau du cortex frontal d'un patient atteint de troubles neurocognitifs sévères. On observe que les deux protéines sont localisées exactement dans les mêmes zones (spots jaunes). **Abbréviations :** #18 : numéro du patient dans l'étude ; 406 : anticorps anti-ubiquitine ; merge : fondu des deux marquages ; TDP-43 : anticorps anti-TAR DNA-binding protein of 43 kDa. D'après Neumann *et al* (75).



**Figure 11 :** TDP-43 au niveau cérébral révélée par un anticorps anti-TDP-43. Les échantillons biologiques sont composés de protéines, extraites par l'urée de zones cérébrales pathologiques (cortex frontal, temporal ou hippocampe). Si l'on retrouve une bande commune de TDP-43 chez tous les sujets, incluant le contrôle (flèche verte), on trouve également des bandes spécifiques chez les patients DLFT-TDP à 25 kDa (\*) et 45 kDa (\*\*), ainsi qu'une trainée à partir de 60 kDa (\*\*\*). Ce profil n'est pas retrouvé chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de la maladie de Parkinson, ni chez les patients DLFT-Tau ou chez les contrôles. **Abbréviations :** DLFT-TDP : dégénérescence lobaire frontotemporale associée à des inclusions de TAR DNA-binding protein of 43 kDa ; DLFT-Tau : dégénérescence lobaire frontotemporale associée à des inclusions de protéine tubule associated unit. D'après Neumann *et al* (75).

Des expériences pour caractériser biochimiquement cette TDP-43 retrouvée chez les patients ont également été menées dans cette étude. Dans un premier temps, une déphosphorylation des protéines cérébrales recueillies a été réalisée. Le profil de migration en WB de la TDP-43 pathologique déphosphorylée s'est alors révélé très différent du profil typique défini auparavant. En effet, la bande de 45 kDa n'était plus visible, tandis que celle à 43 kDa était plus intense. De plus, plusieurs bandes réparties entre 23 et 27 kDa étaient retrouvées, au lieu d'une unique bande de 25 kDa. Ces résultats ont permis de mettre en évidence l'implication de la phosphorylation dans le processus physiopathologique des DLFT-TDP.

Concernant la SLA, et toujours dans cette étude, la présence d'ubiquitine et de TDP-43 au sein des motoneurons de la moelle épinière a été évaluée chez deux cas à la présentation clinique classique, c'est-à-dire présentant des troubles moteurs sans troubles cognitifs. En immunofluorescence, comme pour les patients DLFT-TDP, une parfaite colocalisation a été observée entre l'ubiquitine et la TDP-43 (figure 12). Chez des patients souffrant d'une SLA de présentation clinique moins classique, une telle superposition a été retrouvée dans les neurones de l'hippocampe ou ceux du cortex frontal ou temporal.



**Figure 12** : Co-localisation (spots jaunes) de l'ubiquitine (spots verts) et de la TDP-43 (spots rouges) au niveau d'inclusions rondes (A,B,C) ou en forme d'écheveau (D,E,F) au sein d'un motoneurone d'un patient atteint de SLA. **Abréviations** : #68 : numéro du patient dans l'étude ; ubi : anticorps anti-ubiquitine ; merge : fondu des deux marquages ; TDP-43 : anticorps anti-Tar DNA-binding protein of 43 kDa. D'après Neumann *et al* (75).

Finalement, le profil par WB des protéines extraites de la moelle épinière ou des lobes frontaux et temporaux des patients atteints de SLA a permis de retrouver la signature de la TDP-43 pathologique des patients DLFT-TDP, et sa variante pour les échantillons déphosphorylés. Ces expériences ont ainsi renforcé l'idée d'un lien physiopathologique et protéique entre certaines DLFT et la SLA.

Toujours en 2006, une deuxième équipe publia des travaux portant là encore sur l'identification de la TDP-43 chez certains patients présentant des signes de DLFT ou de SLA. En utilisant des outils similaires à Neumann *et al*, les auteurs en sont arrivés aux mêmes conclusions (76).

En effet, l'analyse en LC-MS/MS des protéines issues des inclusions « ubiquitine-positives et Tau négatives » cérébrales ou spinales, extraites par une solution tampon contenant 1 % de sarkosyl, permet d'identifier le peptide de la TDP-43 composé des acides aminés 276 à 293 (figure 10 A).

L'analyse en WB des protéines extraites, en utilisant un anticorps anti-TDP-43, révéla chez les sujets atteints de DLFT-TDP une bande de 43 kDa, une autre de 45 kDa, une trainée à partir de 60 kDa et des bandes de plus faible poids moléculaire. Chez les sujets souffrant d'autres maladies neurodégénératives et chez les sujets contrôles, seule la bande de 43 kDa était présente. Après la déphosphorylation des échantillons, il a été constaté la disparition de la bande de 45 kDa.

Les études immunohistologiques conduites dans cette deuxième étude, avec deux anticorps anti-TDP-43, ont permis d'observer chez tous les sujets le marquage des noyaux des neurones et des cellules gliales dans diverses régions cérébrales. En revanche, chez les patients DLFT, elles révélèrent un marquage spécifique d'inclusions cytoplasmiques, dans les cellules corticales et sous-corticales. Cette localisation pathologique de la TDP-43 a également été mise en évidence dans les neurones de la moelle épinière des sujets SLA (qu'ils présentent ou non des signes de DLFT). Toujours comme dans l'étude de Neumann *et al*, la morphologie et la localisation de ces inclusions étaient comparables à celles mises en évidence par des anticorps anti-ubiquitine.

Finalement, le fait qu'une deuxième équipe ait identifié la TDP-43 chez des sujets atteints de SLA et de DLFT a encore renforcé l'idée d'un processus physiopathologique commun à ces deux pathologies.

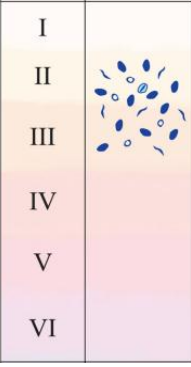
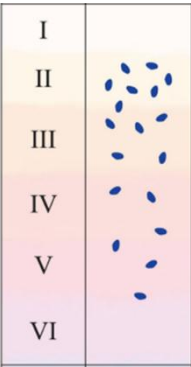
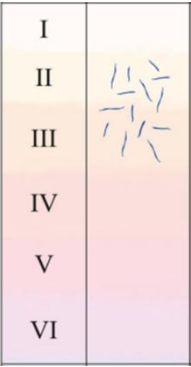
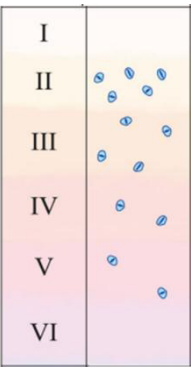


### 2.1.2 Développement d'une classification histologique

Dans les années qui suivirent l'identification de la TDP-43, sa caractérisation dans le tissu cérébral des patients atteints de DLFT-TDP s'est poursuivie. En 2011, une classification histologique a été proposée (77), adaptée de deux classifications antérieures basées sur la description des inclusions ubiquitinylées corticales et sous-corticales (78,79). Cette nouvelle classification propose une description de la répartition et de la morphologie des inclusions de TDP-43 corticales, ainsi qu'une correspondance avec les différents phénotypes cliniques (Tableau I).

Cette classification a été validée par d'autres études depuis, malgré un recouvrement clinique et biologique entre les différents types de DLFT-TDP (80–82). A titre d'exemple, des patients de type B peuvent parfois présenter de petites inclusions cytoplasmiques neuronales qui évoquent une DLFT-TDP de type A lorsqu'elles sont concentrées dans la couche II du néocortex. Pour faciliter la classification de cas difficiles, l'exploration des inclusions de TDP-43 au niveau sous-cortical peut alors être pertinente, car ces régions présentent également des motifs caractéristiques suivant les types de DLFT-TDP (tableau II) (83).

Malgré le renforcement du diagnostic histologique apporté par l'étude de l'hippocampe et des autres aires sous-corticales, certains patients restent difficiles à classer. En effet, ceux-ci peuvent soit présenter des caractéristiques de deux types différents, notamment A et B, soit des caractéristiques hors classification (84). Ainsi, en 2017, un nouveau groupe de DLFT-TDP de type E a été décrit chez sept patients souffrant d'une forme de DLFT de type comportemental et d'évolution très rapidement défavorable, avec un décès dans les 3 ans après l'apparition des premiers signes (85). L'étude histopathologique des prélèvements cérébraux de ces patients a mis en évidence des inclusions cytoplasmiques neuronales granulo-filamenteuses dans toutes les couches du néocortex, accompagnées de nombreux petits grains en arrière-plan. Ces patients présentaient en outre de nombreuses inclusions de TDP-43 curvilinéaires, dans les oligodendrocytes du cortex et de la matière blanche, n'épargnant que le néocortex occipital et le cervelet. Fait remarquable, la TDP-43 agrégée ne semblait pas être ubiquitinylée. Très récemment, certains profils caractéristiques des DLFT-TDP de type E ont été retrouvés chez deux patients souffrant d'APP associée à une SLA et dont le décès est intervenu en moins de deux ans, mais également chez une patiente atteinte du syndrome de Foix-Chavany-Marie (86,87).

TYPE	Néocortex	Phénotypes cliniques associés
<b>A</b>	<p><b>Dans les couches supérieures du néocortex :</b></p> <p><b>ICN abondantes</b> compactes, aspect ovalaire ou falciforme</p> <p><b>IIN peu abondantes</b> lentiformes</p> <p><b>ND nombreux</b> courts et épais</p>	 <p><b>bvFTD :</b> essentiellement</p> <p><b>APP :</b> possible, type non fluente ++</p> <p><b>Troubles moteurs associés :</b> rares</p>
<b>B</b>	<p><b>Dans les six couches du néocortex :</b></p> <p><b>ICN peu abondantes</b> souvent diffuses et granulaires</p> <p><b>IIN non présentes</b></p> <p><b>ND très rares</b></p>	 <p><b>bvFTD :</b> fréquent</p> <p><b>APP :</b> rare, type non fluente ++</p> <p><b>Troubles moteurs associés :</b> courants</p>
<b>C</b>	<p><b>Dans les couches supérieures du néocortex :</b></p> <p><b>ICN rares</b></p> <p><b>IIN non présentes</b></p> <p><b>ND présents</b> longs et tortueux</p>	 <p><b>bvFTD :</b> rare</p> <p><b>APP :</b> essentiellement, type fluente ++</p> <p><b>Troubles moteurs associés :</b> très rares</p>
<b>D</b>	<p><b>Dans les six couches du néocortex :</b></p> <p><b>ICN rares</b> compactes</p> <p><b>IIN abondantes</b> lentiformes</p> <p><b>ND nombreux</b> courts</p>	 <p><b>Spécifiquement associé à des cas familiaux avec mutation d'un gène particulier : (88)</b></p> <p><b>myosite à inclusions (chez 90 % des cas)</b></p> <p>+/- maladie des os de Paget (chez 45 % des cas)</p> <p>+/- DLFT : bvFTD ou APP (chez 30 % des cas)</p> <p>+/- SLA (chez 10 % des cas)</p>

**Tableau I :** Classification actuelle des DLFT-TDP, suivant les caractéristiques des inclusions de TDP-43 néocorticales et phénotypes cliniques associés. **Abréviations :** APP : aphasie primaire progressive ; bvFTD : variant comportemental des dégénérescences lobaires frontotemporales ; DLFT-TDP : dégénérescences lobaires frontotemporales associées à des inclusions de *TAR DNA-binding protein of 43 kDa* ; ICN : inclusions cytoplasmiques neuronales ; IIN : inclusions intranucléaires neuronales ; ND : neurites dystrophiques ; SLA : sclérose latérale amyotrophique.

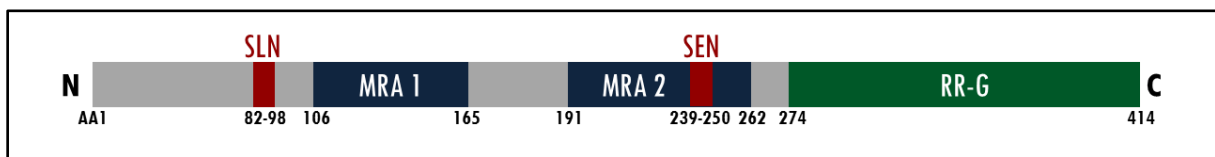
TYPE	Hippocampe	Autres aires sous-corticales
A	<p><b>ICN présentes</b> dans la région CA1 ++ filaires essentiellement, mais compactes, diffuses ou granulaires possible</p> <p>+/- sclérose</p> <p><b>IIN peu abondantes</b></p>	<p><b><u>Substance blanche</u></b> <b>ICN abondantes</b> filaires</p> <p><b><u>Substance grise</u></b> <b>ICN possibles</b> <b>ND abondantes</b></p>
B	<p><b>ICN nombreuses</b> diffuses ou granulaires</p> <p><b>IIN absentes</b></p>	<p><b><u>Motoneurones bas</u></b> <b>ICN abondantes</b> diffuses, compactes ou filaires</p> <p><b><u>Substance blanche</u></b> <b>ICN abondantes</b> <b>ICCG peu abondantes</b></p> <p><b><u>Substance grise</u></b> <b>ICN nombreuses</b> substance noire et ganglions de la base aspect diffus essentiellement <b>ICCG peu abondante</b></p>
C	<p><b>ICN nombreuses</b> compactes aspect lisse, contour rond</p> <p><b>IIN absentes</b></p>	<p><b><u>Substance blanche</u></b> peu touchée</p> <p><b><u>Substance grise</u></b> <b>ICN possibles</b> compactes <b>ND possibles</b></p>
D	<p>Epargné</p>	<p><b>ND et NII peu nombreux</b> amygdale, ganglion de la base, noyau basal, thalamus</p> <p><b>Structures épargnées</b> canal médullaire, cervelet, pont</p>

**Tableau II :** Motifs sous-corticaux aidant au diagnostic des DLFT-TDP. **Abréviations :** APP : aphasie primaire progressive ; bvFTD : variant comportemental des dégénérescences lobaires frontotemporales ; CA1 : champ ammonien hippocampique numéro 1 ; DLFT-TDP : dégénérescences lobaires frontotemporales associées à des inclusions de *TAR DNA-binding protein of 43 kDa* ; ICGG : inclusions cytoplasmiques dans les cellules gliales ; ICN : inclusions cytoplasmiques neuronales ; IIN : inclusions intranucléaires neuronales ; ND : neurites dystrophiques ; SLA : sclérose latérale amyotrophique ; VCP : *Valosin-containing protein*.

Le fait que quatre types de DLFT-TDP différents ne permettent pas la classification tous les patients illustre la complexité de la physiopathologie des DLFT-TDP. Pourtant, si le processus complet conduisant à une neurodégénération majeure n'est pas encore connu, un certain nombre d'éléments ont été découverts concernant la structure de la TDP-43, ses fonctions physiologiques, et son implication dans la physiopathologie des DLFT.

### 2.1.3 Structure de la TDP-43

La TDP-43 appartient à la classe des ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires, qui présentent notamment la capacité de se fixer aux acides ribonucléiques (ARN) et désoxyribonucléiques (ADN) simples brins. A cette fin, elle possède deux motifs de reconnaissance des acides nucléiques (MRA 1 et MRA 2), d'environ soixante à soixante-dix acides aminés chacun, très conservés au cours de l'évolution et placés en tandem (figure 13). Ces deux séquences sont notamment capables d'interagir avec les motifs « uracile-guanine » (UG) répétés des ARN, ou les motifs « thymine-guanine » (TG) répétés des ADN.



**Figure 13** : Structure de la protéine TDP-43. **Abréviations** : AA : acide aminé ; C : extrémité carboxy-terminale ; MRA : motifs de reconnaissance des acides nucléiques ; N : extrémité amino-terminale ; RR-G : région riche en glycine ; SEN : signal d'exportation nucléaire ; SLN : signal de localisation nucléaire.

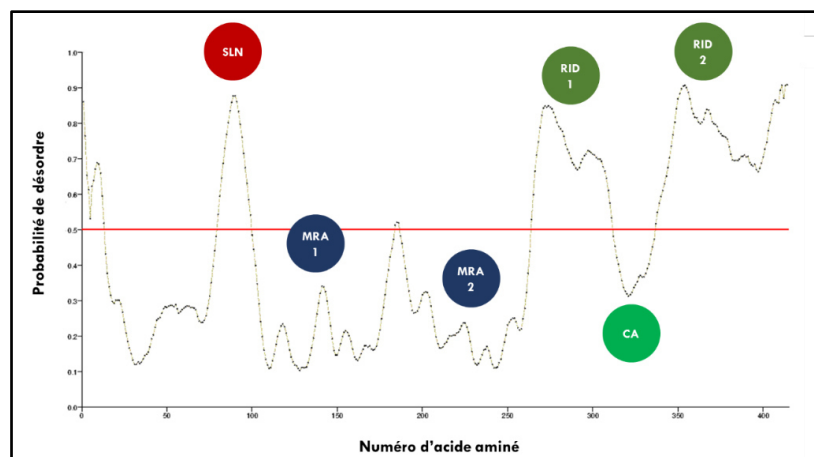
Cette affinité pour les motifs UG/TG répétés pourrait trouver son explication dans une étude récente, qui a montré *in vitro* que le domaine MRA 1 serait plus impliqué dans la fixation aux acides nucléiques que le domaine MRA 2, sans se limiter aux motifs UG/TG répétés. Le domaine MRA 2 servirait alors, par un phénomène d'encombrement stérique, à privilégier la fixation du MRA 1 aux séquences riches en UG ou TG (89). Bien que tous les travaux ne concluent pas à des interactions réduites entre le MRA 2 et les acides nucléiques, le rôle potentialisateur de ce dernier sur la fixation du MRA 1 aux séquences riches en UG/TG semble faire consensus (90,91). Cette protéine a néanmoins un impact sur le niveau d'expression d'un grand nombre de gènes et de protéines (92). Ceci peut notamment s'expliquer par le fait que les séquences UG sont très fréquentes dans les ARN messagers (ARNm). De plus, si l'affinité entre la TDP-43 et les ARN augmente avec le nombre de répétitions des séquences UG, un tel assemblage ne constitue pas en soi un site de liaison pour la protéine, qui peut se fixer sur des séquences d'ARNm sans motifs UG répétés (93,94).

Les MRA sont précédés d'un signal de localisation nucléaire (SLN), formé par les acides aminés 82 à 98. Il a également été décrit l'existence d'un signal d'exportation nucléaire (SEN) inclus dans le MRA 2 (figure 13). Cependant, l'importance physiologique de cette séquence fait aujourd'hui débat (95).

Au niveau de son segment carboxy-terminal, la TDP-43 contient une région dite « de faible complexité », car composée de peu d'acides aminés différents. Chez cette protéine, cette séquence est riche en glycine (figure 13). Cette région est aussi appelée domaine « prion-like », car elle possède une homologie de séquence avec la protéine Prion, impliquée dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob (96). Elle contient par ailleurs la plupart des soixante-quatre sites de phosphorylation potentiels de la TDP-43 (quarante-et-une sérines, quinze thréonines et huit tyrosines) (97).

La séquence riche en glycine de la TDP-43 inclut également la région dite du « cœur amyloïde » (CA), composée des acides aminés 311 à 360. Son étude structurale a montré qu'elle était riche en alanine (28 % des acides aminés de cette séquence) et en méthionine (25 % des acides aminés de cette séquence) et se conformait donc préférentiellement en hélice alpha (98).

Le CA est entouré de deux régions « intrinsèquement désordonnées » (RID), qui présentent des résidus hydrophobes (valine, leucine, isoleucine, tryptophane...) à des emplacements très conservés au cours de l'évolution (99). Ces RID n'obéissent pas à la loi édictée dans les années 1960 par Christian Boehmer Anfinsen, qui stipule qu'une séquence en acides aminés, dans un environnement donné, définit une structure tridimensionnelle unique aux protéines et donc leurs fonctions. La découverte des RID a en fait démontré la présence de segments dynamiques, adoptant de multiples conformations successives, voire restant sous forme linéaire (figure 14). Ce phénomène permettrait aux protéines d'assurer un grand nombre de fonctions, notamment en facilitant les interactions moléculaires (100).



**Figure 14 :** Prédiction de la désorganisation de la structure tertiaire de la TDP-43, suivant sa composition en acides aminés. **Abréviations :** CA : région du cœur amyloïde ; MRA : motifs de reconnaissance des acides nucléiques ; RID : régions intrinsèquement désordonnées ; SLN : signal de localisation nucléaire. Résultats obtenus par utilisation du système « Protein Disorder Prevision » (<http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>).

## 2.1.4 Fonctions physiologiques de la TDP-43

- ***Régulation de la transcription des gènes***

En conditions physiologiques, la localisation de la TDP-43 est essentiellement nucléaire, où l'un de ses rôles fondamentaux est de réguler la transcription d'un grand nombre de gènes, impliqués dans différents processus physiologiques ou pathologiques (101).

Cette fonction, assurée notamment par la fixation de cette protéine au niveau de régions promotrices des gènes sur l'ADN, explique d'ailleurs son nom. En effet, la TDP-43 a été initialement décrite en 1995, comme agent protéique de 43 kDa capable d'inhiber la réplication du virus de l'immunodéficience humaine de type 1, par fixation sur la séquence promotrice *TransActivation Response element* (TAR) de l'ADN rétro-transcrit du virus (102).

- ***Modulation de l'épissage alternatif des pré-ARNm***

Toujours lorsqu'elle est localisée dans le noyau, la TDP-43 module l'épissage alternatif de nombreux pré-ARNm (figure 15) (101). Cette fonction passe par la formation d'homodimères ou d'oligomères nucléaires physiologiques de TDP-43, grâce à une séquence amino-terminale de la protéine composée des acides aminés 1 à 80 (71,103). L'importance de ces structures a été mise en évidence dans un modèle cellulaire murin, exprimant une TDP-43 humaine sans capacité d'oligomérisation, conduisant à la production d'ARNm cibles anormaux (103). La fonction d'épissage des pré-ARNm est également dépendante d'interactions entre la TDP-43, via sa région carboxy-terminale, et d'autres protéines nucléaires, permettant l'assemblage de spliceosomes, qui sont des mégasstructures polyprotéiques impliquées dans l'épissage des introns des ARNm (104).

L'implication de la TDP-43 dans la maturation des ARNm a été décrite pour la première fois en 2001, dans une étude portant sur la synthèse cellulaire du canal *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR). La capacité de la TDP-43 à inhiber l'épissage de l'exon 9 du pré-ARNm codant pour ce canal a été à l'origine d'un réel espoir thérapeutique. En effet, l'épissage de cet exon conduit à la synthèse d'un canal CFTR inactif, retrouvé chez les sujets souffrant par exemple de mucoviscidose. Malheureusement, malgré plusieurs tentatives, cette découverte n'a pas permis l'émergence d'une thérapie ciblée (105).

Des travaux ultérieurs de séquençage d'ARNm à grande échelle permirent de mettre en évidence que beaucoup d'ARNm cibles de la TDP-43 codent pour des protéines impliquées dans le fonctionnement synaptique ou le développement neuronal (106). La TDP-43 est par exemple impliquée dans la maturation de l'ARNm de la sortiline, qui est un récepteur membranaire permettant l'internalisation par les neurones de différents facteurs de croissance cellulaires. L'épissage par la TDP-43 de la région « Exb17 » du pré-ARNm de la sortiline permettrait d'obtenir un récepteur fonctionnel (107). Parmi les facteurs de croissance internalisés, on trouve par exemple la progranuline, qui semble alors favoriser la croissance des neurites et allonge la survie des neurones en culture (108).

En 2011, une étude réalisée sur des cellules humaines rapporta pour la première fois que la TDP-43 pouvait autoréguler son niveau d'expression, afin de garder une concentration cellulaire constante, via une boucle de rétroaction négative (109). En effet, en cas d'excès de TDP-43 au niveau nucléaire, celle-ci peut se fixer sur la séquence *TDP-43 binding region* de son propre ARNm. Cette fixation déclenche alors un épissage alternatif des transcrits immatures, selon deux modèles possibles : soit l'ARNm subit un épissage des introns 6 et 7, ce qui aboutit à la formation d'un codon-stop prématuré et donc à l'élimination de l'ARNm après sa migration dans le cytoplasme, grâce à des systèmes de surveillance de la qualité des ARNm (110). Soit l'ARNm subit un épissage de l'intron 7 et la suppression de l'un de ses trois sites de polyadénylation, provoquant son extrême instabilité et sa rétention dans le noyau, favorisant alors son élimination via les exosomes (111). Ces deux modèles, issus d'observations chez des souris transgéniques ou dans des cultures cellulaires humaines, présentent un résultat identique : la TDP-43 peut réduire son propre taux d'ARNm fonctionnel en cas de forte concentration de la protéine au niveau nucléaire.

- ***Stabilisation et export des ARNm vers le cytoplasme***

En plus de son rôle dans l'épissage alternatif des ARNm, la TDP-43 est impliquée dans la stabilisation de ces éléments (112). Elle joue également un rôle dans leur exportation du noyau vers le cytosol, en faisant la navette entre ces deux compartiments. Pour cela, la TDP-43 liée à un ARNm pourrait interagir avec des complexes d'exportation des ARNm (113).

Des études ont par exemple mis en évidence un lien entre la localisation correcte de la TDP-43 dans les cellules et le complexe « TRanscription EXport » (TREX) (114). En effet, une baisse de l'expression du facteur d'export Aly/Ref, qui est un composant de TREX, semble diminuer l'exportation de la TDP-43 vers le cytoplasme chez la drosophile (115).

Cependant, cette diminution de l'exportation de la TDP-43 vers le cytosol n'a pas été constatée dans toutes les études (116). Il se pourrait alors que d'autres mécanismes soient impliqués dans la migration de la TDP-43 vers le cytoplasme des cellules. Il a ainsi été proposé que la séquence SEN de cette protéine, située au sein du MRA 2, puisse être reconnue par des exportines, comme l'Exportine 1 (XPO1) (117). Cependant, en culture cellulaire, la délétion du SEN n'empêche pas la TDP-43 de rejoindre le cytoplasme (116). De plus, il semblerait que la structure du domaine MRA 2 empêche les résidus hydrophobes clés du SEN d'être accessibles aux protéines de transport (95). Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs de XPO1 n'a pas eu d'effet sur la localisation dans des cultures de neurones corticaux de rongeurs (118). Il a alors été proposé que la TDP-43 puisse migrer vers le cytoplasme par diffusion passive, bien qu'une masse apparente supérieure à 40 kDa apparaisse comme une limite pour le passage des pores nucléaires sans transporteur spécifique (119). Cette assertion est renforcée par le fait qu'en augmentant artificiellement la taille de la TDP-43, une diminution de sa localisation cytosolique est observée en culture cellulaire (116).

Si le mode d'exportation de la TDP-43 du noyau n'est pas complètement compris, il est bien établi que la TDP-43 cytoplasmique retourne au noyau par un transport actif. En effet, une étude a montré des interactions entre cette protéine et des karyophérines dans le cytoplasme des cellules (120). La karyophérine- $\alpha$  (KPNA), reconnaissant le SLN de la TDP-43, forme avec cette protéine et la karyophérine- $\beta$ 1 (KPNB) un complexe trimère, permettant son importation dans le noyau (figure 15) (95,116).

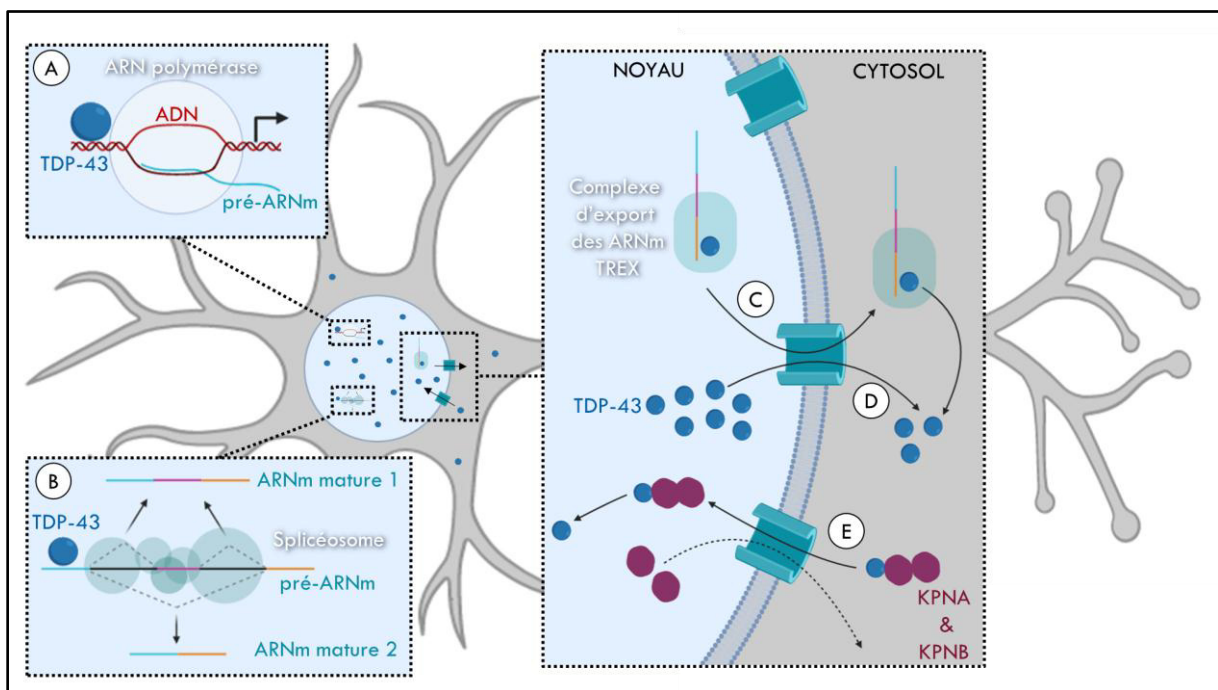
- ***Fonctions cytoplasmiques et dégradation de la TDP-43***

La TDP-43 cytoplasmique qui ne rejoint pas le noyau semble assurer diverses fonctions dans le cytoplasme des cellules, comme moduler la traduction de certaines protéines par interaction avec les ribosomes (121). Parmi ces protéines, certaines sont essentielles aux neurones (122,123). La TDP-43 peut également participer à la formation de granules de transport cellulaire des ARNm, par interaction avec d'autres transporteurs d'acides nucléiques (124).



Ces structures ont la capacité de se mouvoir vers le corps cellulaire ou à l'inverse vers les terminaisons axonales. Ils prennent notamment en charge des acides nucléiques codant pour des composantes de l'architecture des neurones comme les neurofilaments (125), ou codant pour des protéines impliquées dans le fonctionnement synaptique, ce qui suggère l'implication de la TDP-43 dans la régulation de la synapse (126).

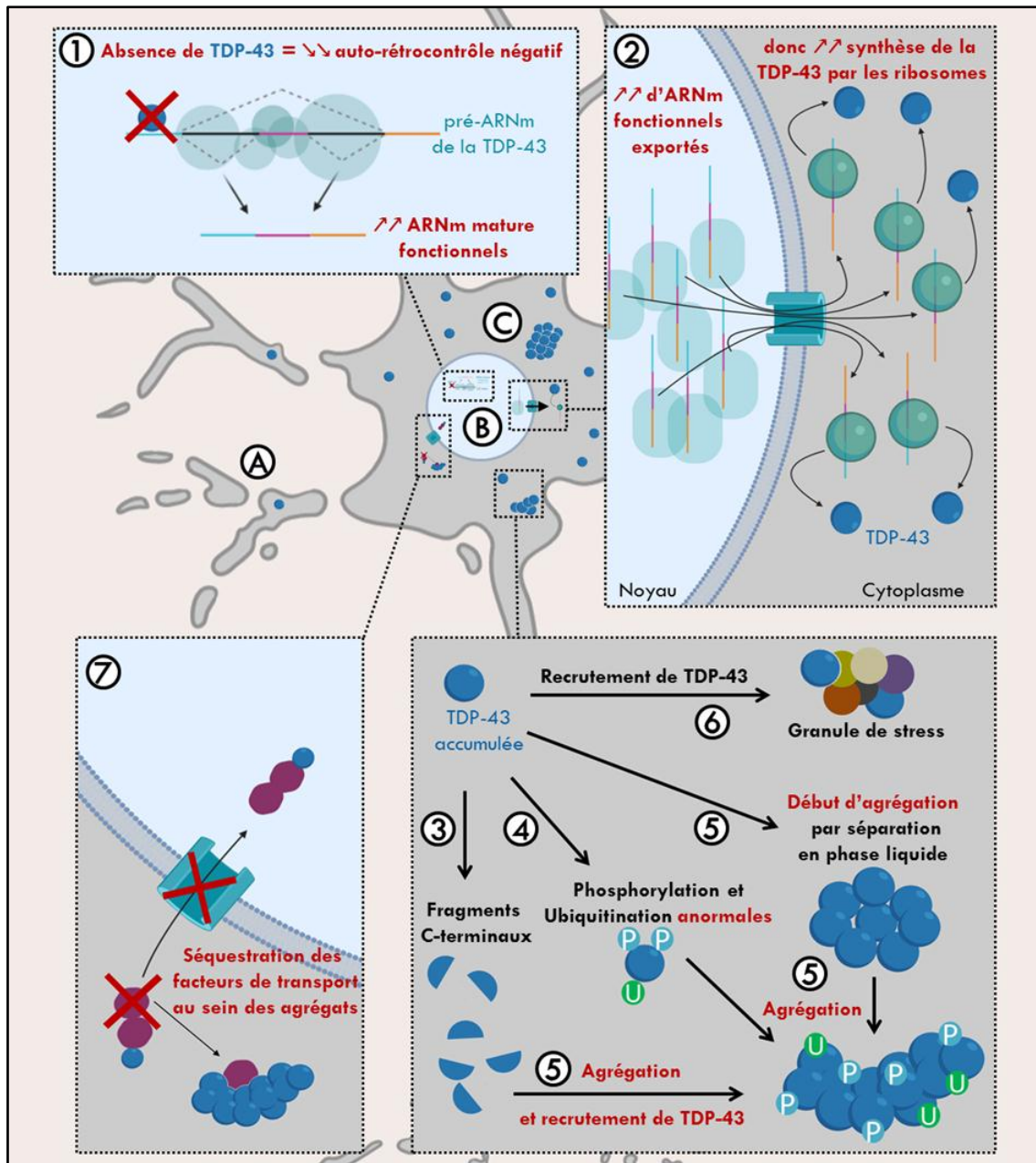
Hors du noyau, la TDP-43 peut aussi être dégradée après ubiquitination via le système ubiquitine-protéasome (SUP), connu également pour jouer un rôle crucial dans la protéolyse de protéines mal conformées persistantes (127), ou par une voie de recyclage alternative, appelée macro-autophagie (du grec « se manger soi-même ») et qui fait intervenir les lysosomes (74). Ces systèmes, agissant en synergie, permettent ainsi un contrôle efficace de la conformité de la conformation des protéines cellulaires en conditions physiologiques.



**Figure 15** : Physiologie de la TDP-43. Dans les cellules, dont les neurones, la localisation de la TDP-43 est essentiellement nucléaire. Cette protéine y joue un rôle majeur (A) dans la régulation de la transcription de certains gènes (B) dans l'épissage alternatif de nombreux pré-ARNm, notamment par interaction avec le spliceosome et (C) est impliquée dans le transport des ARNm matures vers le cytosol, par des complexes comme TREX, pour qu'ils y soient traduits en protéines. (D) Le transfert de la TDP-43 du noyau au cytosol peut également se faire par diffusion passive. (E) Son retour au noyau est assuré par un transport actif, par une association en trimère avec les KPN A et B, qui repartiront vers le cytoplasme une fois la TDP-43 libérée au niveau nucléaire. **Abréviations** : ADN : Acide désoxyribonucléique; ARNm : Acide Ribonucléique messager ; KPNA : Karyophérine- $\alpha$  ; KPNB : Karyophérine- $\beta$ 1 ; TDP-43 : *Tar DNA-binding protein of 43 kDa* ; TREX : complexe TRanscription EXport. Figure réalisée avec l'outil de dessin Biorender (<https://biorender.com/>).

## 2.1.5 Implication de la TDP-43 dans la physiopathologie des DLFT

Dans les DLFT, de multiples processus pathologiques coexistent et se complètent. Ainsi, il semblerait que la perturbation des fonctions cellulaires de cette protéine soit à la fois la cause et la conséquence de son agrégation (figure 16) (128).



**Figure 16** : Implication de la TDP-43 dans la physiopathologie des DLFT. L'analyse du tissu cérébral des patients souffrant de protéinopathie à TDP-43 a permis de mettre en évidence dans certaines zones (A) une dégénérescence neuronale, (B) un défaut de TDP-43 au niveau nucléaire et (C) la présence de TDP-43 sous forme agrégée dans le cytoplasme. Des processus moléculaires ont été décrits pour expliquer ces observations, notamment (1) une diminution de l'auto-rétrocontrôle de la production d'ARNm fonctionnels codant pour la TDP-43, (2) entraînant une synthèse accrue de TDP-43 au niveau cytoplasmique, (3) qui sera clivée en fragments carboxy-terminaux et (4) subira des modifications post-traductionnelles anormales, perturbant son élimination et (5) favorisant son accumulation dans des agrégats ou (6) sous forme de granules de stress. (7). Les agrégats pourront séquestrer divers facteurs de transport de cette protéine, gênant son retour au cytoplasme au noyau, entretenant un cercle vicieux par amplification du point (1). Figure réalisée avec l'outil de dessin Biorender (<https://biorender.com/>). **Abréviations** : ARNm : acide ribonucléique messager ; C-terminaux : extrémités carboxy-terminales de la TDP-43 ; DLFT : dégénérescences lobaires frontotemporales ; TDP-43 : *Tar DNA-binding protein of 43 kDa*.

- ***Dérégulation de la localisation cellulaire de la TDP-43***

Dans les premiers articles identifiant la TDP-43 chez des patients DLFT et SLA, les neurones sains présentaient surtout de la TDP-43 nucléaire, et les neurones des zones cérébrales pathologiques présentaient des agrégats cytoplasmiques de TDP-43 (75,76). Ces observations ont par la suite été validées dans de nombreuses études (71,129–131).

Des observations suggèrent que la localisation cytoplasmique de cette protéine est un phénomène important dans le développement des protéinopathies à TDP-43. En effet, un lien a été constaté entre la répartition anormale de la TDP-43 entre le noyau et le cytoplasme et des dysfonctionnements cellulaires accompagnés d'une certaine toxicité neuronale, chez le poisson-zèbre, le rat ou certains primates (132–134). De plus, stimuler la macro-autophagie cytoplasmique semblerait augmenter la durée de survie des neurones (135), tandis que l'inhiber induirait la formation d'agrégats de TDP-43, qui sont des structures caractéristiques des DLFT-TDP (136).

La localisation aberrante de la TDP-43 pourrait s'expliquer notamment par un défaut de transport cellulaire de cette protéine (137–139). En effet, dans des cultures de neurones hippocampiques de souris, certaines mutations dans le SLN de la TDP-43 ont entraîné la délocalisation et l'agrégation de la protéine dans le cytoplasme (140,141). Chez des souris transgéniques dont l'expression du SLN était contrôlée par la doxycycline, la perte de TDP-43 nucléaire et les agrégats cytosoliques de cette protéine étaient par ailleurs concomitants à un processus neurodégénératif et à la mort prématurée des animaux. De façon intéressante, ré-exprimer le SLN après les premiers symptômes permettait de retrouver la TDP-43 majoritairement localisée dans le noyau et de freiner la perte neuronale (142). Les transporteurs KNPA semblent en outre spécifiquement subir une diminution de leur expression globale chez les patients DLFT-TDP et SLA. Une déplétion nucléaire de ce transporteur associée à son agrégation cytoplasmique ont également été mises en évidence dans un modèle de drosophile présentant une protéinopathie à TDP-43 (130).

- ***Perturbation des fonctions cellulaires de la TDP-43***

Une des conséquences de la localisation aberrante de la TDP-43 est l'apparition du phénomène dit de « perte de fonction nucléaire ». En effet, une détérioration du métabolisme de nombreux acides nucléiques a été constatée chez des souris présentant des variants pathogènes dans le gène codant pour la TDP-43 (128).

Ces anomalies de métabolisme des ARNm semblent notamment passer par une perturbation des capacités d'épissage de la TDP-43 pathologique (93,143), résultant de son absence au niveau nucléaire, de la perte d'interaction entre la TDP-43 et des composantes du spliceosome et de la diminution de l'affinité de cette protéine pour les acides nucléiques (144–146).

Les anomalies d'épissage alternatif des ARNm par la TDP-43 peuvent se traduire par une diminution de l'expression de protéines, ou à l'inverse par leur surexpression. Ainsi, la TDP-43, qui a la capacité d'autoréguler négativement sa concentration cellulaire via l'épissage alternatif de son propre ARNm, est retrouvée à des niveaux élevés dans le cerveau des patients DLFT-TDP et SLA, en particulier dans le cortex frontal et l'hippocampe (147–149). Dans un modèle murin présentant une mutation du gène de la TDP-43 connue pour être associée à la SLA chez l'homme, l'analyse du cortex cérébral des animaux adultes a révélé une diminution de 80 % de l'excision de l'intron 7 des ARNm (normalement épissé en cas d'auto-rétrocontrôle négatif efficient), aboutissant à une augmentation de 45 % de l'expression de la TDP-43 (150). Cependant, si beaucoup d'études semblent aller dans le sens d'une augmentation de la synthèse de la TDP-43 en conditions pathologiques, ce qui semble par ailleurs être neurotoxique (151), des expériences menées sur des souris transgéniques, synthétisant une TDP-43 sans SLN, ont mis en évidence une baisse de la TDP-43 endogène chez ces animaux, associée à une dégradation de leur moelle épinière (152).

En cas de mutations de la TDP-43, il a également été constaté un phénomène de « gain de fonctionnement » nucléaire pour cette protéine vis-à-vis de certains de ses ARNm cibles, sans vraiment encore comprendre comment ceci s'intègre dans la physiopathologie des DLFT-TDP. L'exon « Exb17 » présent dans le pré-ARNm codant pour la sortiline est par exemple deux fois plus excisé chez des souris synthétisant une TDP-43 mutée en comparaison à des souris sauvages. Pour rappel, l'excision de cet exon permet d'obtenir un récepteur membranaire à la progranuline fonctionnel (150).

De tels gains de fonctionnement ont également été décrit au niveau cytoplasmique, où l'augmentation de la concentration en TDP-43 aurait pour effet d'inhiber plus fortement qu'à l'état physiologique la traduction de certaines protéines, par des interactions renforcées avec les protéines ribosomales (153,154).

- ***Modifications post-traductionnelles cytoplasmiques affectant la TDP-43***

Dans le cytoplasme, la TDP-43 qui n'est pas transférée vers le noyau peut également subir des modifications post-traductionnelles (MPT) anormales (155). Les MPT sont des modifications affectant les protéines après leur synthèse, permettant de moduler la localisation cellulaire et les fonctions des protéines, mais également parfois de faire varier leur demi-vie en favorisant ou en inhibant leur dégradation.

Dans les premières publications d'identification de la TDP-43 dans un contexte de DLFT, il a été décrit une hyperphosphorylation spécifique de la TDP-43 pathologique dans le cortex et la moelle épinière des sujets DLFT-TDP et SLA (75,76).

Ce phénomène a ensuite été mis en évidence dans d'autres études (156). Il a également été observé que certaines mutations pathologiques du gène *TARDBP* peuvent introduire ou retirer des sites de phosphorylation de la protéine, suggérant l'implication de son état de phosphorylation dans la physiopathologie des protéinopathies à TDP-43 (155). Les sites de phosphorylation de la TDP-43 pathologique ont alors été recherchés, notamment par une analyse en spectrométrie de masse de la TDP-43 issue d'agrégats de tissu cérébral humain (157). Des expériences ont également été conduites avec des techniques faisant appel à des anticorps, générés par l'immunisation d'animaux avec des peptides recombinants phosphorylés au niveau des acides aminés d'intérêt (tableau III) (158).

Ces études ont permis de valider cinq sites de phosphorylation de la TDP-43 contenue dans des inclusions pathologiques issues du tissu humain. En effet, la phosphorylation des sérines en position 379, 403, 404, 409 et 410 semble relativement spécifique de la TDP-43 pathologique. Les anticorps détectant la TDP-43 dont les sérines sont phosphorylées à la fois en position 409 et 410 ont permis de mettre en évidence des agrégats cytoplasmiques, sans marquage du noyau des neurones (157,159–161).

Fabricant	Première citation	Nom	Épitope du peptide recombinant	Sérines phosphorylées	Espèce	Clonalité
Sigma-Aldrich	Neumann 2009 (160)	<b>1D3</b>	403-414	409/410	rat	mono
Cosmobio	Hasegawa 2008 (157)	TIP-PTD- <b>P05</b>	398-408	403/404	lapin	poly
		TIP-PTD- <b>P01 &amp; P02</b>	405-414	409/410		
	Inukai 2008 (159)	TIP-PTD- <b>M01</b>	405-414	409/410	souris	mono
Proteintech	Pelletier 2012 (161)	<b>22309-1-AP</b>	inconnu	409/410	lapin	poly

**Tableau III** : Principaux anticorps pour l'étude de la TDP-43 phosphorylée publiés dans la littérature.

Les conséquences fonctionnelles de ces phosphorylations anormales ne sont pas complètement comprises, mais il semblerait qu'elles diminuent la solubilité de la TDP-43 et augmentent sa demi-vie dans les cellules (162). Elles pourraient aussi favoriser l'oligomérisation de la protéine et la formation de fibrilles, aboutissant à son agrégation (157,163). Cependant, ces résultats sont à considérer avec prudence, certaines études ayant conclu que les phosphorylations observées chez la TDP-43 pathologique serait un mécanisme de défense, permettant d'augmenter sa solubilité et de réduire sa toxicité (164,165).

En parallèle du processus de phosphorylation anormale, il semblerait que l'ubiquitination des agrégats de TDP-43 soit une caractéristique-clé des protéinopathies à TDP-43. En modèles cellulaires, les lysines en position 84, 95, 102, 114, 212, 140, 145, 160, 176 181 et 263 ont ainsi été identifiées comme ubiquitinylées (166,167). La lysine ubiquitinylée en position 84 semble par ailleurs perturber le retour de la TDP-43 au noyau (168). Dans le tissu humain, seule l'ubiquitination de la lysine en position 79 est actuellement validée, par une étude en spectrométrie de masse de tissu provenant d'un patient atteint de SLA (163). De même, leur implication physiopathologique nécessite des études supplémentaires. Cependant, la mise en évidence de cette MPT permet d'envisager qu'une altération du SUP soit impliquée dans le défaut de dégradation de la TDP-43 dans les DLFT-TDP.

La TDP-43 pathologique pourrait aussi subir des réactions d'acétylation. En effet, deux de ces MPT ont été identifiées dans une étude, toujours en modèle cellulaire, au niveau des lysines en position 145 et 192, situées respectivement dans le MRA 1 et le MRA 2. Ces modifications semblent altérer la liaison de la TDP-43 aux acides nucléiques, et favoriser la phosphorylation des sérines en position 409 et 410 (169). Dans cette étude, les auteurs ont également réalisé des travaux à partir d'un anticorps spécifiquement dirigé contre la TDP-43 acétylée en position 145. Ils ont ainsi révélé qu'une telle forme de la protéine entre dans la composition des inclusions de TDP-43 situées dans la moelle épinière de patients SLA, mais n'est pas retrouvée au niveau cérébral chez les patients DLFT-TDP. Cette découverte suggère alors que certaines MPT puissent être différentes entre la SLA et les DLFT.

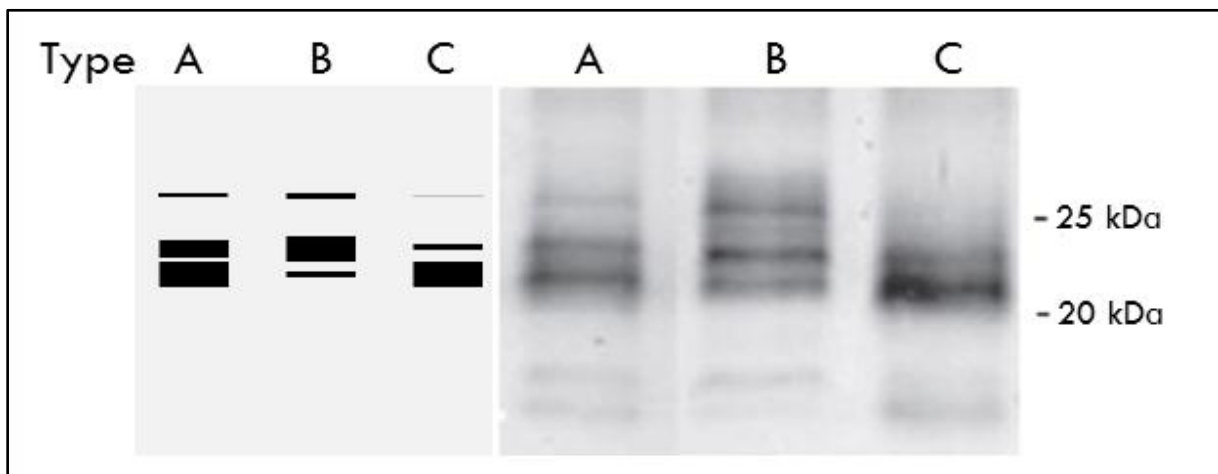
En cas de stress oxydatif, les six cystéines de la TDP-43 pourrait en outre s'oxyder, et former des ponts disulfures entre deux protéines adjacentes, favorisant alors l'agrégation de la protéine. Si ces observations n'ont été validées qu'*in vitro* ou en modèle cellulaire, il a néanmoins été établi que des niveaux plus élevés de TDP-43 pontée sont retrouvés dans le cerveau de patients DLFT comparé à des individus sains (170). Cependant, là encore l'implication précise de cette MPT dans la physiopathologie des protéinopathies à TDP-43 nécessite des recherches supplémentaires pour être intégralement comprise.

- ***Fragmentation de la TDP-43***

Les études portant sur les protéinopathies à TDP-43 ont permis de mettre en évidence des fragments de cette protéine, de masses apparentes comprises entre 25 et 35 kDa (75,76,171). Ces fragments pourraient être carboxy-terminaux, car ils sont détectés par des anticorps dirigés contre cette partie de la TDP-43, et non par des anticorps dirigés contre l'épitope composé des acides aminés 6 à 24 de la protéine (172).

En utilisant un anticorps anti-TDP-43 phosphorylée en position 409/410, la réalisation de WB à partir de protéines extraites du tissu cérébral de patients DLFT a permis de définir le profil de migration de ces fragments. Dans ces conditions, on retrouve classiquement chez les patients atteints de DLFT-TDP trois bandes majoritaires à 23, 24 et 26 kDa, accompagnées de deux bandes minoritaires à 18 et 19 kDa.

Ces cinq bandes, correspondant à des fragments de la TDP-43, sont communs à tous les types de DLFT-TDP. Cependant, l'analyse de l'intensité des trois bandes majoritaires laisse entrevoir quelques différences entre les différents types neuropathologiques (figure 17) (85,131,157,173). Il apparaît ainsi que la bande de 23 kDa est généralement la plus intense chez les patients DLFT-TDP de type A et C. Cette différence serait néanmoins plus marquée dans le type C. Dans ce dernier, la bande de 26 kDa semble aussi être très faible, voire invisible. Dans le type B, la bande de 24 kDa est la plus intense. Enfin, le type E présenterait une bande majoritaire de 26 kDa, reflétant la présence de fragments plus longs que chez les autres types, associée à des bandes de 24 et 23 kDa de faible intensité. Il existe néanmoins une variabilité importante au sein de chaque type de DLFT-TDP, et des chevauchements entre les différents types (160).



**Figure 17** : Profils caractéristiques des fragments carboxy-terminaux de la TDP-43 détectés par un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée en 409/410 de cette protéine, chez les individus atteints de DLFT de type A, B et C. Adapté de Kawakami *et al* (131).

Les mécanismes exacts de production de ces fragments restent inconnus. Une des limites des études reposant sur la génération de fragments de TDP-43 en modèle cellulaire ou animal, est que ceux-ci ne correspondent jamais complètement aux fragments observés en post-mortem au sein du tissu cérébral humain. Il a néanmoins été proposé qu'ils soient la conséquence des perturbations de l'épissage alternatif de pré-ARNm de la TDP-43 (174). Ainsi, dans un modèle murin, l'introduction d'un oligonucléotide anti-sens au niveau de l'intron 6 du gène codant pour la TDP-43, générateur d'ARNm pathologiques, était associée à la présence de fragments cytosoliques insolubles (175).



Ces fragments pourraient également être issus de la lyse incomplète de la TDP-43. Des analyses en spectrométrie de masse de fragments de la protéine dégradée par la trypsine ont permis de proposer plusieurs sites de clivage de son extrémité carboxy-terminale, dont les acides aspartiques en position 219 et 247 (176). Certaines études ont aussi proposé un clivage par les caspases ou les calpaïnes (177,178).

Il existe également des interrogations concernant l'implication de ces fragments dans le processus neurodégénératif. Si leur toxicité et leur place centrale dans la physiopathologie des protéinopathies à TDP-43 semblaient bien établies dans des modèles cellulaires ou animaux depuis la fin des années 2000 (176–179), celles-ci ont récemment été remises en question, notamment car ces fragments sont rarement retrouvés au niveau de la moelle épinière des patients souffrant de SLA (180). Quoiqu'il en soit, ces reliquats de TDP-43, ne présentant plus de SLN, sont donc dans l'incapacité d'être adressés au noyau et pourraient alors s'accumuler dans le cytoplasme, puis s'associer entre eux et recruter de la TDP-43 sous forme totale, participant ainsi à la formation d'agrégats de cette protéine (181,182).

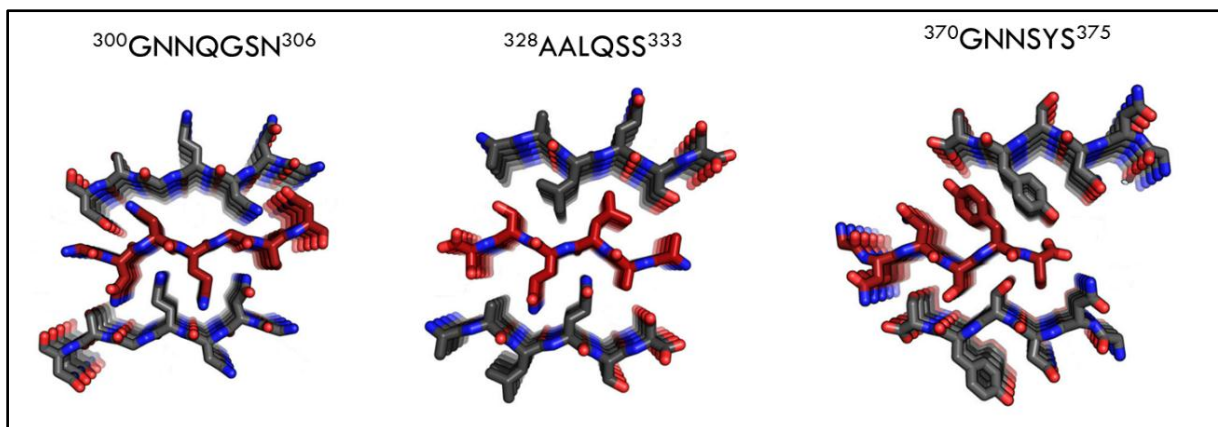
- ***Formation d'agrégats cytoplasmiques de TDP-43***

La présence d'agrégats de TDP-43 dans le cytoplasme des neurones est un marqueur pathognomonique chez les patients atteints de protéinopathies à TDP-43. Ainsi, leur mise en évidence dans différentes régions lors de l'examen neuropathologique du tissu cérébral permet d'obtenir un diagnostic certain (25,26).

La formation de tels agrégats semble être le résultat de plusieurs processus pathologiques. En effet, la fuite et l'accumulation de la TDP-43 au niveau cytoplasmique ainsi que les MPT anormales et la fragmentation qu'elle y subit semble en être des éléments clés (97). De plus, des travaux dans des cultures cellulaires humaines ont lié l'altération des fonctions d'épissage de la TDP-43 à la présence d'isoformes agrégées de la protéine (183). Par ailleurs, l'inhibition du système de macro-autophagie, qui contrôle en partie l'élimination des protéines cytoplasmiques anormales, chez un modèle murin porteur d'une mutation impliquée dans les SLA a abouti à la présence d'agrégats protéiques intraneuronaux de TDP-43, associés à une dénervation rapide (184). L'inhibition pharmacologique du SUP, qui est le second système de contrôle cellulaire de la qualité des protéines, dans des cultures de neurones s'est également accompagnée de la formation d'agrégats de TDP-43 (185).

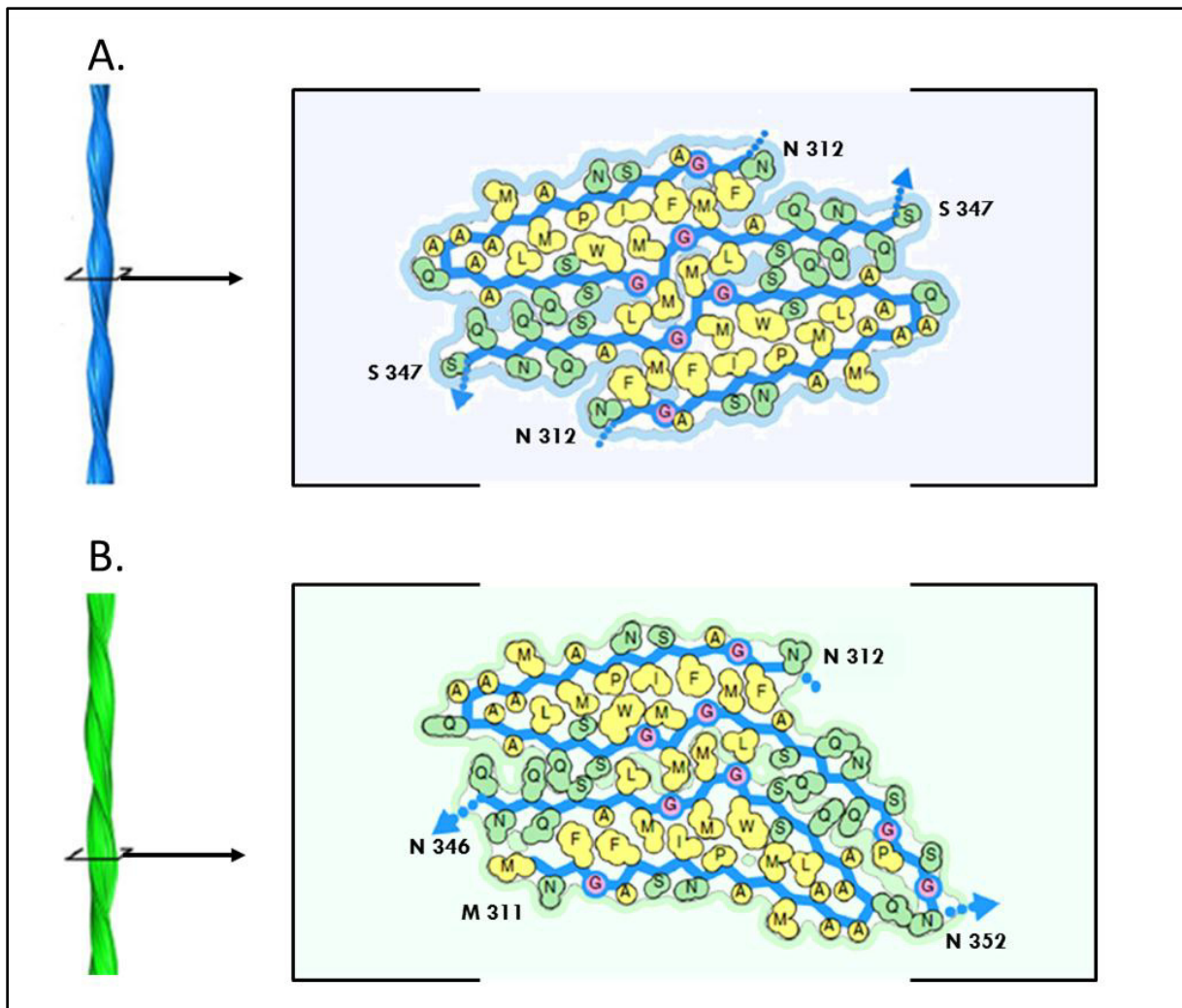
Enfin, la formation d'agrégats de TDP-43, sous ses formes totale ou fragmentées, semble liée aux propriétés de son extrémité carboxy-terminale. En effet, sa délétion dans une étude a permis d'observer une baisse de l'agrégation de la TDP-43 chez des levures (186). Certaines portions de l'extrémité carboxy-terminale de la protéine ont en outre démontré leur capacité à former des fibrilles *in vitro* (187).

D'un point de vue structural, l'analyse en résonance magnétique nucléaire de la partie carboxy-terminale de la TDP-43 a montré que cette région contenait de courts segments conformés en feuillets-beta, connus pour faciliter l'agrégation des protéines (188). D'autres études ont montré que, grâce à leur complémentarité stérique, certains de ces segments pouvaient s'assembler en « fermeture éclair », qui est un motif caractéristique des protéines contenues dans les structures fibrillaires retrouvées dans les DLFT et SLA (figure 18) (189,190).



**Figure 18 :** Exemple de trois segments de la région carboxy-terminale de la *TAR DNA-binding protein of 43 kDa*, qui peuvent s'arranger en « fermeture éclair », grâce à leur conformation en feuillet- $\beta$ , leur offrant une certaine complémentarité stérique. Les séquences sont spécifiées au-dessus de chaque structure. Les feuillets- $\beta$  droits sont représentés en bleu, et ceux repliés en rouge. **Abréviations :** A : alanine ; G : glycine ; L : leucine ; N : asparagine ; Q : glutamine ; S : sérine ; Y : tyrosine. D'après Guenther *et al* (191).

Des études en microscopie électronique ont également montré que la large région du cœur amyloïde avait la propriété d'adopter des conformations, soit « en dague » (résidus 311-360), soit en « R » (résidus 286-331), permettant l'assemblage de TDP-43 adjacentes (figure 19) (192).



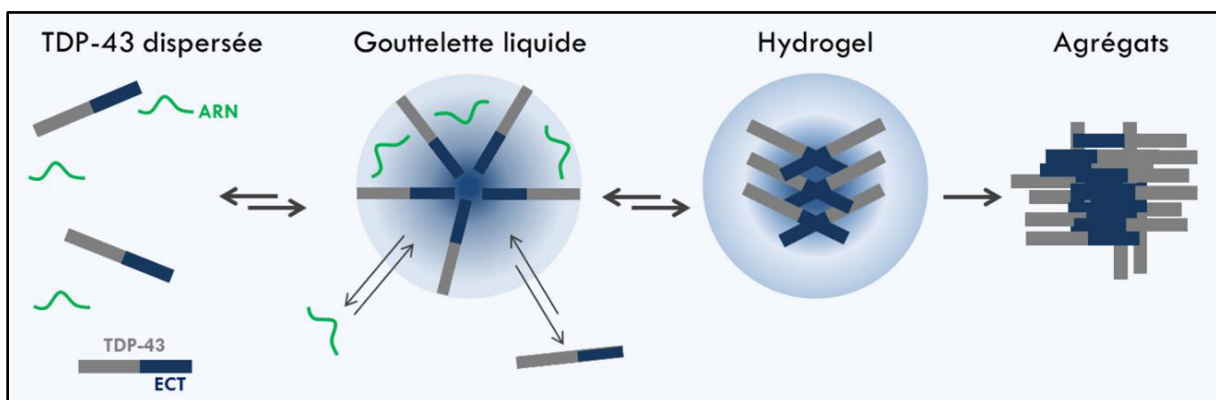
**Figure 19 :** Exemple d'interactions entre les cœurs amyloïdes de deux *TAR DNA-binding protein of 43 kDa* adjacentes, grâce à leurs conformations complémentaires « en dague » dans les structures fibrillaires. (A) Deux segments contenus entre l'asparagine en 312 (N 312) et la sérine en 347 (S 347) peuvent s'associer. (B) Il est également possible qu'un segment compris entre l'asparagine en 312 (N 312) et l'asparagine en 352 (N 352) s'associe au segment situé entre la méthionine en 311 (M 311) et l'asparagine en 346 (N 346). Adapté de Cao *et al* (192).

D'autres études portant sur la région du cœur amyloïde (allant des acides aminés 311 à 360) ont mis en évidence une grande richesse de cette région en acides aminés polaires (glutamine, asparagine, glycine et sérine), qui forment des séquences dont l'analyse en résonance magnétique nucléaire a montré une certaine vulnérabilité aux changements de milieu (température, pH, augmentation de la concentration en protéines totales). Cette vulnérabilité se traduit par des altérations conformationnelles, touchant notamment les structures de type hélices-alpha, associées à la formation d'agrégats de TDP-43 (193,194).

Cette agrégation semble être précédée par un phénomène de séparation de phases liquide-liquide, également médiée par l'extrémité carboxy-terminale de la protéine (195). Ce phénomène correspond à un isolement de la TDP-43 vis-à-vis de son milieu biologique (196,197). Il a par ailleurs été décrit pour d'autres protéines, dans plusieurs maladies neurodégénératives, pour tenter d'expliquer l'agrégation de protéines via leur domaine « prion-like » (71). Des études de mutagenèse ciblée dans des levures ou des cultures d'embryons de rein humains ont permis d'envisager que les régions RID, entourant le cœur amyloïde, soient impliquées dans ce phénomène (99,198,199).

Ainsi, en cas de stress cellulaire oxydatif, ou de forte concentration protéique, plusieurs protéines de TDP-43 dispersées dans un milieu liquide en condition physiologique peuvent former des gouttelettes, appelées « organelles sans membrane ». Néanmoins, au sein de ces structures, la protéine peut encore interagir avec les ARN ou retourner dans le milieu environnant (200).

Si les modifications du milieu perdurent, une structure de type hydrogel peut se former. Une étude a démontré que les acides aminés de la TDP-43 allant de la position 312 à 317 sont essentiellement aromatiques, et peuvent générer les interactions nécessaires au regroupement de plusieurs TDP-43 sous forme d'hydrogel (191). Dans cette structure, la TDP-43 ne peut plus interagir avec les ARN, mais un retour à un état dispersé reste possible (201). Dans le cas contraire, il est finalement possible que des agrégats définitifs se forment (figure 20) (202).



**Figure 20** : Séparation en phase liquide/liquide de la TDP-43 et de son milieu. Dans certaines conditions, des molécules de TDP-43 qui existent physiologiquement sous forme dispersée peuvent s'isoler de leur milieu biologique en formant des gouttelettes liquides, par des interactions entre leurs RR-G. De cette structure, des protéines peuvent sortir et rentrer, et les ARN ont encore des interactions avec la TDP-43. Si le phénomène de séparation s'amplifie, les gouttelettes adoptent une conformation en hydrogel, qui peut conduire à l'agrégation de la TDP-43, qui est le seul phénomène irréversible. **Abréviations** : ARN : acide ribonucléique ; ECT : extrémité carboxy-terminale ; TDP-43 : *Tar DNA-binding protein of 43 kDa*.

L'implication de la région amino-terminale de la TDP-43 dans le processus d'agrégation est moins claire que celle de la région carboxy-terminale. L'analyse par résonance magnétique nucléaire de la structure du MRA 1 a montré que ce segment a la capacité de s'agréger via la formation de feuillets-beta (203). De plus, certaines mutations ou des MPT affectant la séquence du SLN semblent accélérer la transition d'organelles sans membrane aux agrégats (204,205).

Cependant, d'autres études rapportent que l'extrémité amino-terminale de la TDP-43 pourrait plutôt freiner l'agrégation de la protéine. En effet, les oligomères et homodimères physiologiques de TDP-43 formés grâce à cette région s'avèrent résistants au stress cellulaire. De plus, au sein de ces structures, les extrémités carboxy-terminales des TDP-43 sont écartées les unes des autres, diminuant ainsi leur interaction (103,187). Cette caractéristique structurelle différencie ces oligomères des oligomères pathologiques, à la capacité d'agrégation supérieure, décrits chez les patients atteints de DLFT et de SLA (206). Enfin, une étude sur l'assemblage de la TDP-43 en hydrogel a montré que la fixation des KPNA et KPNB sur le SLN de la protéine empêchait le maintien d'une telle structure (201).

Le rôle des agrégats de TDP-43 dans le processus neurodégénératif inhérent aux protéinopathies continue d'être discuté. Ils pourraient exercer une toxicité cellulaire directe (206). L'initiation d'un stress aboutissant à l'apoptose des neurones a ainsi été décrit (207). Cette toxicité pourrait également être indirecte, en interférant avec le transport de la TDP-43 ou d'autres protéines, voire d'acides nucléiques (208). Ce mécanisme passerait par la séquestration de divers facteurs de transport cellulaires, dont des nucléoporines et des karyophérines, mesurées en faible quantité sous forme libre dans des modèles cellulaires ou murins de protéinopathie à TDP-43 (202,209,210). La séquestration des KPNA et des KPNB qui, en plus d'assurer le transport de la TDP-43 du cytosol au noyau, sont des facteurs limitant son agrégation par fixation au niveau de son extrémité amino-terminale, pourrait alors servir de boucle d'amplification à la formation d'agrégats de TDP-43. En effet, le transport altéré de cette protéine semble induire une diminution de son auto-rétrocontrôle nucléaire, donc des concentrations élevées de TDP-43 cytoplasmique qui s'accumule. Cette accumulation favorise alors sa séparation de phases liquide-liquide, donc la formation d'hydrogel puis *in fine* d'agrégats irréversibles, pouvant séquestrer davantage de nucléoporines.

Cependant, une étude menée sur des drosophiles a permis d'envisager ces agrégats comme un mécanisme de défense et de protection des neurones vis-à-vis de protéines pathologiques (211). Quoiqu'il en soit, dans une étude récente faisant appel à des radiotraceurs permettant de mesurer la densité de la microglie, il a été montré que les régions corticales comportant des agrégats protéiques étaient les mêmes que celles soumises à un processus de neuroinflammation chez des patients atteints de DLFT probable ou confirmée par des études neuropathologiques (212).

- ***Formation de granules de stress cytoplasmiques***

Si les agrégats observés en cas de protéinopathie à TDP-43 sont composés majoritairement de TDP-43, il est aussi possible que cette protéine soit retrouvée dans des granules de stress (GDS), qui sont des organelles sans membrane composées de plusieurs protéines. En effet, dans le cadre d'une réponse à un stress oxydant, osmotique, hypoxique ou thermique, une cellule peut déclencher l'agrégation momentanée de différentes protéines, dont la TDP-43 via son domaine « prion-like » (213,214). Ces protéines seront généralement liées à un ARNm cible dans les GDS, car ces structures visent à séquestrer et protéger temporairement des ARNm codant pour des protéines non nécessaires à la cellule pour sa réponse au stress (215). Les GDS peuvent également contenir des protéines de transport entre le cytoplasme et le noyau temporairement non nécessaires, ou des facteurs d'initiation de la traduction de différentes protéines (216).

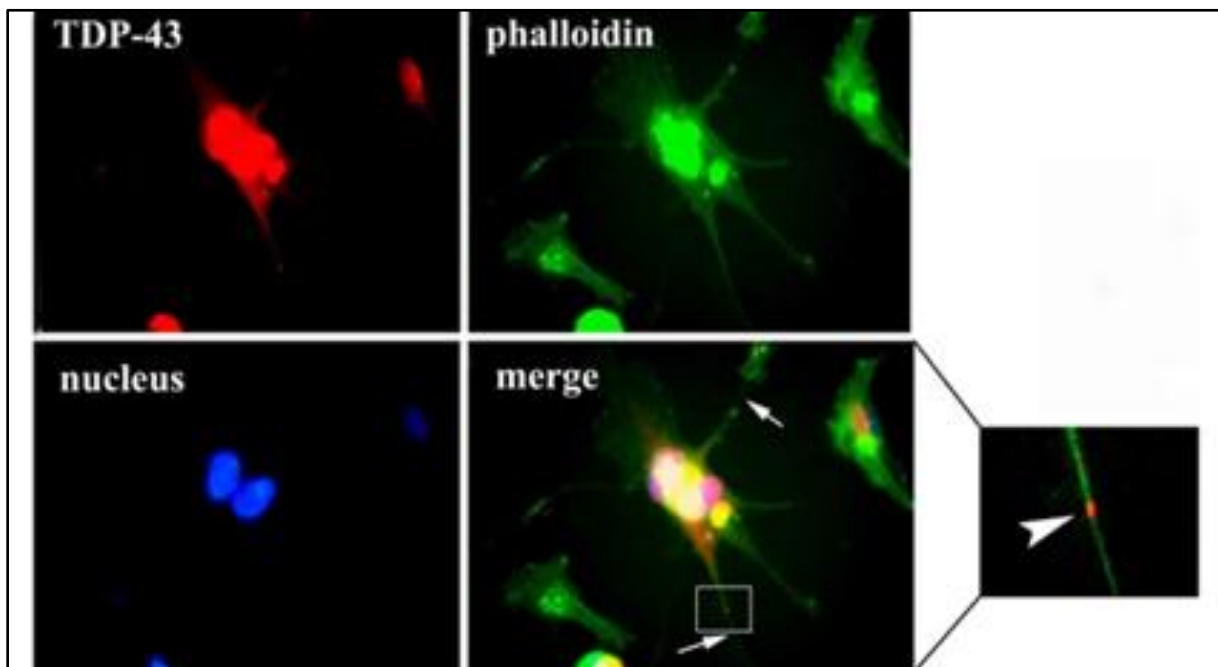
En cas de stress cellulaire trop intense, ou en présence de certaines mutations dans la séquence de la TDP-43, les GDS, initialement protectrices, vont avoir tendance à grossir exagérément pour aboutir à des structures de type hydrogel, notamment par augmentation locale de la concentration protéique. Ces hydrogels serviront alors de précurseur pour des agrégats ribonucléoprotéiques irréversibles.

L'assemblage prolongé de telles structures a démontré une certaine cytotoxicité en culture cellulaire (217). Cependant, cette cytotoxicité semble indépendante de celle générée par l'assemblage d'agrégats purs de TDP-43 (200). Il semblerait alors que ces deux types d'agrégats puissent coexister dans les cellules (71,218).

- **Transmission d'agrégats de TDP-43 de neurone à neurone**

Pour expliquer le caractère progressif de la symptomatologie des protéinopathies à TDP-43, il a été proposé que cette protéine, et notamment sa forme agrégée, puisse être transmise de neurone à neurone. En effet, dans les DFLT et la SLA, la TDP-43 phosphorylée initialement située dans des zones corticales limitées semblent avoir la capacité de diffuser au sein du tissu nerveux de manière centrifuge, le long des fibres axonales. Cette protéine peut ainsi être utilisée comme marqueur cérébral de la propagation de la maladie chez les patients (219). Cependant, les quatre stades neuropathologiques définis selon l'examen du tissu cérébral post-mortem pour la SLA et les DLFT-TDP ne sont pas réellement corrélés aux symptômes cliniques (220).

Cette transmission des agrégats pourrait passer par leur relargage par les cellules dans l'espace interstitiel. En culture cellulaire, un mécanisme d'exocytose et un système d'excrétion de la TDP-43 pathologique via des vésicules extracellulaires ont été mis en évidence, qu'elle soit sous forme monomérique ou oligomérique (221,222). Ces deux phénomènes semblent être complétés par un système de nanotubes reliant les neurones (figure 21) (223).



**Figure 21** : Transmission des agrégats de TDP-43 par des nanotubes dans un modèle cellulaire, révélée en microscopie à fluorescence. Ces agrégats (**en rouge**), le noyau des neurones (**en bleu**) et les structures de type nanotube (**en vert**) sont repérés grâce à des marquages immunofluorescents. Le fondu (**merge**) de tous les marquages permet de mettre en évidence que les nanotubes relient plusieurs neurones entre eux (**flèches blanches**). Sur la droite de la figure, un élargissement permet d'observer de la TDP-43 agrégée dans les nanotubes (**tête de flèche blanche**). **Abréviations** : TDP-43 : *TAR DNA-binding protein of 43 kDa*. D'après Ding *et al* (223).

Chez l'animal, seuls les deux premiers phénomènes de transmission de la TDP-43 de neurones à neurones ont été décrits (222,224). L'expulsion des formes agrégées de la TDP-43 vers le milieu interstitiel pourrait être une mesure de défense cellulaire, visant à limiter l'exposition des neurones aux protéines pathologiques. En effet, dans un modèle murin de protéinopathie à TDP-43, une diminution provoquée du mécanisme de sécrétion extraneuronale vésiculaire a conduit à des atteintes motrices et comportementales précoces chez les animaux (222). Cependant, une fois libéré dans le milieu interstitiel, de tels agrégats peuvent être internalisés par les cellules voisines, notamment lorsqu'ils sont contenus dans des vésicules d'excrétion (221).

- **« Contamination » de la TDP-43 physiologique**

Après avoir pénétré dans une cellule saine, les TDP-43 pathologiques pourraient transmettre leurs anomalies de conformation à de nouvelles protéines, initiant ainsi la formation de nouvelles inclusions. Il a en effet été montré qu'une protéinopathie a pu être induite chez des souris ayant subi une injection intracérébrale de TDP-43, extraite d'agrégats cérébraux d'un patient atteint de DLFT-TDP. Après l'injection, des agrégats cytoplasmiques de TDP-43 ont été observés chez les animaux, en association avec un déficit nucléaire en TDP-43 (225). Par ailleurs, les agrégats de TDP-43 sont également relativement résistants aux protéases et à la chaleur. Ces trois propriétés permettent d'attribuer à la TDP-43 un caractère dit « prion-like » (226). Pour rappel, l'extrémité carboxy-terminale de la protéine présente une homologie de séquence avec la protéine Prion, impliquée dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Cette protéine a été la première décrite comme ayant la capacité de transmettre sa conformation anormale à des protéines correctement conformées (227).

Pour expliquer la grande variabilité phénotypique rencontrée au sein des DLFT-TDP (tableau I), l'hypothèse de différentes conformations pathologiques de cette protéine a été émise. Chacune pourrait alors présenter des propriétés physiques et biochimiques différentes, influençant la propagation et la toxicité de la TDP-43 (131,228). À titre d'exemple, l'action de la trypsine et de la chymotrypsine sur la TDP-43 extraite du tissu cérébral de différents patients a révélé des sensibilités variables face à ces traitements, que ce soit entre les types de DLFT-TDP, ou entre des sujets DLFT-TDP et SLA (229).



Dans une autre étude, de la TDP-43 pathologique cérébrale issue d'agrégats de type A, B ou C a été déposée dans une lignée cellulaire exprimant de la TDP-43 native. Chaque échantillon cellulaire était en contact avec un seul type de TDP-43 pathologique. Après quelques jours, les cultures ont été lysées. Une analyse en WB des lysats cellulaires a alors été réalisée, avec un anticorps anti-TDP-43 phosphorylée en position 409/410. Les profils de migration des fragments carboxy-terminaux de la TDP-43 se sont révélés différents entre les échantillons. En revanche, ils étaient similaires au profil de migration de la TDP-43 pathologique avec laquelle ils avaient été mis en contact (226).

Mieux comprendre la transmission des différentes conformations pathologiques de la TDP-43 facilitera le développement de modèles cellulaires ou animaux se rapprochant le plus possible du métabolisme physiologique et/ou pathologique de cette protéine. Ceci pourrait alors permettre l'émergence de thérapeutiques ciblées pour la prise en charge des DLFT. Cependant, si l'on estime que la TDP-43 est impliquée dans presque la moitié des cas de ces pathologies, les analyses immunohistologiques post-mortem pratiquées sur les patients atteints de DLFT ont aussi révélé la présence d'autres protéines dans des inclusions cérébrales localisées au niveau du cortex frontal ou et temporal (43).

## **2.2. Autres protéines impliquées dans les DLFT**

La composition des agrégats cérébraux permet de classer la plupart des patients atteints de DLFT en trois ou quatre groupes. Les groupes des patients DLFT-Tau et DLFT-TDP sont largement majoritaires, représentant respectivement 40 % et 50 % des cas totaux de DLFT (43,79). Un troisième groupe, de moindre effectif, se compose de patients caractérisés par des agrégats cérébraux de protéines pouvant lier les ARN n'étant pas la TDP-43, dont les principaux représentants sont la protéine *Fused in Sarcoma*, la protéine *Ewing Sarcoma*, et le *TATA binding associated factor 15*. Ainsi, ce groupe est trouvé dans la littérature sous le terme de DLFT-FET (230).

Un dernier sous-type de DLFT, nommé « DLFT avec des inclusions positives à des marqueurs du SUP » (DLFT-UPS, pour *ubiquitin-proteasome system markers*) regroupe des patients au sein de familles danoise et belge ne présentant pas d'inclusions de protéines Tau, TDP-43 ou FET, mais des inclusions composées de la protéine sequestosome 1 (p62), qui se lie à l'ubiquitine et intervient dans le SUP (231).

### 2.2.1 Protéine Tau

La protéine Tau, retrouvée essentiellement dans les axones des neurones et dans les cellules gliales, appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (MTU) (232). Elle a pour fonction de former ces MTU, en favorisant la polymérisation des unités de tubuline et en inhibant leur dépolymérisation (233). Les MTU étant des éléments majeurs du cytosquelette des neurones, la protéine Tau permet alors indirectement de stabiliser les axones, et plus généralement de maintenir une structure cellulaire correcte.

Un autre de ses grands rôles est d'assurer le bon fonctionnement du transport axonal rétrograde et antérograde (234). On lui trouve également dans la littérature des fonctions nucléaires, comme la protection des acides nucléiques en cas de stress cellulaire et une implication dans la régulation de l'activité des synapses (235,236).

La protéine Tau a été identifiée comme étant impliquée dans les DLFT vingt ans avant la TDP-43 (69). Avant cela, elle fut également une des premières protéines observées dans ces pathologies. En effet, en 1911, Aloïs Alzheimer, qui travaillait alors à mieux définir la MA sur le plan neuropathologique, publia les résultats d'examen du tissu cérébral de patients présentant des troubles du langage ou du comportement. Macroscopiquement, il décrivit chez ces patients une atrophie localisée au niveau des lobes frontaux et temporaux. À l'examen histologique, il ne retrouva chez ces sujets ni accumulation de plaques extraneuronales, ni enchevêtrements fibrillaires intraneuronaux typiques de la MA, mais des neurones ballonnés, dont le cytoplasme renfermait des granulations compactes, rondes et argyrophiles. En 1926, ces neurones furent baptisés « cellules de Pick », et les granulations qu'ils contenaient « corps de Pick », en référence aux travaux préalables d'Arnold Pick (22). En effet, ce scientifique, neurologue et psychiatre, avait déjà décrit dans des rapports de cas parus entre 1892 et 1906, une atrophie limitée aux lobes frontaux et temporaux chez cinq patients présentant une aphasie, associée chez certains à des signes de déclin intellectuel ou à des troubles comportementaux (237). Arnold Pick a ainsi été le premier à énoncer le concept de troubles cognitifs liés à des lésions localisées dans des zones spécifiques du cerveau.

Le terme de maladie de Pick (MPi) est apparu pour la première fois en 1926, à la suite de la description de cinq nouveaux cas d'atrophies frontotemporales bilatérales. Si cette dénomination était à l'époque synonyme de DLFT, les définitions histologique et clinique de ces deux entités évoluèrent ensuite, au gré des progrès effectués dans la compréhension des mécanismes neurodégénératifs. Fait amusant, en 1991 une réévaluation des travaux initiaux de Pick a mis en évidence que parmi les patients autopsiés, deux souffraient en fait de MA et qu'un troisième avait subi un accident vasculaire cérébral (237).

Les années 1990 furent aussi la période durant laquelle émergea le concept de "tauopathies", regroupant des maladies neurodégénératives dans lesquelles la protéine Tau est impliquée. On y retrouve la MA, bien que celle-ci soit considérée comme une tauopathie secondaire, car d'autres protéines jouent un rôle dans sa physiopathologie. Le groupe des tauopathies dites primaires, dans lesquelles la protéine Tau est la protéine centrale du processus neurodégénératif, est constitué principalement de la MPi (environ 30 % des cas) des SCB (environ 35 % des cas) et de la PSP (environ 30 % des cas) (81).

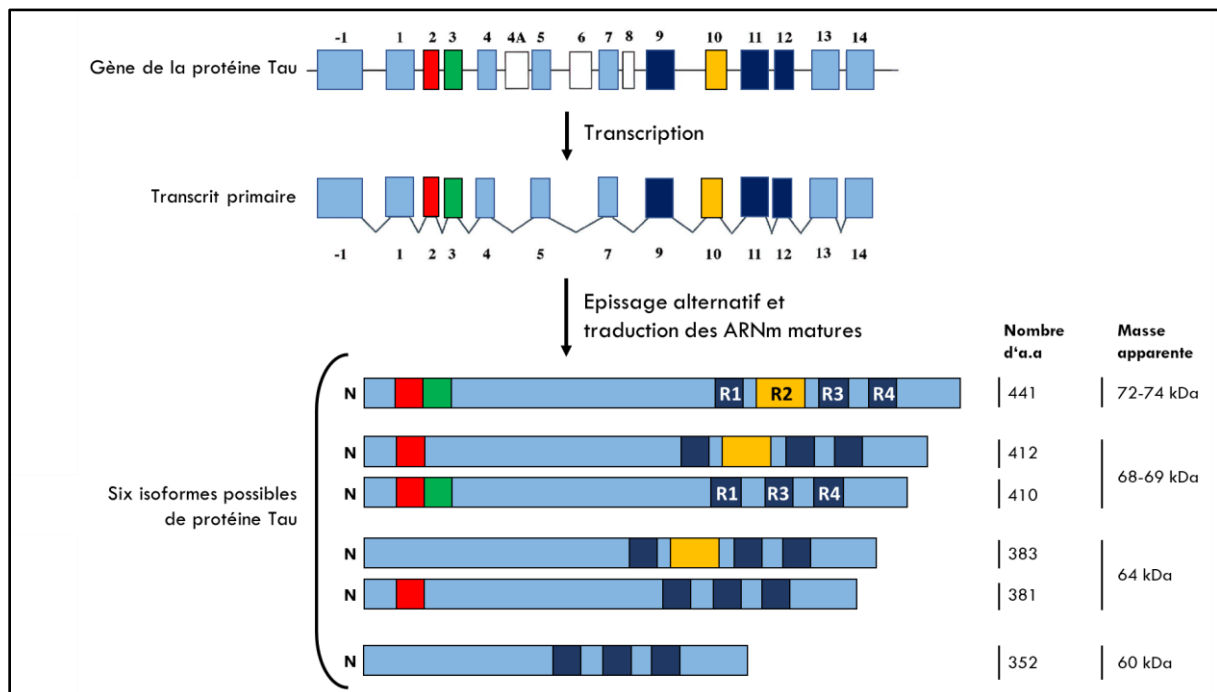
Ces trois tauopathies primaires sont souvent regroupées sous le terme de DLFT-Tau dans la littérature. Les tauopathies primaires comprennent également des maladies plus rares, comme les tauopathies sporadiques multisystémiques et les maladies à grains argyrophiles (171).

Physiologiquement parlant, les tauopathies primaires se distinguent les unes des autres par la localisation cellulaire et la distribution cérébrale des agrégats de Tau (65). Certaines peuvent également se distinguer par les différentes isoformes de la protéine Tau prédominant dans les agrégats (tableau IV). Ces isoformes sont obtenues grâce à l'épissage alternatif d'un pré-ARNm unique, lui-même transcrit à partir du gène *Microtubule associated protein Tau (MAPT)* situé sur le bras long du chromosome 17 et composé de seize exons.

Les isoformes de la protéine Tau ont, par définition, des séquences en acides aminés proches, mais diffèrent par deux aspects : tout d'abord au niveau de leurs extrémités amino-terminales, appelées domaines de projection, les séquences codées par les exons 2 et 3 peuvent être présentes ou non. Ensuite, du côté carboxy-terminal, appelé domaine d'assemblage, le nombre de domaines d'attachement aux MTU peut être de trois, codés par les exons 9, 11 et 12, ou de quatre, codés par les exons 9, 10, 11 et 12.

Ces domaines d'attachement aux MTU, d'une trentaine d'acides aminés chacun, sont composés des motifs répétés et sont donc désignés par la lettre "R" dans la littérature. Au niveau cérébral, il existe ainsi chez l'être humain six isoformes de Tau, dont trois de Tau 3R et trois de Tau 4R (figure 22) (238) .

Chaque isoforme est exprimée différemment au cours du développement cérébral. Si chez le fœtus, seule l'isoforme 3R la plus courte est exprimée, chez l'adulte, on retrouve autant de Tau 3R que de Tau 4R. Dans les tauopathies primaires, il existe un déséquilibre de production des différentes isoformes, modifiant le ratio Tau 3R/Tau 4R (tableau IV) (238). On peut noter que puisque la TDP-43 est impliquée dans l'épissage alternatif du pré-ARNm de la protéine Tau, et favorise l'inclusion de l'exon 10, un changement dans l'expression de cette protéine pourrait avoir un impact sur le ratio 3R/4R de la protéine Tau, par augmentation de la synthèse de Tau 4R. L'influence des protéinopathies à TDP-43 sur les tauopathies n'est cependant pas encore complètement compris (239).

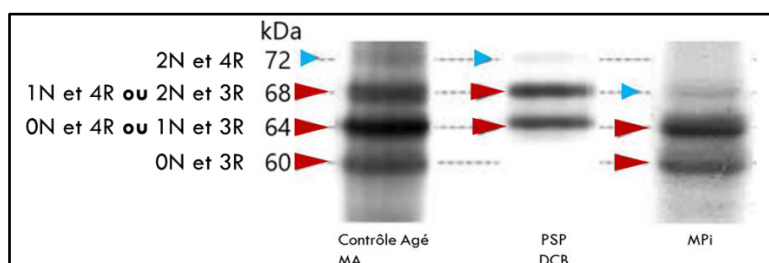


**Figure 22** : Représentation de la transcription, de l'épissage alternatif puis de la traduction des six isoformes cérébrales de la protéine Tau humaine. Certains exons sont systématiquement transcrits et traduits (**bleu clair et bleu foncé**). Parmi ceux-ci, on retrouve les exons 9, 11 et 12, codant pour trois domaines d'attachement de la Tau aux MTU (**bleu foncé**). Les exons 2 (**rouge**), 3 (**vert**) et 10 (**jaune, codant pour un quatrième domaine d'attachement aux MTU**) sont transcrits mais sont parfois épissés. Les exons 4A, 6 et 8 ne sont pas transcrits au niveau cérébral. **Abréviations** : a.a : acides aminés ; ARNm : acide ribonucléique messager ; MTU : microtubules ; N : extrémité amino-terminale ; R : domaine répétés d'attachement aux MTU ; protéine Tau : protéine *Tubule associated unit*.

Tauopathies primaires	Isoformes majoritaires	Distribution cellulaire	Distribution cérébrale
PSP	4R	<b>Inclusions neuronales :</b> neurones ballonnés possibles <b>Inclusions astrocytaires :</b> astrocytes en touffes	<b>Cortex :</b> préfrontal, temporal inférieur, moteur primaire <b>Régions sous-corticales :</b> ganglions de la base, hippocampe et amygdale <b>Tronc cérébral et cervelet</b>
DCB	4R	<b>Inclusions neuronales</b> <b>Inclusions astrocytaires :</b> plaques astrocytaires en couronne	<b>Cortex</b> <b>Régions sous-corticales :</b> ganglions de la base, hippocampe et amygdale
MPi	3R	<b>Inclusions neuronales :</b> neurones ballonnés possibles	<b>Cortex :</b> couches II à IV <b>Régions sous-corticales :</b> gyrus denté et hippocampe

**Tableau IV :** Comparaison des anomalies de la protéine tau entre les principales tauopathies primaires par analyse immunohistochimique du tissu cérébral. **Abréviations :** DCB : dégénérescence corticobasale ; MPi : maladie de Pick ; PSP : paralysie supranucléaire progressive.

Les anomalies dans la proportion des isoformes de la protéine Tau dans les DLFT-Tau, mises en évidence au niveau du tissu cérébral par les études immunohistochimiques, sont également observables sur les profils moléculaires réalisés par WB à partir de protéines extraites de ce tissu. Les individus sains ou atteints de MA présentent ainsi trois bandes majeures de 60, 64 et 68 kDa et une bande moins intense de 72 kDa. Les profils des pathologies 4R, comme les SCB ou la PSP, montrent deux bandes majeures de 64 et 68 kDa, la bande de 72 kDa étant mineure et inconstante. Enfin, dans la MPi, les bandes de 60 et 64 kDa sont les plus intenses (figure 23) (240).



**Figure 23 :** Bandes obtenues par Western Blot, réalisés à partir d'homogénats de cerveau humain d'un sujet contrôle âgé et de patients atteints de maladie d'Alzheimer (MA), de dégénérescence corticobasale (DCB), de paralysie supranucléaire progressive (PSP) et de maladie de Pick (MPi). Les profils électrophorétiques dépendent des isoformes majoritairement présents au niveau cérébral, les flèches rouges indiquant les bandes majoritaires et les bleues les bandes minoritaires. Adapté de Sergeant *et al* (240).

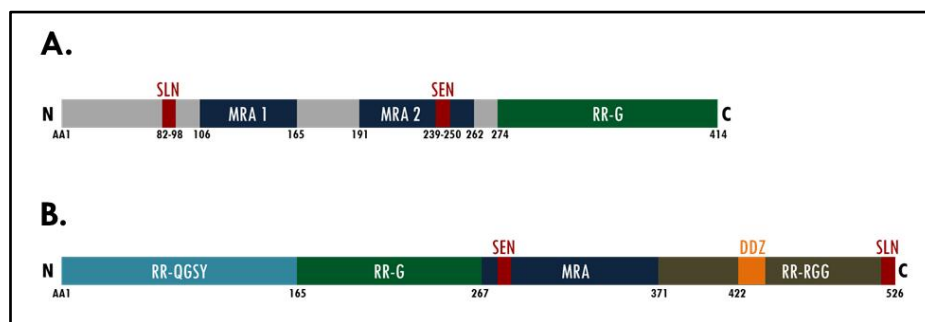
L'étude de la composition des agrégats cérébraux des protéinopathies primaires a permis de mettre en évidence une hyperphosphorylation de la protéine Tau pathologique (241). Ce changement dans son métabolisme, associé à d'autres MPT, telles que la glycosylation ou l'acétylation, auraient pour conséquence une diminution de l'affinité de la protéine Tau pour les MTU, impliquant une déstabilisation de ces structures et *in fine* la perte de leur fonction de soutien et de transport (242). Les MPT anormales subies par la protéine pourraient également favoriser la formation d'agrégats de protéine Tau, notamment par une baisse de sa solubilité. Ces structures pourraient alors séquestrer des formes normales de la protéine Tau ou éventuellement d'autres protéines associées aux MTU (243). Cette agrégation pourrait en outre être facilitée par la génération de peptides insolubles par action d'enzymes comme les caspases, les calpaïnes ou les aminopeptidases (244). La conjonction de la perte de fonctions des MTU et de la formation d'agrégats de protéine Tau pourrait finalement engendrer une dégénérescence neurofibrillaire, conduisant à la mort neuronale (245).

### **2.2.2 Protéines nucléaires liant les ARN**

Les protéines *Fused in Sarcoma* (FUS), *Ewing Sarcoma* (EWS) et le *TATA-binding protein-associated factor 15* (TAF 15) sont des protéines nucléaires pouvant lier les ARN, retrouvées dans des inclusions cérébrales, chez des patients atteints de DLFT pour lesquelles ni la TDP-43 ni la Tau n'ont pu être mises en évidence.

En 2009, la protéine FUS, parfois appelée FUS/TL pour *Fused in sarcoma/translocated in liposarcoma*, a été la première à être identifiée dans ce contexte (246). Les DLFT caractérisées par de telles inclusions ont alors été regroupées sous le terme de DLFT-FUS. En 2011, il a été montré que les protéines EWS et TAF 15 étaient également systématiquement présentes dans les agrégats cérébraux des patients autopsiés atteints de DLFT-FUS. Ces dernières ont subséquemment été renommées DLFT-FET (247). La présence des protéines EWS et TAF 15 au sein des agrégats de protéine FUS n'est pas retrouvée chez les patients souffrant de SLA (146).

La protéine FUS est une ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire, comme la TDP-43. Ces deux protéines présentent par ailleurs des similitudes dans leurs structures. En effet, la protéine FUS possède un domaine amino-terminal riche en glutamine, glycine, sérine et tyrosine, suivi d'une région riche en glycine. Elle présente également un SEN inclus dans une région MRA très conservée. Son extrémité carboxy-terminale est composée d'un SLN, précédé d'une région comportant des motifs arginine-glycine-glycine répétés, lui permettant une conformation locale en doigt de zinc (figure 24) (248).



**Figure 24 :** Comparaison de la structure des protéines (A) TDP-43 et (B) FUS. **Abbréviations :** AA : acide aminé ; C : extrémité carboxy-terminale ; DDZ : domaine structuré en doigt de zinc ; FUS : protéine *Fused in sarcoma* ; MRA : motifs de reconnaissance des acides nucléiques ; N : extrémité amino-terminale ; RR-G: région riche en glycine ; RR-QGSY : région riche en glutamine, glycine, sérine et tyrosine ; RR-RGG: région riche en motifs arginine-glycine-glycine ; SEN : signal d'exportation nucléaire ; SLN: signal de localisation nucléaire, TDP-43 : *TAR DNA-binding protein of 43 kDa*.

La protéine FUS est impliquée dans la réparation de l'ADN, et dans diverses fonctions similaires à la TDP-43, comme l'épissage alternatif de certains ARNm et leur transport du noyau au cytoplasme, ainsi que dans la transcription de protéines au niveau cytoplasmique par interaction avec les protéines ribosomales (70).

Toujours comme pour la TDP-43, il a été démontré que la protéine FUS peut subir des MPT anormales de type phosphorylation et ubiquitination, en cas de DLFT ou de SLA. Il semblerait également qu'elle soit hypométhylée spécifiquement dans les DLFT (249). Enfin, elle entrerait également dans la composition des GDS (250).

En revanche, à l'inverse de la TDP-43, aucune mutation de la protéine FUS n'a pour l'instant été identifiées par l'étude de relativement grandes cohortes de sujets atteints de DFLT-FET (251). Des mutations isolées chez certains patients ont toutefois été rapportées (252,253). Ces études génétiques étaient motivées par le fait que la découverte de variants à forte pénétrance pathologique pour les protéines TDP-43 et Tau, a permis de développer des outils pour renforcer les arguments basés sur l'examen clinique des patients lors du diagnostic d'une DLFT.

### **3. Outils complémentaires à la clinique pour le diagnostic des DLFT**

Le diagnostic des DLFT repose en premier lieu sur l'examen clinique, l'imagerie cérébrale et l'évaluation neuropsychologique des patients. Cependant, ces pathologies peuvent présenter un recouvrement symptomatologique avec d'autres affections, dont les maladies psychiatriques primaires (MPP) (254). Il a été estimé dans une étude que 50 % des patients bvFTD seraient initialement diagnostiqués à tort comme souffrant de dépression, de schizophrénie ou de troubles bipolaires (255). Une confusion est également possible avec la MA, pour laquelle des patients présentent parfois de manière atypique une atteinte comportementale ou des troubles du langage au premier plan (256). Ainsi, 10 à 30 % des patients ayant des symptômes cliniques compatibles avec une DLFT se révéleraient finalement atteints de MA à l'autopsie (22). Ainsi, le délai entre les premiers symptômes et la réalisation d'un diagnostic de DLFT dans un centre de référence est en moyenne de plus d'un an et dure parfois plusieurs années (220). Ces erreurs diagnostiques peuvent conduire à une prise en charge thérapeutique inadaptée des patients. A titre d'exemple, les inhibiteurs d'acétylcholinestérase et la mémantine, qui possèdent une autorisation de mise sur le marché dans le traitement symptomatique de la MA, pourraient aggraver les troubles des patients atteints de DLFT (257,258). Les erreurs de diagnostic pourraient également poser des difficultés pour l'inclusion de sujets dans des essais cliniques, et rendre difficile l'interprétation des résultats de ces essais, concernant notamment l'efficacité de potentiels médicaments (259).

Pour renforcer le diagnostic ante-mortem des DLFT, certains outils ont été développés et validés. Depuis 2011, les recommandations établies par des associations d'experts incluent ainsi certaines techniques d'imagerie médicale et la recherche de mutations génétiques dans les critères de diagnostic, pour en permettre une hiérarchisation plus fine (25,26). Le diagnostic du variant comportemental est ainsi qualifié de « possible » lorsque trois des six critères cliniques d'atteinte du comportement cités précédemment sont observés. Il devient « probable » par ajout d'une preuve à l'imagerie médicale et « certain » en cas de preuve histopathologique par autopsie cérébrale ou de mise en évidence de variants génétiques connus pour être impliqués dans les DLFT. Sur le même modèle, le diagnostic des APP est « possible » après examen clinique ou « confirmé par l'imagerie ». Dans ces deux cas de figures, il reste un diagnostic de présomption. Pour avoir un diagnostic « défini », il faudra là encore une preuve histopathologique ou génétique.



### 3.1. Recherche de variants moléculaires pathogènes

Au sein des maladies neurodégénératives, les DLFT présentent des caractéristiques génétiques particulières :

D'une part, le nombre de cas liés à une étiologie génétique est très élevé dans ce groupe de maladies. En effet, une histoire familiale serait présente dans environ 40 % des cas (260). Cela se traduit pour les patients par l'existence d'au moins un membre de leur famille au premier degré atteint de DLFT, de SLA ou de maladie de Parkinson. Des variants pathogènes sont également mis en évidence chez 7 % des patients sans histoire familiale et présentant des signes d'atteinte comportementale isolée, et chez 14 % des patients sans histoire familiale associant une atteinte comportementale et motrice (261).

D'autre part, si des mutations pathologiques dans les gènes *MAPT*, codant pour la protéine Tau, et *TARDBP*, codant pour la TDP-43, ont été décrites, il existe également chez les patients atteints de DLFT des mutations dans des gènes codant pour des protéines n'étant pas retrouvées dans les inclusions cérébrales. La fréquence de telles mutations est par ailleurs parfois beaucoup plus élevée que celles affectant le gène *TARDBP* (tableaux V et VI). Les trois gènes *MAPT*, *Progranulin (GRN)* et *Chromosome 9 open reading frame 72 (C9ORF72)* seraient ainsi retrouvés dans près de 20 % de tous les cas de DLFT, et dans plus de 60 % des cas de DLFT génétiques (262). La pénétrance élevée des mutations pour ces trois gènes en fait des outils de diagnostic de premier plan (25,26).

De plus, le fait que des variants pathogènes du gène *C9ORF72* soient communs à la SLA et aux DLFT renforcent l'idée d'un continuum physiopathologique entre ces pathologies (tableau V). En revanche, la fréquence beaucoup plus importante de mutations dans le gène *FUS* chez les patients atteints de SLA, comparé aux sujets atteints de DLFT, souligne la complexité de ces deux maladies (tableau VII).

Gène impliqué	Mutations pathogènes	Mode de transmission	Protéine codée	Protéinopathie associée	Mécanismes physiopathologiques	Fréquence dans les DLFT	Autres pathologies
<b>MAPT</b>	<b>Nombre :</b> 44 (275) Région carboxy-terminale ++ <b>Effet décrit :</b> Perturbation de l'épissage alternatif du pré-ARNm	<b>Autosomique dominant</b> <b>Pénétrance :</b> +/- 100 % rares porteurs sains (273)	<b>Tau</b> <b>Fonction(s) :</b> Protéine associée au cytosquelette	<b>DLFT-Tau</b> ↗ 3R : MPi clinique hétérogène mais souvent avant 55 ans si sujet muté (261)	<b>Tau pathologique :</b> (264) - Déstabilisation et perte de fonction des MTU - ↗ capacité d'agrégation	<b>Formes familiales :</b> 5-20 % <b>Formes sporadiques :</b> rares	↗ 4R : PSP SCB  Pathologies très rarement génétiques (43)
<b>GRN</b>	<b>Nombre :</b> 79 (276) <b>Effet décrit :</b> ↘ 50 % expression de la programuline Souvent à cause de codons-stop prématurés dans l'ARNm	<b>Autosomique dominant</b> <b>Pénétrance :</b> - 50 % à 60 ans - 90 % à 70 ans (274)	<b>Programuline</b> <b>Fonction(s) :</b> - Précurseur des Granulines - Facteur de croissance neuronale	<b>DLFT-TDP :</b> type A  Pas d'agrégats de programuline	<b>Lien avec agrégation de TDP-43 :</b> peu clair (265) <b>Haploinsuffisance programuline :</b> Perte de fonctions, et défaut du SUP et de l'AP (108,266,267)	<b>Formes familiales :</b> 25 % <b>Formes sporadiques :</b> 1-5 %	
<b>C9ORF72</b>	Amplification d'une expansion G4C2 - Sains : 20 répétitions maximum - Mutés : 100 à plusieurs milliers de répétitions <b>Effet décrit :</b> Synthèse de protéines pathologiques, issues de la traduction des expansions par un mécanisme non conventionnel (expansions dans une région non codante)	<b>Autosomique dominant</b> <b>Pénétrance :</b> +/- 100 % rares porteurs sains (260)	<b>Protéines pathologiques :</b> formées de dipeptides répétés - Issues du brin sens : poly-GA, poly-GP, poly-GR - Issues du brin anti-sens : poly-GP, poly-PA, poly-PR	<b>DLFT-TDP :</b> type B (272) <b>Protéines pathologiques agrégées :</b> Cervelet Hippocampe <b>Protéine p62 agrégée :</b> (263) Dans les mêmes aires cérébrales que la TDP-43	<b>Lien avec agrégation de TDP-43 :</b> peu clair (268) <b>Protéines pathologiques :</b> - Modèle cellulaire et animal : neurotoxiques (269,270) - Chez l'homme : peu clair, mais des sujets peuvent n'avoir des inclusions que de ces protéines, (271) De plus l'AP pourrait être perturbée (260)	<b>Formes familiales :</b> 30 % <b>Formes sporadiques :</b> 5 % <b>SLA-DLFT :</b> 50 % <b>Autres :</b> (263) < 1 % des MA et des DCB	<b>SLA familiales :</b> 30 % <b>mutations les plus fréquentes dans les SLA familiales</b> <b>SLA sporadiques :</b> 5 % <b>SLA-DLFT :</b> 50 % <b>Autres :</b> (263) < 1 % des MA et des DCB

**Tableau V :** Les trois principales mutations mises en évidence dans les DLFT. **Abréviations :** AP : autophagie via les lysosomes ; ARNm : acide ribonucléique messenger ; *C9ORF72* : gène *Chromosome 9 open reading frame 72* ; DFLT-TDP et DLFT-Tau : dégénérescence lobaire frontotemporale associée à des agrégats cérébraux de *TAR DNA-binding protein of 43 kDa* ou de protéine *tubule associated unit* ; G4C2 : hexanucléotide de 4 guanines et 2 cytosines ; GA : glycine et alanine ; GP : glycine et proline ; GR : glycine et arginine ; *GRN* : gène *Programulin* ; MA : maladie d'Alzheimer ; *MAPT* : gène *microtubule associated protein Tau* ; MPi : maladie de Pick ; MTU : microtubules ; p62 : protéine sequestosome 1 ; PA : proline et alanine ; PR : proline et arginine ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; R : motif répétés de la protéine Tau ; SCB : syndrome corticobasal ; SLA : sclérose latérale amyotrophique ; SUP : système ubiquitine-protéasome.

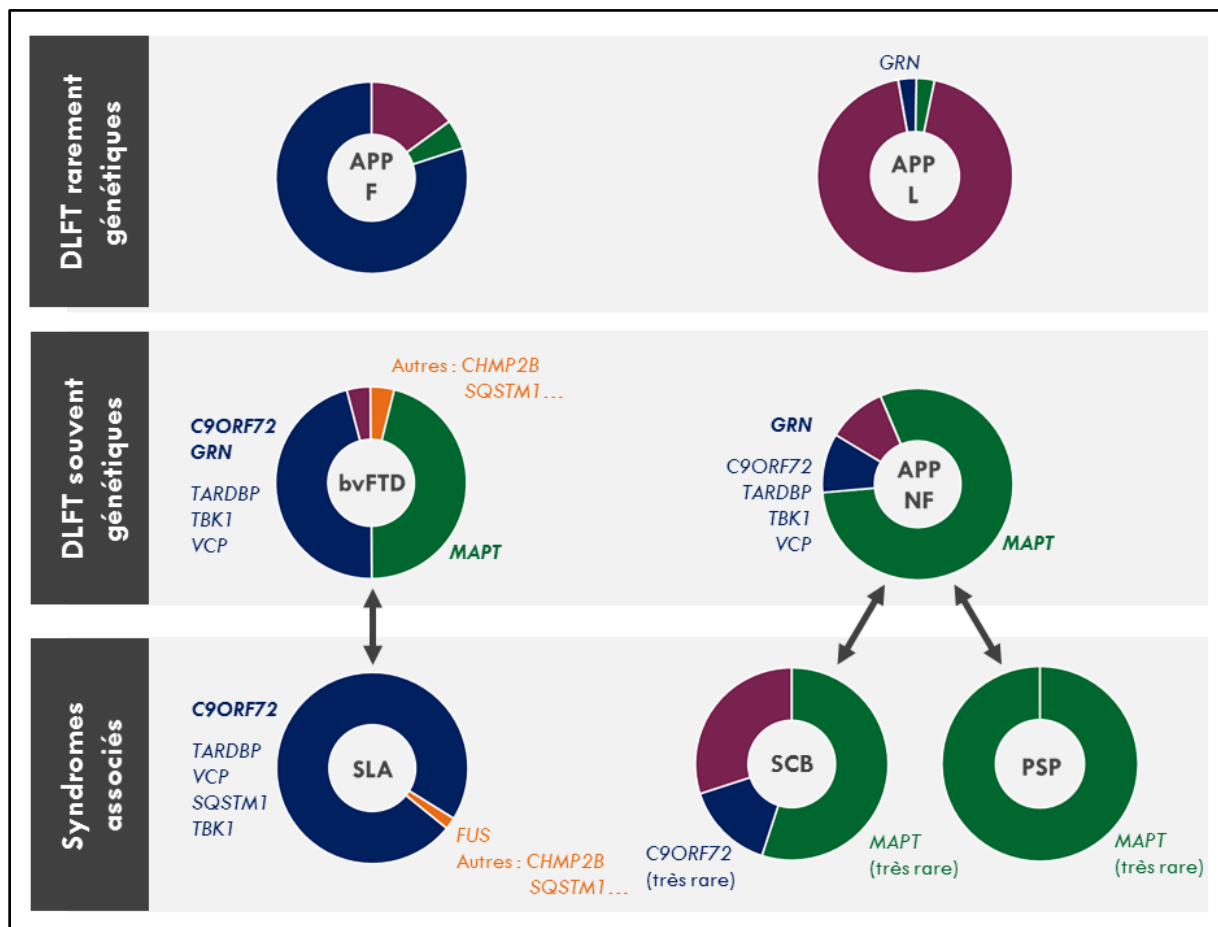
Gène impliqué	Mutations pathogènes	Mode de transmission	Protéine codée	Protéinopathie associée	Mécanismes physiopathologiques	Fréquence dans les DLFT	Autres pathologies
<b>VCP</b> 1 <sup>re</sup> fois décrit dans les DLFT : 2004(290) locus : 9p13.3	<b>Nombre :</b> > 30 (288) Mutations non-sens ++	<b>Autosomique dominant</b>	<b>VCP</b> <b>Fonction(s) :</b> Transport des protéines ubiquitinylées au ubiquiti pour dégradation	<b>DLFT-TDP :</b> type D Agréats musculaires fréquents (285) <b>p62 agrégée :</b> possible (286) <b>VCP agrégée :</b> rarement (287)	<b>Lien avec agrégation de TDP-43 :</b> peu clair <b>Perturbation du SUP</b> (284)	<b>Formes familiales :</b> 1 % <b>Formes sporadiques :</b> Non décrite	<b>Myosite à inclusions</b> (90 % des sujets mutés) <b>+/- Paget</b> (45 % des sujets mutés) <b>+/- DLFT</b> (30 % des sujets mutés) <b>+/- SLA</b> (10 % des sujets mutés)
<b>TARDBP</b> 1 <sup>re</sup> fois décrit dans les DLFT : 2006 locus : 1p36.22	<b>Nombre :</b> (289) 52 non-sens 1 troncature 1 insertion/délétion Région carboxy-terminale ++	<b>Autosomique dominant</b>	<b>TDP-43</b> <b>Fonction(s) :</b> Métabolisme des ARN, des ADN et des protéines	<b>DLFT-TDP :</b> type A type B	<b>Maturation et transport des ARNm cibles perturbés</b> <b>Perte de l'auto-rétrocontrôle négatif de sa synthèse</b>	<b>Formes familiales :</b> 2 % <b>Formes sporadiques :</b> Non décrite	<b>SLA familiales :</b> 4 % <b>SLA sporadiques :</b> (282) 2 %
<b>TBK1</b> 1 <sup>re</sup> fois décrit dans les DLFT : 2015 (291-293) Locus : 12q14.2	<b>Nombre :</b> une dizaine <b>Effet décrit :</b> ↘ 50 % expression de TBK1	<b>Variable</b>	<b>TBK1</b> <b>Fonction(s) :</b> Transport des protéines ubiquitinylées pour élimination par autophagie	<b>DLFT-TDP :</b> type A type B <b>p62 agrégée :</b> possible	<b>Perturbation du SUP</b>	<b>Formes familiales :</b> 2-3 % <b>Formes sporadiques :</b> Non décrite	<b>SLA :</b> possible (283)

**Tableau VI :** Exemples de mutations peu fréquentes identifiées dans les DLFT-TDP. **Abréviations :** ADN : acide désoxyribonucléique ; ARN : acide ribonucléique ; ARNm : acide ribonucléique messenger ; DFLT-TDP : dégénérescence lobaire frontotemporale associée à des agrégats cérébraux de *TAR DNA-binding protein of 43 kDa* ; p62 : protéine sequestosome 1 ; Paget : maladie des os de Paget ; SLA : sclérose latérale amyotrophique ; SUP : système ubiquitine-protéasome ; *TBK1* : gène et protéine *TANK Binding Kinase 1* ; *TARDBP* : gène *TAR DNA binding protein* ; *VCP* : gène et protéine *Valosin-containing protein*.

Gène impliqué	Mutations pathogènes	Mode de transmission	Protéine codée	Protéinopathie associée	Mécanismes physiopathologiques	Fréquence dans les DLFT	Autres pathologies
<b>CHMP2B</b> 1 <sup>re</sup> fois décrit dans les DLFT : 2005 Locus : 3p11.2	<b>Nombre :</b> - Malades : 2 (294,299) - Sujets sains : 1 (300) <b>Effet décrit :</b> protéine tronquée à son extrémité carboxy-terminale	<b>Autosomique dominant</b>	<b>CHMP2B</b> <b>Fonction(s) :</b> élément clef de la formation des autophagosomes, des endosomes et des lysosomes (263)	<b>DLFT-UPS :</b> seule p62 est agrégée (296)	<b>Perturbation du système lysosomal</b> (294)  <b>Perturbation du SUP</b> (263)	<b>Formes familiales :</b> < 1 %  <b>Formes sporadiques :</b> Non décrite	
<b>FUS</b> 1 <sup>re</sup> fois décrit dans les DLFT : 2009 Locus : 16p11.2	<b>Très rarement identifiées dans un contexte de DLFT</b> (272)  Plutôt mises en évidence dans un contexte de SLA	<b>Autosomique dominant</b>	<b>FUS</b> <b>Fonction(s) :</b> Métabolisme des ARN et des ADN	<b>DLFT-FET :</b> Les agrégats sont aussi composés des protéines EWS et TAF 15 (247)	<b>Maturation et transport des ARNm cibles perturbés</b> (295)	<b>Formes familiales :</b> 2 %  <b>Formes sporadiques :</b> Non décrite	<b>SLA familiales :</b> 4 %  <b>SLA sporadiques :</b> 1 %  Dans les SLA, les agrégats sont composés majoritairement de FUS agrégée
<b>SQSTM1</b> 1 <sup>re</sup> fois décrit dans les DLFT : 2012 Locus : 5q35.3	<b>Nombre : 27 [(301)]</b>	<b>Autosomique dominant</b>	<b>p62</b> aussi appelée <b>sequestosome 1</b> <b>Fonction(s) :</b> Reconnaissance des protéines ubiquitinylées pour élimination par autophagie (298)	<b>DLFT-TDP :</b> Les agrégats contiennent à la fois de la TDP-43 et p62 (297)	<b>Perturbation du SUP</b>  <b>Perturbation de l'autophagie :</b> par atteinte du fonctionnement des mitochondries (263)	<b>Formes familiales :</b> < 1 %  <b>Formes sporadiques :</b> Non décrite	<b>SLA :</b> possible  <b>Paget :</b> rares  <b>myosite à inclusions :</b> rares

**Tableau VII :** Exemples de mutations peu fréquentes identifiées dans des DLFT ne présentant pas d'inclusions de TDP-43, ou des inclusions à la composition hétérogène. **Abréviations :** ADN : acide désoxyribonucléique ; ARN : acide ribonucléique ; ARNm : acide ribonucléique messenger ; *CHMP2B* : gène et protéine *charged multivisceral protein 2B* ; DFLT-TDP : dégénérescence lobaire frontotemporale associée à des agrégats cérébraux de *TAR DNA-binding protein of 43 kDa* ; DFLT-FET : dégénérescence lobaire frontotemporale associée à des agrégats cérébraux de protéines *Fused in Sarcoma, Ewing Sarcoma* et *TATA binding protein-associated factor 15* ; DLFT-UPS : dégénérescence lobaire frontotemporale associée à des inclusions positives pour des marqueurs du SUP ; *FUS* : gène et protéine *Fused in Sarcoma* ; p62 : protéine sequestosome 1 ; Paget : maladie des os de Paget ; *SQSTM1* : gène sequestosome 1 ; SLA : sclérose latérale amyotrophique ; SUP : système ubiquitine-protéasome.

Si la mise en évidence de variants pathogènes permet d'obtenir un diagnostic ante-mortem de DLFT qualifié de « défini » ou de « certain », un tel test ne permet pas de prédire avec certitude les symptômes cliniques à venir chez des sujets au stade présymptomatique, y compris au sein de la même famille (262). En effet, malgré des tendances dans la corrélation entre le statut génétique, le type de protéine agrégée et les phénotypes cliniques, il n'existe aucune association stricte (figure 25). Les symptômes cliniques semblent en fait plutôt déterminés par la localisation anatomique des lésions que par leur nature (41).



**Figure 25 :** Principales associations clinico-pathologiques et génétiques dans les DLFT et leur troubles moteurs associés. Les gènes impliqués sont précisés à côté de chaque symptomatologie clinique. Les flèches symbolisent les associations cliniques courantes. Les inclusions protéiques de TDP-43 (**en bleu**) représentent une majorité des cas de SLA et d'APP fluente, un peu moins de la moitié des bvFTD, quelques cas de SCB et d'APP non fluente, ainsi que de très rares cas d'APP logopénique. Les DLFT-Tau (**en vert**) composent la quasi-totalité des PSP, une proportion importante d'APP non fluentes, de SCB et de bvFTD, mais aussi un petit nombre d'APP fluentes. Les protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer (**en violet**) sont retrouvées dans la plupart des cas d'APP logopénique, dans quelques cas d'APP non fluente ou fluente et de SCB, ainsi que dans de rares cas de bvFTD. Enfin, il existe pour un petit nombre de SLA et de bvFTD d'autres mutations et/ou protéines agrégées (**en orange**). **Abréviations :** APP : aphasia primaire progressive ; APP L : APP logopénique ; APP F : APP fluente ; APP NF : APP non fluente ; bvFTD : variant comportemental des dégénérescences lobaires frontotemporales ; *C9orf72* : gène *Chromosome 9 open reading frame 72* ; DLFT : dégénérescences lobaires frontotemporales ; FUS : gène *Fused in Sarcoma* ; GRN : gène *Progranulin* ; MAPT : gène *Microtubule associated protein Tau* ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; SCB : syndrome corticobasal ; SLA : sclérose latérale amyotrophique ; Tau : protéine *tubule associated unit* ; TDP-43 : protéine *TAR DNA-binding protein of 43 kDa* ; TARDBP : gène *TAR DNA binding protein* ; VCP : gène *Valosin-containing protein*.

## 3.2. Imagerie médicale

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie par émission de positons au <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose (TEP-FDG) sont actuellement les deux techniques d'imagerie médicale classiquement utilisées pour le diagnostic des DLFT (25,26). Elles sont notamment utiles au diagnostic différentiel de ces pathologies, en permettant par exemple d'exclure une MA, un accident vasculaire cérébral ou une tumeur cérébrale.

D'autres techniques d'imageries ont montré des résultats très encourageants concernant le diagnostic précoce et le suivi des DLFT. Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires pour valider leur usage en pratique clinique courante.

### 3.2.1 Evaluation des changements dans la structure cérébrale

- *IRM et atteintes caractéristiques de la substance grise*

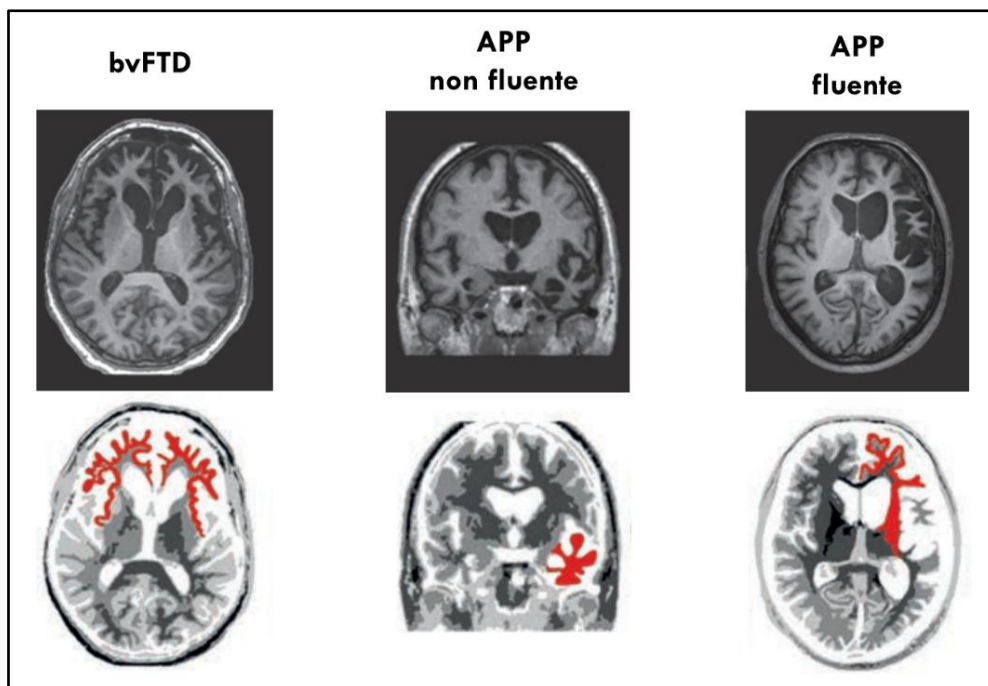
L'IRM permet de mesurer le volume cérébral global, mais également de localiser une possible atrophie au niveau du cortex cérébral. Cette seconde propriété a été à la base de la majorité des études dans le cadre du diagnostic des DLFT.

Il a ainsi été défini des profils d'atrophie cérébrale particuliers, en fonctions de l'atteinte clinique (figure 26). Dans le variant comportemental de ces pathologies, l'atrophie corticale est généralement plutôt symétrique, frontale et temporale. Plus spécifiquement, le cortex préfrontal, les régions temporales antérieures, l'insula et le cortex cingulaire antérieur sont particulièrement touchés (302). Il existe cependant une grande hétérogénéité à l'échelle individuelle dans la répartition et l'intensité des lésions au sein des bvFTD (303). Quatre motifs d'atrophie pourraient finalement leur être associés, suivant que celle-ci prédomine au niveau frontal ou temporal, et que l'atteinte soit focale ou répartie entre les lobes frontaux et temporaux. De plus, il semblerait que chez certains patients, l'atrophie corticale concerne aussi le lobe pariétal (304). Enfin, des structures sous-corticales comme l'hippocampe, l'amygdale, les ganglions de la base ou le thalamus peuvent aussi être touchés (305).

Dans les APP non fluentes, l'atrophie corticale est généralement asymétrique et prédomine plutôt dans l'hémisphère cérébral gauche. Des changements sont observés au niveau du gyrus temporal supérieur, du gyrus frontal inférieur, du cortex préfrontal et du cortex insulaire (306). Avec le temps, l'atrophie peut se propager aux autres structures de l'hémisphère cérébral gauche, comme le cortex temporal latéral et pariétal antérieur, ou toucher l'hémisphère cérébral droit (307).

Dans les APP fluentes, l'atrophie cérébrale prédomine classiquement à gauche, bien qu'un variant présentant une atrophie dominante au niveau de l'hémisphère cérébral droit ait été décrit (308). Cette atteinte de la substance grise est principalement observée au niveau des lobes temporaux antérieurs et inférieurs, mais peut également toucher le gyrus fusiforme et le cortex entorhinal (309). Pour les patients dont l'atteinte est sévère, l'atrophie corticale tendra à gagner le lobe temporal droit, mais également les cortex orbitofrontaux, insulaires et cingulaires antérieurs, pouvant expliquer l'apparition de troubles comportementaux associés (310). Enfin, au niveau sous-cortical, l'amygdale et l'hippocampe peuvent aussi être atteints (311).

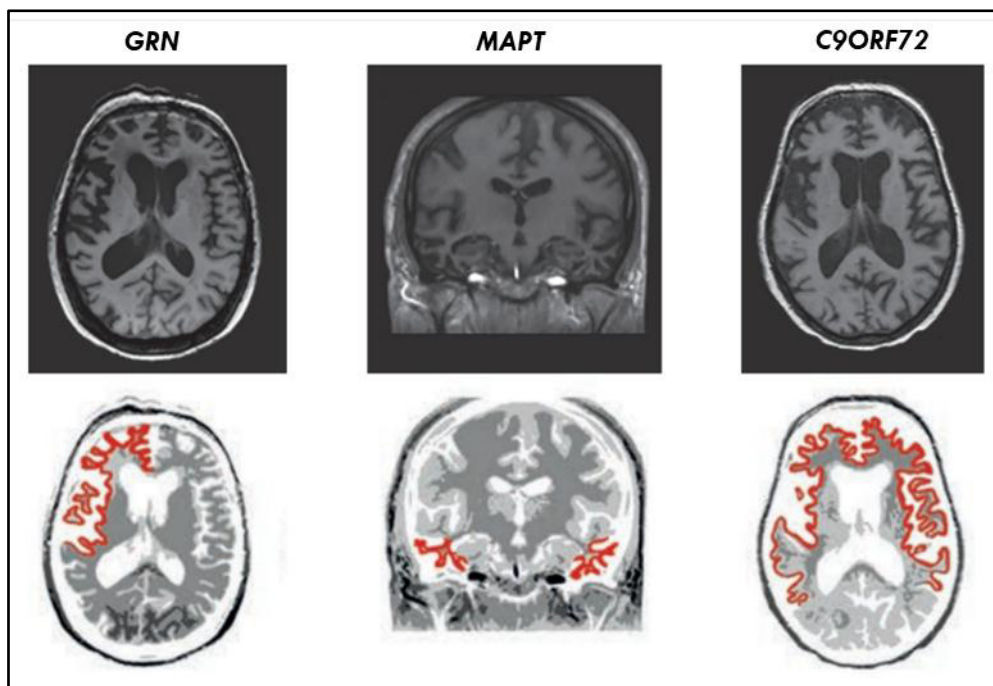
Les motifs retrouvés à l'IRM pour les patients atteints de bvFTD, ou d'APP fluente et non fluente, épargnent généralement le cortex postérieur. Cette caractéristique permet alors de distinguer les patients atteints de DLFT et de MA (312).



**Figure 26** : Atrophies corticales caractéristiques des symptômes cliniques rencontrés dans les DLFT. Lorsque l'IRM est pondérée en T1, la graisse apparaît hyper-intense (couleur claire) et l'eau hypo-intense (couleur sombre). **Abréviations** : bvFTD : variant comportemental des DLFT ; APP : aphasie primaire progressive. Adapté de Meeter et al (305).

Pour les rares sujets présentant une APP logopénique dont la pathologie sous-jacente est une DLFT, un motif caractéristique permet aussi de les distinguer de la MA. Dans ce cas de figure, les troubles du langage s'accompagnent d'une atrophie cérébrale localisée principalement au niveau de la jonction temporo-pariétale gauche (262). Comme pour les deux autres types d'APP, l'atrophie gagnera bien souvent l'hémisphère cérébral droit avec l'évolution de la maladie (313).

Des profils d'atrophie pour les trois variants d'étiologie génétique les plus fréquents ont aussi été décrits, indépendamment de la symptomatologie clinique (figure 27). En effet, des mutations dans le gène *GRN* s'accompagnent d'une atrophie corticale asymétrique des lobes temporal, frontal inférieur et pariétal inférieur. Des mutations dans le gène *MAPT* sont associées à une atrophie symétrique antéro-temporale et orbitofrontale, impliquant parfois le cortex insulaire et cingulaire antérieur. Finalement, des expansions dans le gène *C9ORF72* se caractérisent par une atrophie symétrique et largement distribuée, impliquant le cortex dorsolatéral, frontal médian, orbitofrontal, temporal antérieur et pariétal, mais également le thalamus et une partie du cervelet (305,306). Par ailleurs, il a été mis en évidence que l'atrophie corticale se développe plus rapidement en cas de mutation dans le gène *GRN* qu'en cas d'expansion dans le gène *C9ORF72* (314).



**Figure 27** : Atrophies corticales caractéristiques des mutations principales mises en évidence chez les patients atteints de DLFT. **Abréviations** : *C9ORF72* : gène *Chromosome 9 open reading frame 72* ; *GRN* ; gène *Progranulin* ; *MAPT* : gène *Microtubule associated protein Tau*. Adapté de Meeter et al (305).

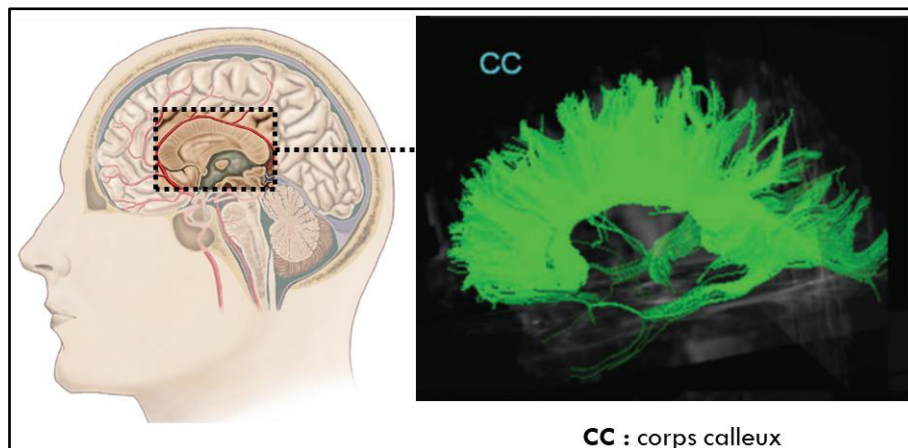


Si des motifs spécifiques à l'IRM ont été décrits en fonction de la symptomatologie clinique et des mutations rencontrées dans les DLFT, une classification en fonction des différentes protéines agrégées n'a pas encore été définie. Il est ainsi aujourd'hui impossible de différencier une DLFT-Tau d'une DLFT-TDP par l'IRM pour les patients ne présentant pas de mutation identifiée (304). Des études ont néanmoins permis l'ébauche de profils pour différencier les quatre types principaux de DLFT-TDP, mais les premiers résultats doivent être complétés par des études de plus grandes cohortes (315,316).

Enfin, malgré quelques études longitudinales, l'intérêt du suivi de l'atrophie corticale comme marqueur d'évolution de la maladie n'est pas encore établi. Il se pourrait cependant que ce phénomène soit détectable par IRM une dizaine d'années avant les premiers symptômes cliniques, chez des sujets asymptomatiques porteurs de mutations au niveau des gènes *MAPT*, *GRN* ou *C9ORF72* (317).

- ***Imagerie en « tenseur de diffusion » et atteinte de la substance blanche***

L'imagerie en « tenseur de diffusion » (ITD) dérive de l'IRM, mais repose sur l'analyse du mouvement des molécules d'eau dans plusieurs directions et non celui des protons comme dans l'IRM classique. Elle apporte des informations sur d'autres structures cérébrales que le cortex et permet par exemple de réaliser une cartographie des axones formant la substance blanche cérébrale sous-corticale, en spécifiant leur intégrité (figure 28). Cette substance blanche pourrait être d'un intérêt majeur pour la compréhension de la propagation des processus neurodégénératifs (318). Elle est donc actuellement à l'étude pour aider au diagnostic des DLFT (305).



**Figure 28** : Mise en évidence des fibres du corps calleux par imagerie en tenseur de diffusion. Adapté de Zhang *et al* (319).

Malgré un certain nombre de recouvrements, cette technique semble prometteuse pour distinguer les différents phénotypes cliniques des DLFT, mais aussi et surtout les patients souffrant de DLFT et de MA. En effet, l'atrophie de la substance blanche apparaît moins importante dans cette deuxième pathologie (319).

L'ITD pourrait aussi révéler des profils lésionnels de la substance blanches particuliers, suivant le statut génétique des sujets atteints de DLFT (320). Il semblerait par ailleurs que ces lésions soient plus importantes chez les sujets présentant des variants pathogènes sur le gène *GRN* (321). Cette accentuation serait aussi visible dans les DLFT-Tau en comparaison des DLFT-TDP (322,323).

Enfin, il a été observé que des anomalies structurelles sous-corticales chez les patients atteints de DLFT semblent être plus précoces que les lésions du cortex (322). Ces lésions précèdent également parfois les premiers signes cliniques, laissant espérer l'émergence d'un marqueur biologique précoce (324,325).

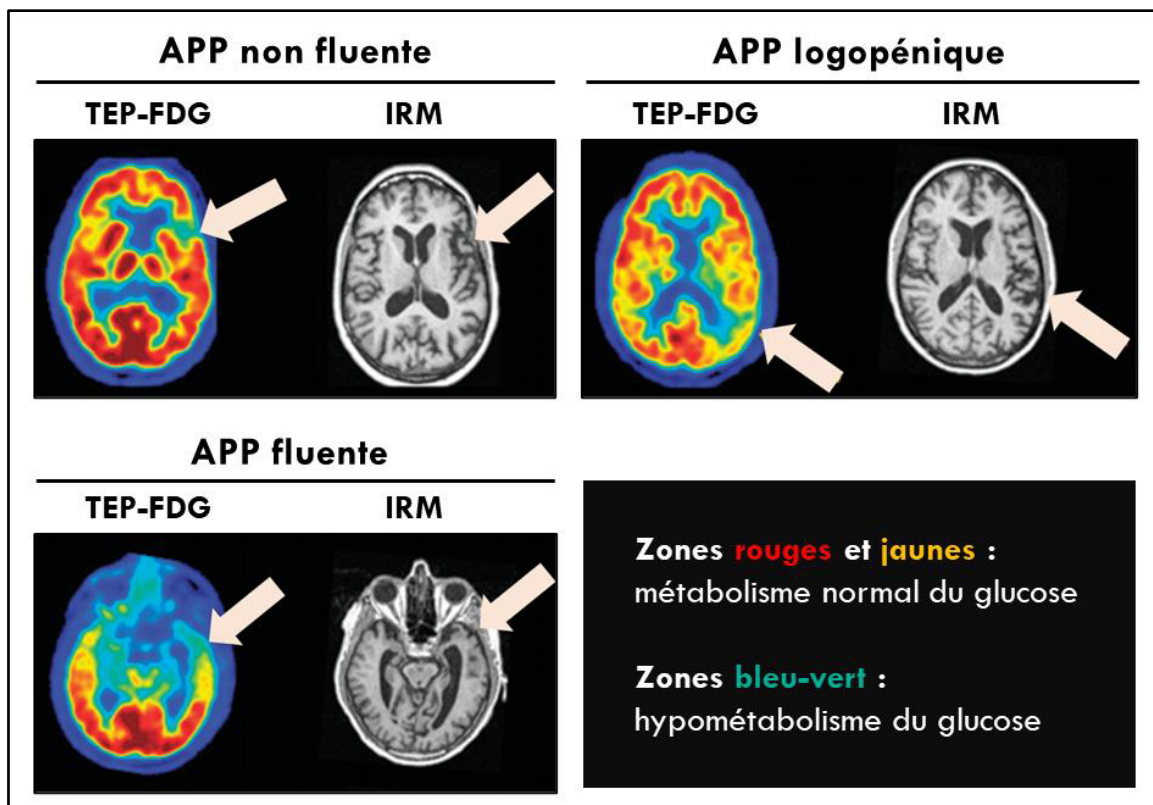
### **3.2.2 Evaluation des changements fonctionnels cérébraux**

- ***TEP-FDG et métabolisme du glucose***

La TEP permet de visualiser l'hypométabolisme du glucose dans certaines zones cérébrales, par l'injection veineuse de <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose au patient (FDG) (4).

Dans les DLFT, ces zones d'intérêt correspondent classiquement à celles dans lesquelles une atrophie de la substance grise est mise en évidence à l'IRM, chez les sujets montrant des signes de bvFTD ou d'APP fluente, non fluente et logopénique (figure 29) (38,326). Une telle superposition peut aussi être observée chez les sujets DLFT présentant des mutations dans les gènes *GRN*, *MAPT* et *C9ORF72* (327–329).

L'intérêt de la TEP réside alors dans le fait que les altérations du métabolisme du glucose semblent être beaucoup plus précocement observables que l'atrophie cérébrale (327,330). Cependant, cette technique pourrait être à l'origine de faux-positifs, notamment chez des patients atteints de MPP (326).



**Figure 29** : Images cérébrales de patients atteints d'APP, obtenues en IRM classique et par TEP-FDG. Les flèches montrent que les régions touchées par une atrophie corticale, et celles dans lesquelles surviennent un hypométabolisme du glucose sont superposables. **Abréviations** : APP : aphasie primaire progressive ; FDG :  $^{18}\text{F}$ -fluorodésoxyglucose ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; TEP : tomographie par émission de positons. Adapté de Bonakdarpour *et al* (38).

- **TEP-PiB et dépôts cérébraux de peptide bêta-amyloïde**

Lorsqu'elle est associée à l'injection veineuse d'un traceur nommé « *Pittsburgh compound B* » (PiB), la TEP permet de visualiser les dépôts cérébraux composés de peptide bêta-amyloïde. Cette technique est approuvée par les agences du médicament américaine et européenne depuis 2012 dans le cadre du diagnostic différentiel des DLFT et de la MA (331).

La TEP-PiB permet en effet de réaliser un diagnostic différentiel entre ces pathologies, car la mise en évidence de tels dépôts est typique chez les patients atteints de MA, et absente chez la plupart des sujets souffrant de DLFT (332). Beaucoup de patients pour lesquels un diagnostic clinique d'APP logopénique est réalisé présentent un motif de dépôt de peptide bêta-amyloïde similaire à celui observé dans la MA (39,333). Pour les rares cas d'APP logopéniques PiB-négatives, les motifs cérébraux obtenus par IRM et les résultats du PET-FDG évoquent toutefois une DLFT (314,333).

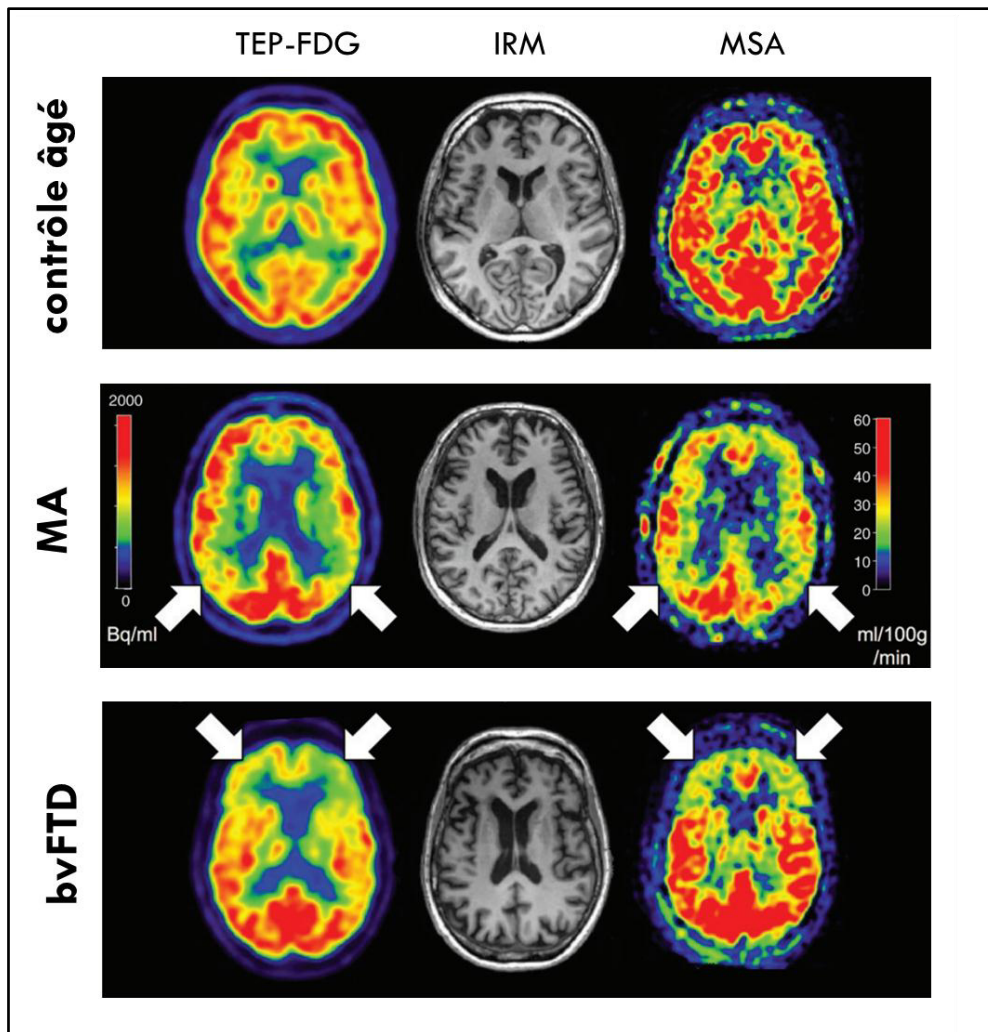
Il existe également d'autres cibles pour les traceurs utilisables par TEP, notamment ceux liant la protéine Tau (334–336). Cependant, actuellement aucun n'est capable de mettre en évidence tous les isoformes de cette protéine, et il semblerait qu'il faille associer les différents ligands pour avoir une vue d'ensemble des tauopathies (337). Cependant, depuis mai 2020 le Flortaucipir ([F18]T807 ; 18F-AV1451) est approuvé par l'agence du médicament américaine (338).

- ***Marquage de spins artériels et perfusion artérielle cérébrale***

Le marquage de spins artériels (MSA) est une technique d'IRM dite « fonctionnelle », permettant d'évaluer la perfusion artérielle de zones cérébrales d'intérêt. Son principe repose sur le marquage magnétique non invasif des protons de l'eau dans le sang artériel (339).

Dans les DLFT, une hypoperfusion artérielle peut être visualisée dans les zones cérébrales où un hypométabolisme du glucose et une atrophie corticale sont mises en évidence par TEP-FDG et IRM classique.

Elle partage avec la TEP-FDG l'avantage d'une positivité précoce comparé à l'IRM classique, notamment avant l'apparition de signes cliniques (340). Elle permet également la distinction des sujets atteints de DLFT et de MA avec de bonnes performances analytiques (figure 30) (341–343). L'intérêt majeur du MSA par rapport à la TEP-FDG, réside alors dans le fait qu'il s'agit d'un acte n'exposant le patient à aucune radiation et réalisable en parallèle d'une exploration cérébrale par IRM classique (340).



**Figure 30** : Comparaison des images cérébrales d'un sujet contrôle et de patients atteints de MA et de bvFTD. Sur les images du MSA et de la TEP-FDG, les zones rouges et jaunes signalent une perfusion artérielle et un métabolisme du glucose normaux, et les zones bleu-vert un hypométabolisme de ce glucose et une hypoperfusion sanguine. Les flèches montrent que les régions dans lesquelles surviennent un hypométabolisme du glucose, et celles touchées par une hypoperfusion artérielle sont identiques. **Abréviations** : bvFTD : variant comportemental des DLFT ; FDG :  $^{18}\text{F}$ -fluororéoxyglucose ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; MA : maladie d'Alzheimer ; MSA : marquage de spins artériels ; TEP : tomographie par émission de positons. D'après Haller *et al* (341).

- ***IRM fonctionnelle à l'état de repos et connexions des aires cérébrales***

L'IRM fonctionnelle à l'état de repos (IRM-fer) est, comme le MSA, une technique d'IRM fonctionnelle, mesurant localement des fluctuations du niveau d'oxygène sanguin. Ces mesures permettent l'évaluation des connexions entre plusieurs zones cérébrales, formant des réseaux. Différents réseaux peuvent ainsi être étudiés, comme le réseau du langage et de la sémantique, plutôt localisés dans l'hémisphère gauche du cerveau, le réseau saillant permettant l'interprétation des émotions et la régulation du comportement, le réseau des fonctions exécutives, ou encore le réseau du « mode par défaut » (RMPD). Ce dernier s'active lorsqu'un patient se trouve dans un état de repos, c'est-à-dire qu'il ne pense à rien en particulier.

Le variant comportemental des DLFT est fréquemment associé à une diminution spécifique des connexions entre le cortex frontal, insulaire et cingulaire antérieur, et plus globalement entre toutes les structures formant le réseau saillant, incluant aussi l'amygdale, le thalamus et le striatum (344). Il a alors été proposé que ces connexions réduites soient compensées par une augmentation de la connexion du RMPD (344,345). Cependant, des connexions normales, voire augmentées, au sein du réseau saillant ont aussi été rapportées en cas de bvFTD (346), tout comme une connexion normale du RMPD (347). Ces contradictions entre les études pourraient néanmoins s'expliquer, au moins en partie, par l'application de méthodes différentes, sur des automates différents (305).

Dans quelques études, l'IRM-fer appliquée à des patients atteints d'APP non fluentes a permis de conclure à une réduction fréquente de connexion au niveau du lobe frontal et temporal gauche (348). Une baisse de connexion neuronale a aussi été mise en évidence dans les aires motrices liées au langage, qui permettent un discours fluide (349).

Concernant les patients atteints d'APP fluente, sans surprise, le réseau sémantique semble particulièrement touché par une diminution des connexions neuronales, notamment au niveau du lobe temporal antérieur gauche (350). D'autres régions du lobe temporal gauche, mais également le cortex frontal, l'amygdale, l'hippocampe et le noyau codé pourraient par ailleurs être touchés (348).

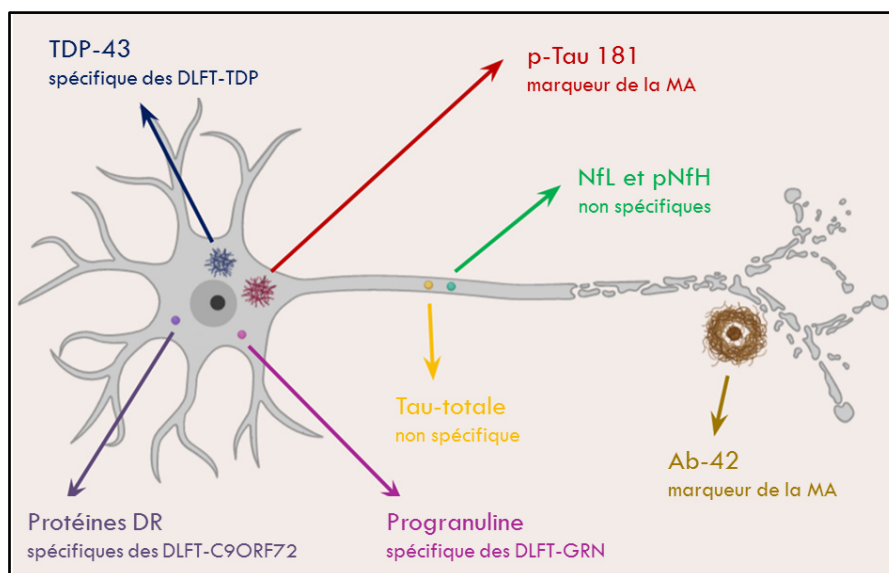
Des motifs particuliers de connexion ont également été décrits chez les patients présentant une mutation dans les gènes *C9ORF72* ou *GRN*, mais ces travaux doivent désormais être validés sur de plus grands échantillons (345,351).

Enfin, les variations de connexions des aires cérébrales précèdent parfois l'atrophie de la matière grise et les premières manifestations cliniques chez les patients. En effet, une altération (augmentation ou diminution) de connexion a été observée au niveau du cortex fronto-insulaire et/ou cingulaire antérieur chez certains sujets, porteurs de mutations impliquées dans les DLFT asymptomatiques au moment de l'analyse (324,345,352). Là encore, ces observations doivent maintenant être poursuivies sur de plus grandes cohortes.

### 3.3. Recherche de biomarqueurs protéiques pour le diagnostic des DLFT

En parallèle du développement d'outils génétiques et de l'imagerie médicale, d'intenses recherches ont été conduites ces vingt dernières années afin d'évaluer l'intérêt de certaines protéines dans le cadre du diagnostic ante-mortem des DLFT. Elles ont été étudiées essentiellement dans les fluides biologiques comme le LCS ou le plasma, mais aussi dans des éléments figurés du sang (353). A ce jour, et malgré certaines avancées, aucun marqueur étiologique n'est validé pour une utilisation en routine clinique.

L'objectif pour les chercheurs est d'obtenir des biomarqueurs issus de matrices relativement accessibles, permettant à la fois de compléter les arguments cliniques des médecins, de déterminer le stade de la pathologie et de suivre sa progression de façon objective. Idéalement, ces marqueurs pourraient également permettre de détecter les sujets aux stades les plus précoces et d'évaluer une éventuelle réponse à des nouveaux traitements en test (305). Pour répondre à l'ensemble de ces objectifs, la recherche de marqueurs protéiques s'est organisée autour de deux grands axes (figure 31). Le premier axe a consisté à étudier des protéines jouant un rôle clef dans la physiopathologie des DLFT, afin d'obtenir des marqueurs protéiques étiologiques (353). Le deuxième axe a consisté à rechercher des marqueurs protéiques indirects, reflétant des processus lésionnels généraux (354).



**Figure 31 :** Principales protéines étudiées pour le développement de biomarqueurs dans un contexte de DLFT. **Abréviations :** Ab-42 : peptide beta-amyloïde de 42 acides aminés ; *C9ORF72* : gène *Chromosome 9 open reading frame 72* ; DLFT : dégénérescences lobaires frontotemporales ; *GRN* : gène *Progranulin* ; MA : maladie d'Alzheimer ; NfL : neurofilaments à chaîne légère ; maladies ND : maladies neurodégénératives ; pNfH : neurofilaments phosphorylés à chaîne lourde , p-Tau 181 : protéine *Tubule associated unit* phosphorylée en position 181 ; protéines DR : protéines formées de dipeptides répétés ; Tau-totale : toutes les formes de la protéine *Tubule associated unit* ; TDP-43 : *TAR DNA-binding protein of 43 kDa*.

### 3.3.1 Marqueurs protéiques étiologiques des DLFT

- ***TAR DNA-binding protein of 43 kDa***

Au niveau cérébral, la TDP-43 totale ou fragmentée, monomérique ou agrégée, peut être libérée dans le milieu interstitiel, suite à la dégénérescence des neurones ou par des mécanismes cellulaires d'excrétion des protéines pathologiques, puis rejoindre le LCS du fait de sa proximité avec le parenchyme cérébral et de l'absence de barrière étanche (223,355,356). Une étude récente a ainsi confirmé des mouvements de TDP-43 entre ce fluide biologique et le cerveau. En effet, chez des souris exprimant la TDP-43 humaine, l'infusion intracérébrale durant deux semaines de LCS de patients atteints de SLA, a entraîné l'apparition de cette maladie chez les animaux, accompagnée d'un certain déclin des fonctions cognitives (357). Ces échanges facilités entre le parenchyme cérébral et le LCS expliquent que ce fluide biologique ait été un support important pour l'étude de la TDP-43.

D'un point de vue qualitatif, les analyses réalisées par WB à partir de LCS sont globalement peu informatives (tableau VIII). En effet, les profils caractéristiques des échantillons cérébraux ne sont pas retrouvés dans ce fluide, notamment les petits fragments carboxy-terminaux d'environ 25 kDa. De plus, aucune différence de profils entre les patients atteints de DLFT ou de SLA et les sujets contrôles n'a été mise en évidence. Enfin, la comparaison des profils qualitatifs de la TDP-43 dans le LCS, décrits en 2008 par Steinacker *et al*, et en 2014 par Feneberg *et al*, montre que des WB réalisés avec le même anticorps « 10782-2-AP » (Proteintech, USA), à partir du LCS de patients atteints des mêmes pathologies, ne présentent pourtant pas les mêmes profils dans les deux études (355,358). Cette différence pourrait cependant en partie s'expliquer par le fait que les patients atteints de DLFT n'étaient pas caractérisés d'un point de vue immunohistologique.

A l'heure actuelle, aucune étude qualitative de la TDP-43 dans le LCS faisant appel à des anticorps anti-TDP-43 phosphorylée n'a été publiée. De tels anticorps permettrait pourtant théoriquement de mettre en évidence des formes pathologiques de TDP-43, présentes systématiquement au niveau cérébral dans les protéinopathies à TDP-43 (157,251).



Etude	Echantillons	Anticorps	Bandes révélées par Western Blot
Neumann 2006 (75)	Cerveaux (urée) : - DLFT-TDP - SLA - Divers contrôles	Anti-TDP-43 non précisé	<b>DLFT-TDP et SLA :</b> 60 kDa : trainée montante 45 kDa : p-TDP-43 43 kDa : TDP-43 25 kDa : fragments C-ter
Arai 2006 (76)	Cerveaux (sarkosyl) : - DLFT-TDP - SLA - Divers contrôles	Polyclonal lapin (PT) N-ter : aa 1 à 260	<b>Contrôles :</b> 43 kDa : TDP-43
Steinacker 2008 (358)	Cerveaux (urée) : - DLFT-TDP	Polyclonal lapin (PT) N-ter : aa 1 à 260  Monoclonal souris (PT) N-ter : aa 1 à 260	65 kDa : trainée montante 60 kDa : faible 50 kDa : majeure 47 kDa : majeure 44 kDa : faible ; TDP-43 ⇒ <b>≠ de Neumann et Arai</b>  Identiques à celles obtenues au-dessus + faible bande de 26 kDa ⇒ <b>≠ de Neumann et Arai</b>
	LCS : - DLFT - SLA - Contrôles	Polyclonal lapin (PT) N-ter : aa 1 à 260  Monoclonal souris (PT) N-ter : aa 1 à 260  Antisérum polyclonal N-ter : aa 6 à 24  Monoclonal souris (ABN) Central : aa 205-222  Antisérum polyclonal C-ter : aa 396 à 414	45 kDa : TDP-43 (avec MPT ?) 28 kDa : IgG ⇒ <b>pas de bande en commun avec les cerveaux de cette étude, pas de fragments, ni de différence entre sujets</b>  60 kDa : non-spé ⇒ <b>Pas de bande intéressante</b>  60 kDa : non-spé ⇒ <b>Pas de bande intéressante</b>  65 kDa : non-spé 55 kDa : IgG 28 kDa : IgG ⇒ <b>Pas de bande intéressante</b>  60 kDa : non-spé 45 ka : TDP-43 20 kDa : TDP-43 fragmentée ? ⇒ <b>pas de bande en commun avec les cerveaux de cette étude, pas de différence entre sujets</b>
Kasai 2009 (359)	LCS : - SLA - Contrôles	<b>Immuno-capture :</b> Monoclonal souris (ABN) central : aa 205-222 <b>Puis WB :</b> Polyclonal lapin (PT) N-ter : aa 1 à 260	66 kDa : albumine 50 kDa : IgG 43 kDa : Faible ; TDP-43 23 kDa : IgG ⇒ <b>pas de différence entre sujets</b>
Feneberg 2014 (355)	LCS : - DLFT - SLA - Contrôles	Polyclonal lapin (PT) N-ter : aa 1 à 260  Polyclonal rat C-ter : aa 396-414	55 kDa : forte ; IgG + albumine 45 kDa : faible ; TDP-43 ⇒ <b>pas de différence entre sujets</b>  Faible bande 45 ka ; TDP-43 ⇒ <b>pas de différence entre sujets</b>

**Tableau VIII :** Comparaison des profils de TDP-43 retrouvés en Western Blot au niveau cérébral et dans le LCS. **Abréviations :** aa : acide aminé ; ABN : société Abnova, Taïwan ; C-ter : fragments carboxy-terminaux ; DLFT : dégénérescence lobaire frontotemporale ; DLFT-TDP : dégénérescence lobaire frontotemporale associée à des inclusions de TDP-43 ; IgG : immunoglobulines de type G ; LCS : liquide cérébrospinal ; MPT : modifications post-traductionnelles ; non spé : non spécifique ; PT : société Proteintech, USA ; p-TDP-43 ; forme phosphorylée de la TDP-43 ; SLA : sclérose latérale amyotrophique ; spé : spécifique des malades ; TDP-43 : *TAR DNA-binding protein of 43 kDa*.

Des études de quantification de la TDP-43 dans le LCS ont aussi été menées (tableau IX). Là encore, les résultats sont peu informatifs et contradictoires.

Etude	Techniques de mesure et Anticorps	Cohortes	[TDP-43] dans le LCS Moyenne (écart-type)	Différences statistiques
Steinacker 2008 (358)	Intensité de la bande de 45 kDa en WB par rapport à un EI	12 DLFT 15 SLA 9 SLA-DLFT 13 contrôles	<b>60 %</b> (+/- 26 %) <b>67 %</b> (+/- 45 %) <b>43 %</b> (+/- 36 %) <b>33 %</b> (+/- 24 %)	DLFT > contrôles SLA > contrôles
Kasai 2009 (359)	ELISA nc : - Ac ABN - Ac PT 1	30 SLA : 16 SLA < 11 mois 14 SLA > 11 mois 29 contrôles	<b>6,9</b> (+/- 3,7) ng/ml <b>8,2</b> (+/- 4,7) ng/ml <b>5,4</b> (+/- 0,7) ng/ml <b>5,3</b> (+/- 0,9) ng/ml	SLA > contrôles
Noto 2011 (360)	ELISA nc : - Ac ABN - Ac PT 1	27 SLA 50 contrôles : MP, PSP, SEP, SGB...	<b>29,5</b> (+/- 15,5) ng/ml De <b>13,7</b> (-/+ 9,0) à <b>19,7</b> (+/- 6,6) ng/ml	SLA > contrôles et cut-off à 27,9 ng/ml
Junttila 2016 (361)	ELISA : kit Cusabio	69 DLFT : 49 DFLT non C9 20 DFLT C9 21 SLA : 11 SLA non C9 10 SLA C9	<b>3,0</b> (+/- 1,0) pg/ml <b>3,0</b> (+/- 1,1) pg/ml <b>2,9</b> (+/- 0,7) pg/ml <b>4,1</b> (+/- 1,3) pg/ml <b>3,7</b> (+/- 1,0) pg/ml <b>4,6</b> (+/- 1,5) pg/ml	DLFT < SLA DLFT non C9 = DLFT C9 SLA non C9 = SLA C9
Kuiperij 2017 (362)	ELISA nc : - Ac ABC - Ac PT 1  ELISA nc : - Ac SA 409/410 - Ac PT 1	36 DLFT-TDP 07 DLFT-Tau 21 contrôles  36 DLFT-TDP 07 DLFT-Tau 21 contrôles	<b>421</b> (+/- 335) pg/ml <b>407</b> (+/- 196) pg/ml <b>541</b> (+/- 108) pg/ml  Indéetectable Indéetectable Indéetectable	DLFT-TDP < contrôles DLFT-Tau = DLFT-TDP Contrôles = DLFT-Tau
Etude	Technique de mesure et anticorps	Cohortes	[TDP-43] dans le LCS Médiane (interquartiles)	Différences statistiques
Suarez-Calvet 2014 (363)	ELISA : kit PT - Ac PT 1 - Ac PT 2  ELISA : kit EIAab - Ac inconnu - Ac SA 409	02 DLFT C9 03 DLFT GRN 20 DLFT spo 16 contrôles  02 DLFT C9 03 DLFT GRN 20 DLFT spo 22 contrôles	<b>0,60</b> (NA) * <b>0,83</b> (NA) * <b>0,29</b> (0,00 à 0,86) * <b>0,57</b> (0,07 à 0,96) *  <b>1,78</b> (NA) * <b>1,75</b> (NA) * <b>1,18</b> (1,01 à 1,40) * <b>1,27</b> (1,12 à 1,60) *	Pas de différence, entre aucun des groupes  DLFT C9 > DLFT spo DLFT GRN > DLFT spo  Contrôles = DLFT spo
Bourbouli 2017 (364)	ELISA : kit Cusabio	- 51 DLFT - 32 SLA - 17 contrôles	<b>4,1</b> (3,1 à 5,5) ng/ml <b>4,6</b> (3,5 à 6,2) ng/ml <b>3,5</b> (2,8 à 4,1) ng/ml	DLFT > contrôles SLA > contrôles

**Tableau IX** : Comparaison des concentrations de TDP-43 mesurée dans le LCS obtenu par ponction lombaire. La police violette concerne la mise en évidence de TDP-43 phosphorylée. \* Résultats exprimés en unité relative par rapport à un LCS servant d'EI. **Abbréviations** : ABC : anticorps polyclonal de chèvre « ab80608 » à épitope central (aa 256 à 269 ; Abcam, UK) ; ABN : anticorps monoclonal de souris « H00023435-M01 » issu du clone 2E2-D3 à épitope central (aa 205 à 222 ; Abnova, Taïwan) ; Ac : anticorps ; C9 : porteur d'une expansion répétée pathologique dans le gène *C9ORF72* ; DLFT : dégénérescence lobaire frontotemporale ; DLFT-TDP : DLFT associée à des inclusions de TDP-43 ; EI : étalon interne ; ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay* ; GRN : porteur d'une mutation dans le gène de la progranuline ; MP : maladie de Parkinson ; NA : non applicable ; nc : non commercial ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; PT 1 : anticorps polyclonal de lapin « 10782-2-AP » à épitope amino-terminal (aa 1 à 260 ; Proteintech, USA) ; PT 2 : anticorps monoclonal de souris « 60019-2-Ig » à épitope central (aa 203 à 212 ; Proteintech, USA) ; SA 409 : anticorps polyclonal de lapin « SAB4200223 » dirigé contre la TDP-43 phosphorylée en 409 (Sigma-Aldrich, USA) ; SA 409/410 : anticorps polyclonal de rat « 1D3 » dirigé contre la TDP-43 phosphorylée en 409/410 (Sigma-Aldrich, USA) ; SEP : sclérose en plaque ; SGB : syndrome de Guillain-Barré ; SLA : sclérose latérale amyotrophique ; spo : sporadique ; WB : western blot.

Si la concentration en TDP-43 dans le LCS des patients atteints de DLFT semble parfois être augmentée par rapport aux individus contrôles, une étude réalisée avec des patients caractérisés d'un point de vue immunohistologique, donc de diagnostic certain, a conclu au résultat inverse (362). Dans cette étude, la diminution de la TDP-43 chez des patients DLFT-TDP comparé à des individus contrôles a également été confirmée par l'analyse du LCS ventriculaire des sujets, collecté lors de leur autopsie. Cependant, la composition du LCS au niveau ventriculaire étant différente de celle au niveau lombaire, ces résultats sont difficilement transposables pour une utilisation en pratique clinique.

Les concentrations en TDP-43 globalement diminuées dans le LCS des patients atteints de DLFT, comparé aux patients atteints de SLA, pourrait être le reflet d'un processus neurodégénératif plus rapidement évolutif chez ces derniers. Cependant, une étude a montré que des concentrations basses en TDP-43 étaient plutôt corrélées à un temps de survie relativement réduit dans un contexte de SLA (360).

Au sein des DLFT, aucune différence de concentration en TDP-43 dans le LCS des patients DLFT-Tau et DLFT-TDP n'a été mise en évidence (362). D'autre part, aucune corrélation n'a été établie entre les concentrations de cette protéine et des mutations dans les gènes *C9ORF72* et *GRN* (361,363). Les valeurs de la TDP-43 dans le LCS ne semblent pas non plus influencées par l'intervalle de temps entre les premiers symptômes cliniques et la ponction lombaire, le score clinique des patients, leur âge, ou leur taux d'immunoglobulines de type G (Ig G) et d'albumine (358,364). Dans une seule étude, les concentrations en TDP-43 dans le LCS des sujets masculins étaient significativement plus élevées que chez les sujets féminins. Une telle observation a également été rapporté dans une autre étude, mais seulement sous forme de tendance (361,364).

Toutes les études quantitatives de la TDP-43 dans le LCS ont en revanche décrit un recouvrement important des valeurs entre les différentes cohortes. Ce recouvrement, et les conclusions contradictoires publiées, pourraient peut-être s'expliquer par un défaut de caractérisation immunohistologique des patients et par l'utilisation de kits ELISA (pour *Enzyme-linked immunosorbent assay*) manquant de standardisation, composés d'anticorps et de peptides recombinants différents pour les calculs des concentrations.

De rares études se sont également intéressées aux concentrations de la TDP-43 phosphorylée en position 409 ou 409/410 (p-TDP-43) dans un contexte de DLFT. Dans une étude, cette forme particulière de TDP-43 s'est révélée indétectable dans le LCS recueilli par ponction lombaire, indépendamment du diagnostic des sujets, peut-être en raison de concentrations trop faibles ou de difficultés préanalytiques. Les mêmes mesures effectuées dans le LCS ventriculaire des patients ont permis de conclure à une diminution des concentrations en p-TDP-43 dans ce fluide biologique, chez les patients atteints de MA et de DLFT-Tau par rapport aux contrôles. Cette diminution était observée uniquement sous forme de tendance non significative chez les patients atteints de DLFT-TDP (362). Dans une seconde étude, la p-TDP-43 a pu être détectée dans le LCS prélevé par ponction lombaire, mais aucune différence n'a été mise en évidence entre les sujets atteints de DLFT et les contrôles. Les quelques patients porteurs d'une mutation dans les gènes *C9ORF72* ou *GRN* présentaient cependant une concentration augmentée en p-TDP-43, comparé aux sujets atteints de DLFT sporadique et aux contrôles (363).

Si la composition protéique du LCS reflète généralement bien les événements cérébraux, son recueil nécessite la réalisation d'une ponction lombaire. Les complications graves liées à cette acte, notamment les méningites en cas de non-asepsie, sont exceptionnelles (365). De plus, avec les recommandations actuelles, les céphalées post-ponction ne se manifestent que chez environ 10 % des patients (366). Cependant, cela reste un acte invasif, qui ne permet pas d'envisager des prélèvements réguliers. De plus des variations dans la procédure de recueil du LCS peuvent avoir des répercussions sur les résultats des analyses (364,367).

Pour éviter d'avoir recours à la ponction lombaire, le sang est alors une alternative au LCS souvent envisagée. Ce fluide est cependant séparé du parenchyme cérébral par la barrière hémato-encéphalique (BHE) et du LCS par la barrière hémato-méningée (BHM). Un certain nombre d'échangeurs et de transporteurs actifs assurent le passage d'éléments entre ces trois compartiments, mais d'une manière générale, seule une petite fraction des protéines cérébrales est retrouvée dans la circulation sanguine (368–370). La TDP-43 a néanmoins été décrite dans le sang, sous forme libre ou incorporée dans des vésicules d'excrétion (220,371,372).

L'analyse qualitative de la TDP-43 plasmatique totale ou phosphorylée n'a été que peu explorée. Dans une étude, une identification par technique de WB a été réalisée à partir de plasmas de patients atteints de DLFT et de MA, ainsi que de contrôles. L'anticorps « H00023435-M01 » (Abnova, Taïwan), dirigé contre la forme totale de la TDP-43, révéla un profil de migration composé d'une bande unique de 43 kDa, uniquement pour les échantillons des patients atteints de DLFT ayant une concentration plasmatique élevée en TDP-43. Aucune bande n'a été mise en évidence pour les autres patients, ni pour les sujets contrôles (373). Dans une autre étude, l'identification par WB a été réalisée à partir de plasmas de patients atteints de DLFT-TDP, de DLFT-Tau ou de MA. Le même anticorps anti-TDP-43 « H00023435-M01 » (Abnova, Taïwan) a révélé un profil identique chez tous les sujets, composé d'une bande principale de 45 kDa, associé à une bande plus diffuse d'environ 55 kDa. L'anticorps « TIP-PTD-P02 » (Cosmobio, Tokyo) dirigé contre les fragments carboxy-terminaux de la TDP-43 phosphorylée en position 409/410, révéla également un motif unique pour tous les sujets, composé d'une bande principale de 45 kDa, associée à une bande plus fine de 25 kDa, pouvant correspondre à un fragment hyperphosphorylé de la TDP-43 (72). Une troisième étude de la TDP-43 issue du sang, a été réalisée à partir d'échantillons de sérum de patients atteints de DLFT, de SLA ou d'individus contrôles, en parallèle de la caractérisation qualitative de cette protéine dans le LCS des sujets. Les profils obtenus par technique WB étaient identiques entre les deux matrices et entre tous les patients (355).

L'analyse quantitative de la TDP-43 plasmatique a également été l'objet d'un certain nombre d'études, rapidement après sa mise en évidence en 2006 dans des inclusions cérébrales chez les patients DLFT-TDP, et aboutit à des résultats contrastés (tableau X).

Etude	Technique de mesure et anticorps	Cohortes	Densités optiques de la TDP-43 dans le plasma Moyenne (écart-type)	Différences statistiques
Foulds 2008 (373)	ELISA nc : - Ac ABN - Ac PT 1	35 DLFT	<b>0,26</b> (+/- 0,52)	DLFT > MA et contrôles et 46 % ont une DO > 0,11
		102 MA	<b>0,13</b> (+/- 0,33)	MA > contrôles et 22 % ont une DO > 0,11
		85 contrôles	<b>0,02</b> (+/- 0,32)	8 % ont une DO > 0,11
Foulds 2009 (72)	ELISA nc : - Ac ABN - Ac PT 1	28 DLFT :		DLFT = MA
		16 TDP +	<b>0,52</b> (+/- 0,35)	TDP + = TDP -
		12 TDP -	<b>0,34</b> (+/- 0,18)	
	24 MA :	08 MA TDP +	<b>0,40</b> (+/- 0,35)	MA TDP + = MA TDP -
		16 MA TDP -	<b>0,43</b> (+/- 0,34)	
ELISA nc : - Ac ABN - Ac CB 409/410	28 DLFT :		DLFT = MA	
	16 TDP +	1,31 (+/- 0,63)	Tendance : TDP + > TDP -	
	12 TDP -	1,07 (+/- 0,50)		
28 MA :	08 MA TDP +	1,03 (+/- 0,64)	MA TDP + = MA TDP -	
	16 MA TDP -	1,05 (+/- 0,75)		

Etude	Technique de mesure et anticorps	Cohortes	[TDP-43] dans le plasma Médiane (interquartiles)	Différences statistiques
Suarez-Calvet 2014 (363)	ELISA : kit PT - Ac PT 1 - Ac PT 2	10 DLFT C9	1,49 (1,01 - 7,23) *	DLFT C9 < DLFT spo
		5 DLFT GRN	0,76 (0,45 - 5,25) *	DLFT GRN < DLFT spo
		51 DLFT spo	5,90 (3,59 - 9,40) *	DLFT spo = contrôles
	ELISA : kit EIAab - Ac inconnu - Ac SA 409	22 contrôles	4,37 (3,19 - 6,93) *	Contrôles > DLFT C9 et GRN
		10 DLFT C9	1,57 (0,33 - 9,73) *	DLFT C9 > DLFT spo
		5 DLFT GRN	2,97 (1,01 - 8,71) *	DLFT GRN > DLFT spo
50 DLFT spo	0,12 (0,02 - 0,83) *			
22 contrôles	0,05 (0,00 - 0,28) *	Contrôles < DLFT C9 et GRN		

**Tableau X** : Comparaison des concentrations de TDP-43 mesurée dans le plasma de patients DLFT, MA et de cohortes de contrôles. La police violette concerne la mise en évidence de TDP-43 phosphorylée. \* Résultats exprimés en unité relative par rapport à un plasma servant d'EI. Il est à noter qu'aucune étude ne fournit véritablement des valeurs de concentration.

**Abréviations** : ABN : anticorps monoclonal de souris « H00023435-M01 » issu du clone « 2E2-D3 » à épitope central (aa 205 à 222 ; Abnova, Taïwan) ; Ac : anticorps ; C9 : porteur d'une expansion répétée pathologique dans le gène *C9ORF72* ; CB 409/410 : anticorps polyclonal de lapin « TIP-PTD-P02 » à épitope carboxy-terminal phosphorylé en position 409 et 410 (aa : 405 à 414 ; Cosmobio, Tokyo) ; DLFT : dégénérescence lobaire frontotemporale ; DLFT-TDP : DLFT associée à des inclusions de TDP-43 ; EI : étalon interne ; ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay* ; GRN : porteur d'une mutation dans le gène *Progranulin* ; NA : non applicable ; nc : non commercial ; PT 1 : anticorps polyclonal de lapin « 10782-2-AP » à épitope amino-terminal (aa 1 à 260 ; Proteintech, USA) ; PT 2 : anticorps monoclonal de souris « 60019-2-Ig » à épitope central (aa 203 à 212 ; Proteintech, USA) ; SA 409 : anticorps polyclonal de lapin « SAB4200223 » dirigé contre la TDP-43 phosphorylée en 409 (Sigma-Aldrich, USA) ; SLA : sclérose latérale amyotrophique ; spo : sporadique.

Dans la première étude, de façon intéressante, les pourcentages d'échantillons présentant des DO élevées (supérieures à 0,11) au sein des cohortes de patients atteints de DFLT (environ 50 %) et de MA (environ 20 %) correspondent aux pourcentages publiés dans la littérature, de patients présentant des inclusions cérébrales de TDP-43 dans ces populations. Une telle concordance a permis aux auteurs de supposer un lien entre les marqueurs histologiques et la concentration en TDP-43 plasmatique. Cependant, les patients étaient vivants au moment de l'étude et aucune confirmation immunohistologique n'a pu être apportée (373).

L'année suivante, la même équipe compléta cette première étude en incluant des patients atteints de DFLT et de MA confirmées par un diagnostic neuropathologique. La TDP-43 a été mesurée dans le plasma, dans sa forme totale et phosphorylée (p-TDP-43) (359). Une troisième étude s'intéressa également aux concentrations plasmatiques de la TDP-43 et de la p-TDP-43, chez des sujets atteints de DLFT porteurs de mutations dans les gènes *C9ORF72* et *GRN* (363) (tableau X). Dans ces trois études, de grandes variations de concentration en TDP-43 et en p-TDP-43 plasmatiques ont été mises en évidence au sein des cohortes, et la mesure de ces formes de TDP-43 n'a généralement pas permis de distinguer les patients atteints de DLFT et de MA, ni de distinguer ces patients de sujets contrôles. De plus, si les taux de ces deux formes de TDP-43 mesurés dans le plasma semblent plutôt bien corrélés entre eux, tant chez les malades que chez les contrôles, le sens de cette corrélation varie néanmoins d'une étude à l'autre. Il ressort également de ces études que l'âge au moment du prélèvement sanguin pourrait être positivement corrélé aux concentrations en TDP-43 plasmatique, mais inversement corrélé aux concentrations de p-TDP-43 dans cette matrice. Cet effet lié à l'âge n'est cependant pas toujours observé.

Au sein des DLFT, aucune différence significative de concentration en TDP-43, dans sa forme totale ou phosphorylée, n'a été rapportée entre les différents phénotypes cliniques ou entre les patients souffrant de DLFT avec ou sans inclusion de TDP-43. Chez ces derniers, une tendance à la hausse des taux de p-TDP-43 plasmatique a néanmoins été observée, et ces taux semblaient corrélés au degré de l'atteinte cérébrale (72). Dans une étude, malgré de grandes variations individuelles, les concentrations plasmatiques de cette forme de TDP-43 étaient globalement significativement plus élevées chez les patients porteurs de mutations, comparé à des patients sporadiques et des sujets contrôles. En revanche, aucune différence entre les patients porteurs de mutations dans les gènes *C9ORF72* et *GRN* n'a été mise en évidence (363).

En comparant les concentrations en TDP-43 mesurées dans sang et le LCS, aucune corrélation n'a pu être établie. Cependant, une telle corrélation semble exister pour la p-TDP-43, et pourrait alors signifier que cette dernière reflète dans une certaine mesure les événements pathologiques cérébraux rencontrés dans les DLFT. Cependant, la mesure des concentrations en TDP-43 dans ces deux fluides biologiques est globalement peu informative. Face aux limites des études de la TDP-43 dans le LCS et le sang, des tentatives de caractérisation de la TDP-43 dans des matrices moins conventionnelles ont alors été réalisées.

Dans un contexte de SLA pure, le déséquilibre de répartition de la TDP-43 entre le noyau et le cytoplasme des neurones est également observable dans les cellules mononuclées sanguines, surtout chez les patients présentant une mutation dans le gène *TARDBP* (374). Partant de ce constat, des analyses de répartition par technique de Dot Blot à partir de cellules mononuclées sanguines ont permis de distinguer les patients atteints de SLA d'individus contrôles, ces derniers présentant une TDP-43 statistiquement plus basse. De plus, une corrélation a été établie entre le niveau de TDP-43 cellulaire et la sévérité de la SLA (375).

Les exosomes présents dans le LCS pouvant contenir des protéines cérébrales, dont la TDP-43, une quantification en LC-MS/MS de la TDP-43 dans ces structures a été réalisée dans de petites cohortes de patients atteints de SLA ou de DLFT et d'individus contrôles. Cependant, aucune différence ne fut mise en évidence entre les sujets (355,376).

Les plaquettes sanguines constituent une troisième matrice biologique pour la mise en évidence de protéines d'origine cérébrale. En effet, d'un point de vue pratique, elles sont relativement faciles à isoler du sang total (377). De plus, bien que leur rôle principal soit d'assurer l'hémostase sanguine, il apparaît néanmoins qu'elles sont également impliquées dans d'autres mécanismes physiologiques, notamment cérébraux. L'action des plaquettes au niveau du système nerveux central (SNC) est possible notamment grâce à leur petite taille (entre 1 et 5  $\mu\text{m}$ ), qui leur permet de circuler dans les microcapillaires de la circulation cérébrale (378). Elles auraient en outre la capacité d'ouvrir transitoirement la BHE (206). Au niveau cérébral, elles peuvent communiquer avec d'autres types cellulaires, grâce à la production et/ou au stockage puis à la libération locale d'un grand nombre de molécules bioactives, dont des facteurs de croissance cellulaire, des molécules immunitaires ou encore des neurotransmetteurs (379).



L'intégration des plaquettes au sein du SNC est aussi facilitée par le fait qu'elles présentent des similitudes avec les neurones. En effet, ces deux types cellulaires partagent des mécanismes de transport et d'excrétion, et contiennent des granules de stockage de composition similaire (380,381). De plus, en cas des lésions vasculaires cérébrales, les échanges entre les neurones et les plaquettes se voient renforcés par la capacité de ces dernières à se fixer directement sur des structures glycolipidiques de la membrane neuronale (382).

Si les plaquettes sont un acteur important de l'homéostasie du SNC, leur dysfonctionnement pourrait alors être associé à certaines pathologies cérébrales (383). En effet, elles captent et libèrent beaucoup d'éléments impliqués dans de telles maladies :

Le facteur neurotrophique dérivant du cerveau (BDNF pour *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) et la sérotonine, tous deux stockés en grande quantité dans les plaquettes, jouent un rôle central dans la dépression (384). Un taux élevé de sérotonine dans le sang pourrait par ailleurs être un marqueur de l'autisme. Or, les granules de stockage des plaquettes constituent plus de 99 % des réserves sanguines de ce neurotransmetteur (385,386).

L'acide gamma-aminobutyrique (GABA pour *gamma-aminobutyric acid*), qui est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC, est également capté en grande quantité par les plaquettes, via des récepteurs similaires aux récepteurs neuronaux (387). Le dysfonctionnement du système « GABAérgique » est par ailleurs associé à diverses maladies neurodégénératives, dont la MA (388).

Le peptide beta-amyloïde de 42 acides aminés (Ab-42) est également un peptide au cœur de la physiopathologie de la MA. Suite à la synthèse importante de ce peptide dans les mégacaryocytes, les plaquettes pourraient être la première source d'Ab-42 dans le sang (389). L'hyperactivation de ces cellules pourrait alors participer à la progression de la maladie (383,390).

La TDP-43 étant présente dans des inclusions cérébrales chez environ 30 % des patients atteints de MA (72), une équipe de chercheurs a eu l'idée de doser la forme totale et phosphorylée de cette protéine, dans des lysats plaquettaires de patients. Après la réalisation de WB, une augmentation de presque 60 % de l'intensité de la bande principale a été mise en évidence chez les patients, comparé à des individus contrôles. Le diagnostic n'étant cependant pas confirmé par examen neuropathologique, il était impossible de vérifier s'ils présentaient tous des agrégats cérébraux de TDP-43 (391). Dans cette étude, des lysats plaquettaires ont aussi été analysés par un automate d'électrophorèse intégrant un système de détection automatisé des protéines (ProteinSimple, USA). Les profils électrophorétiques obtenus à l'aide d'un anticorps dirigé contre la TDP-43 phosphorylée en position 409/410 ont démontré que de la TDP-43 pouvait être détectée dans des lysats plaquettaires. De plus, ces profils se sont avérés différents entre les patients atteints de MA et les autres sujets. Il peut néanmoins paraître surprenant qu'aucune différence n'ait été observée au sein du groupe des autres sujets, composé d'individus sains et de patients atteints de SLA. En effet, des inclusions de TD-43 sont retrouvées dans 97 % des SLA (383). De plus, des dysfonctionnements et des changements morphologiques des mitochondries observés au niveau cérébral chez les patients atteints de SLA, sont aussi retrouvés au niveau des mitochondries plaquettaires (392–394). Enfin, des niveaux diminués en sérotonine sont observés dans le cerveau et la moelle épinière des patients, mais également dans leurs plaquettes (395,396).

Ces résultats concernant les patients atteints de SLA semblent néanmoins corroborés par une étude récente, dans laquelle des analyses par WB ont été réalisées à partir de lysats plaquettaires de patients atteints de SLA, en utilisant l'anticorps « 10782-2-AP » (Proteintech, USA) dirigé contre la forme totale de la TDP-43. Le profil de migration obtenu, composé d'une bande de 45 kDa et d'une bande non spécifique de masse apparente plus élevée, n'était pas différent entre les patients et les sujets contrôles. De plus si les concentrations plaquettaires en TDP-43, mesurées par une technique ELISA, étaient globalement plus élevées chez les patients que chez les individus contrôles du même âge, un recouvrement important des valeurs a aussi été observé (397).

A ce jour, aucune étude de caractérisation quantitative ou qualitative de la TPD-43 plaquettaire n'a été publiée dans un contexte de DLFT.

- ***Progranuline***

Chez les patients atteints de DLFT porteurs d'une mutation dans le gène *GRN*, une diminution de 25 à 40 % de la concentration de la progranuline a été mise en évidence dans le LCS comme dans le plasma, comparé aux patients atteints de DFLT sporadiques ou porteurs d'autres mutations. Cette diminution est alors mise à profit pour détecter les porteurs de mutations dans le gène *GRN*, de façon rapide et économique et avec une sensibilité et une spécificité de plus de 90 %, que les sujets soient symptomatiques ou non (354,398,399). Le fait de retrouver cette diminution chez les sujets présymptomatiques met par ailleurs en lumière la longue durée d'évolution silencieuse de ces maladies.

De plus, la mesure de la progranuline plasmatique permet de détecter des patients dont les mutations dans le gène *GRN* sont plus difficiles à mettre en évidence par les techniques classiques de génétique. Cela permet aussi d'avoir un argument supplémentaire pour la classification de pathogénicité lors de l'identification d'un nouveau variant pathogène. Aucune corrélation entre les concentrations en progranuline plasmatique et le degré d'atteinte cérébrale n'a été mise en évidence, limitant l'intérêt pronostic de ce dosage. En revanche, ces concentrations semblent peu varier au cours du temps (398).

Cette stabilité pourrait permettre d'évaluer l'efficacité de potentiels traitements augmentant la production de progranuline, comme les inhibiteurs des histone-désacétylases (400). De tels traitements sont porteurs d'un réel espoir thérapeutique, la progranuline étant un facteur de croissance qui promeut la survie des neurones et réduit la neuroinflammation (401). Depuis une dizaine d'années, des essais de molécules ont été menés. L'efficacité du traitement est alors suivie par la remontée du taux de progranuline plasmatique chez les sujets. Une des limites à ce dosage est néanmoins que les valeurs plasmatiques de cette protéine ne sont que modérément corrélées aux valeurs mesurées dans le LCS. Ainsi, les taux de progranuline plasmatiques ne seraient pas complètement le reflet de l'intensité de la neurodégénération (402).

- ***Protéines formées de dipeptides répétés***

Cinq protéines, issues des grandes expansions G4C2 du gène *C9ORF72* muté, ont été décrites dans la littérature. Fait remarquable, la traduction de l'ARNm codant pour ces protéines n'est pas initiée au niveau d'une séquence AUG (403). Ces protéines sont généralement retrouvées à de fortes concentrations au niveau cérébral, chez les patients atteints de SLA ou de DLFT porteurs d'un gène *C9ORF72* muté. Cependant, leur taux n'est pas corrélé au degré de l'atteinte cérébrale (404–406).

Dans le LCS, seule la protéine formée de séquences « glycine-proline » répétées (poly-GP) est actuellement détectable, probablement en raison de sa plus forte abondance et de sa solubilité (407). Le dosage de ce dipeptide pourrait alors être un outil spécifique de détection des patients porteurs de variants pathogènes dans le gène *C9ORF72*, notamment chez les sujets présymptomatiques (408,409). Cependant, il ne semble pas exister de corrélation entre les taux de poly-GP et l'âge d'entrée dans la maladie, ni entre ces taux et la sévérité de l'atteinte cérébrale ou la durée de survie des patients. Elle ne peut donc être envisagée comme un marqueur pronostic (408–410). Les concentrations en poly-GP semblant néanmoins constantes dans le LCS au cours du temps, cette protéine pourrait servir de marqueur d'efficacité thérapeutique d'oligonucléotides antisens ciblant les ARNm codant pour les protéines pathologiques. Ces éléments ont montré leur efficacité dans des cultures cellulaires humaines et chez des souris porteuses de mutations dans le gène *C9ORF72* (408,411).

### **3.3.2 Marqueurs protéiques indirects des DLFT**

- ***Peptide beta-amyloïde de 42 acides aminés et Tau p181***

Le peptide beta-amyloïde de 42 acides aminés (Ab-42) et la Tau phosphorylée en position 181 (p-Tau 181) sont deux marqueurs de première intention dans le cadre du diagnostic de la MA. Ils sont considérés comme spécifiques de cette pathologie, car ils reflètent des événements physiopathologiques qui lui sont propres. En effet, en cas de MA, l'Ab-42 est retrouvé diminué dans le LCS, en raison de son agrégation en plaques extraneuronales au niveau cérébral. A l'inverse, la p-tau 181 est augmentée dans ce fluide, traduisant une hyperphosphorylation spécifique de la protéine (21).

Ces marqueurs ont été étudiés dans un contexte de DLFT, afin d'améliorer le diagnostic différentiel entre ces pathologies et la MA. Dans le LCS, les patients atteints de DLFT présentent généralement des concentrations normales de ces deux marqueurs (412). Des concentrations pathologiques en Ab-42 et en p-Tau 181 seront plutôt le reflet d'une MA concomitante (413). Par ailleurs, les ratios p-Tau 181/Ab-42 élevé et Ab-42/p-Tau 181 diminué chez les patients atteints de MA permettent une meilleure distinction de cette pathologie et des DLFT, comparé à l'utilisation des marqueurs seuls (412,414,415). Les APP logopéniques font figure d'exception au sein des DLFT. En effet, dans la majorité des cas, l'Ab-42 et la p-Tau 181 seront mesurés à des concentrations typiques d'une MA biologique (305).

Au sein des DLFT, la mesure de l'Ab-42 et de la p-Tau 181 dans le LCS n'a pas permis de distinguer les différents phénotypes cliniques (354). La p-Tau 181 n'apparaît pas non plus significativement différente dans le LCS des patients atteints de DLFT-Tau et DLFT-TDP (416).

Une étude récente a cependant mis en évidence que les concentrations de cette forme particulière de protéine Tau pourraient être corrélées au degré d'atteinte cérébrale dans les DLFT-Tau (417). Aucune différence des concentrations de ces marqueurs n'a été observée entre les patients atteints de DLFT présentant des mutations dans les gènes *GRN* ou *MAPT* et les patients atteints de formes sporadiques. Plusieurs études ont cependant rapporté une diminution de concentration de l'Ab-42, d'intensité comparable à celle observée en cas de MA, chez 25 % des sujets atteints de SLA ou de DLFT, porteurs d'une mutation dans le gène *C9ORF72* (354,361,418). Quoiqu'il en soit, l'Ab-42 et la p-Tau 181 ne sont pas de bons marqueurs étiologiques des DLFT.

- ***Tau totale***

La tau totale (t-Tau) est le troisième biomarqueur de première intention de la MA (19). Cependant, elle n'est pas considérée comme une protéine spécifique de cette pathologie, ni des DLFT, car la concentration obtenue est celle correspondant à la mesure de plusieurs isoformes de la protéine. Une augmentation de la t-Tau reflète ainsi plutôt l'intensité de l'atteinte axonale, qui peut se produire dans diverses situations (354,364). Cette caractéristique peut expliquer que les concentrations en t-Tau dans le LCS des patients atteints de SLA apparaissent souvent comme supérieures à celles mesurées chez les patients atteints de DLFT (364).

Dans un contexte de MA, la t-Tau est augmentée de près de 300 % dans le LCS des patients, par rapport aux individus sains d'âges comparables (419). Cette forte augmentation permet généralement de distinguer les patients atteints de cette pathologie de ceux souffrant de DLFT (414). Par ailleurs, comme pour la p-Tau, l'interprétation des ratios t-Tau/Ab-42 augmenté et Ab-42/t-Tau diminué dans le LCS des patients atteints de MA permettent le diagnostic différentiel de cette pathologie et des DLFT, avec des valeurs de sensibilité et de spécificité proches de 90 % (413–415). Les APP logopéniques se démarquent néanmoins des autres types de DLFT. En effet, dans le LCS de ces patients, les valeurs de t-Tau seront similaires à celles mesurées en cas de MA biologique (305).

L'étude comparative des concentrations de la t-Tau chez des patients atteints de DLFT et des sujets contrôles a révélé des résultats contradictoires, alors que les kits de dosage ELISA provenaient presque toujours du même fabricant. En effet, dans le LCS des patients, elle peut être augmentée, diminuée ou identique aux valeurs mesurées chez des individus considérés comme sains (tableau XI) (364,420–422).

Au sein des DLFT, la t-Tau totale n'est pas toujours différente entre les sujets DLFT-TDP et DLFT-tau, bien qu'un ratio t-Tau/TDP-43 augmenté chez les sujets DLFT-TDP ait été décrit dans la littérature (354,362,416) (tableau XI). Chez ces derniers, il a également été décrit un ratio p-tau181/t-Tau diminué, comparé aux sujets atteints de DLFT-Tau et à des individus contrôles (362). Cependant, cette différence statistique semble être essentiellement médiée par les patients présentant des troubles moteurs associés, chez lesquels la lyse neuronale est généralement importante, comme en témoignent leurs concentrations élevées en t-Tau (305,421). Aucune différence constante de concentration de t-Tau dans le LCS des patients atteints de DLFT porteurs de mutations ou sporadiques n'a été rapportée (354).

Concernant sa mesure dans le plasma, la t-Tau apparaît augmentée chez les patients atteints de MA. Cependant, si les performances de ce dosage dans cette matrice ont énormément progressé dans les deux dernières années, elles ne sont actuellement pas suffisantes pour une utilisation en routine (423). Au sein des DLFT, la t-Tau plasmatique ne semble corrélée que faiblement aux concentrations retrouvées dans le LCS des patients et présente une demi-vie plus courte que dans le LCS (424).

Une étude a cependant décrit des concentrations augmentées de cette protéine dans le plasma de patients atteints de DLFT en comparaison d'individus contrôles, indépendamment de la symptomatologie clinique et des mutations génétiques portées par les malades. Néanmoins, un recouvrement important des concentrations entre les deux groupes a aussi été décrit (425). De plus, dans une étude plus récente cette différence n'a pas été retrouvée (426). A l'image de ce que l'on observe pour le dosage dans le LCS, la mesure de la t-Tau dans le plasma ne semble donc pas être un bon marqueur des DLFT.

Etude	Technique de mesure	Cohortes	[t-Tau] dans le LCS Moyenne (écart-type)	Différences statistiques
Grossman 2005 (422)	ELISA : Kit Fujirebio	31 bvFTD	<b>161</b> (+/- 137,2) ng/ml	DLFT = contrôles <b>Mais 1/3 des DLFT &lt; contrôles</b>
		11 APP NF	<b>187,8</b> (+/- 185,4) ng/ml	
		13 APP F	<b>459,7</b> (+/- 507,2) ng/ml	
		13 contrôles	<b>260,4</b> (+/- 93,8) ng/ml	
Etude	Technique de mesure	Cohortes	[t-Tau] dans le LCS Médiane (interquartiles)	Différences statistiques
Bourbouli 2017 (364)	ELISA : Kit Fujirebio	51 DLFT	<b>318</b> (213 – 437) ng/ml	<b>DLFT &gt; contrôles</b>
		32 SLA	<b>284</b> (235 – 396) ng/ml	SLA > contrôles
		17 contrôles	<b>201</b> (144 – 260) ng/ml	
Borroni 2015 (421)	ELISA : Kit Fujirebio	44 DLFT-TDP	<b>361,5</b> (212 - 511,6) ng/ml	DLFT-TDP > DLFT-Tau
		35 DLFT-Tau	<b>242,6</b> (126,2 - 318) ng/ml	
		49 contrôles	<b>221,8</b> (143,2 - 334) ng/ml	<b>Contrôles &lt; DLFT</b>
Irwin 2017 (417)	ELISA : Kit Fujirebio	49 DLFT-TDP	<b>45,5</b> (29 - 84,3) ng/ml	DLFT-TDP = DLFT-Tau
		31 DLFT-Tau	<b>44,2</b> (30 - 67) ng/ml	
Goossens 2018 (420)	ELISA : Kit Fujirebio	46 DLFT	<b>320</b> (219 - 420) ng/ml	DLFT = contrôles
		20 contrôles	<b>257</b> (173 - 381) ng/ml	

**Tableau XI** : Exemples des valeurs de t-Tau dans le LCS retrouvés dans la littérature. **Abréviations** : APP : aphasie primaire progressive ; APP F : APP fluente ; APP NF : APP non-fluente ; bvFTD : *behavioral variant frontotemporal dementia* ; DLFT : dégénérescence lobaire frontotemporale ; DLFT-Tau : DLFT associée à des agrégats de protéine *Tubule associated unit* ; DLFT-TDP : DLFT associée à des agrégats de *TAR DNA-binding protein of 43 kDa* ; ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*.

- ***Neurofilaments***

Les neurofilaments sont des filaments intermédiaires (diamètre de 10 nm), retrouvés essentiellement au niveau des axones des neurones, constituant le cytosquelette de ces cellules par l'association entre les MTU (diamètre de 15 nm) et les microfilaments (diamètre de 6 nm). Ils sont ainsi impliqués dans la croissance radiale des axones, le maintien de leur calibre, le fonctionnement du transport axonal et plus généralement dans le bon développement des neurones (427). Dans les maladies neurologiques associées à une dégénérescence axonale, ces protéines sont libérées dans le milieu interstitiel, d'où elles pourront rejoindre le LCS et dans une moindre mesure le sang (370).

Les neurofilaments à chaîne légère (NfL pour *neurofilament light chain*), qui représentent la plus abondante sous-unité des neurofilaments, sont des protéines très prometteuses en tant que biomarqueur des DLFT (428). En effet, dans la littérature les NfL sont retrouvés augmentés de façon très significative dans le LCS et le plasma des patients comparé à des sujets contrôles, quel que soit le phénotype clinique (429). Les NfL étant libérés indépendamment de l'origine des lésions axonales, ils sont par conséquent également augmentés dans les maladies neurodégénératives associées aux DLFT, comme la PSP, la SCB et la SLA (430–432). Ils sont également augmentés dans la MA, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaque ou la maladie de Huntington (426,433–436). L'augmentation des NfL semble cependant statistiquement plus importante dans les DLFT que dans certaines autres pathologies, dont la MA (437).

Cette augmentation semble par ailleurs bien corrélée au degré de l'atteinte de la substance blanche, mise en évidence par ITD, généralement également plus importante dans les DLFT que dans la MA (319). A l'échelle individuelle, des recouvrements importants dans les concentrations des NfL entre les différents groupes diagnostics limitent toutefois leur intérêt dans le diagnostic différentiel des DLFT et de la MA (438–440).

Les NfL sont également augmentés dans des pathologies non neurodégénératives, comme les accidents vasculaires cérébraux, les traumatismes crâniens ou encore les arrêts cardio-respiratoires (441–443). En revanche, dans des études très récentes, il a été mesuré des concentrations normales dans les fluides biologiques des patients atteints de MPP, permettant d'envisager ces protéines comme un outil d'aide au diagnostic différentiel de ces troubles et des DLFT (444–446).



Au sein des DLFT, les NfL ne semblent pas de bons marqueurs pour différencier les sous-types cliniques, car des concentrations similaires ont été rapportées chez des sujets bvFTD et atteints d'APP fluente ou non fluente (447). Des concentrations élevées en NfL dans le LCS de patients atteints de DLFT-TDP ont été rapportées, comparé à des patients atteints de DLFT-Tau (426). Cette différence statistique pourrait néanmoins être médiée par les DLFT-TDP associées à une SLA, qui présentent généralement des taux très importants de NfL en raison d'une lyse axonale intense (448–450). Enfin, parmi les sous-groupes génétiques, il semblerait que les concentrations en NfL soient plus élevées dans le LCS des porteurs de mutation dans le gène *GRN* en comparaison des patients présentant une mutation dans le gène *C9ORF72* ou des cas sporadiques (420,449). Elles apparaîtraient également plus basses que chez les porteurs de mutations dans le gène *MAPT* (449,451).

Dans les maladies neurodégénératives, les taux de NfL dans le LCS ou le sang semblent bien corrélés au degré d'atteinte axonale, au taux d'atrophie cérébrale, à la vitesse de progression de la maladie et au temps de survie des patients. Ces protéines pourraient donc être utilisées comme marqueur pronostic et de suivi des pathologies (426,450,452,453). Les NfL pourraient aussi être des témoins précoces d'entrée dans la maladie, car une augmentation discrète de leur concentration précédant d'un à deux ans les premiers symptômes cliniques a été décrite dans un contexte de DLFT (449). Enfin, ils pourraient permettre d'évaluer l'efficacité de potentiels traitements. En effet, une décroissance de leur concentration a été observée chez des patients souffrant de sclérose en plaque, après l'administration d'un traitement anti-inflammatoire (454).

Les NfL sont les neurofilaments les plus étudiés dans diverses pathologies cérébrales, notamment en raison de leur abondance relative facilitant leur mesure. Cependant, des travaux ont également été conduits afin d'évaluer l'intérêt des formes phosphorylées des neurofilaments à chaîne lourde (pNfH pour *phosphorylated neurofilament heavy chain*), notamment parce qu'indépendamment de la pathologie, les NfL et les pNfH semblent relativement bien corrélés entre eux dans le LCS et que les concentrations en pNfH pourraient être moins dépendantes des variables préanalytiques que celles des NfL (455,456).

Chez les patients atteints de SLA, une augmentation des concentrations en pNfH comparé à des sujets contrôles a été rapportée, tant dans le LCS que dans le plasma (456,457). Les valeurs des pNfH dans ces deux matrices biologiques semblent par ailleurs bien corrélées dans cette pathologie (457,458).

Quelques études publiées dans un contexte de DLFT, présentent des résultats préliminaires contrastés. En effet, des concentrations accrues en pNfH dans le LCS de sujets atteints de DLFT, comparé à des sujets contrôles, ont parfois été observées (457,459). Cette augmentation ne semble cependant pas systématique (460,461). Les concentrations en pNfH plasmatique pourraient néanmoins être corrélées aux concentrations mesurées dans le LCS des patients atteints de DLFT (457). La valeur ajoutée du dosage des pNfH dans ce contexte, notamment vis-à-vis des NfL, nécessite ainsi d'être encore étudiée.

## **OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE**

Les DLFT, qui représentent la deuxième cause de troubles neurocognitifs dégénératifs chez l'adulte de moins de 65 ans, sont hétérogènes d'un point de vue clinique et peuvent présenter des recouvrements symptomatologiques avec d'autres maladies neurodégénératives mais aussi avec des pathologies psychiatriques primaires. Elles se caractérisent par la présence d'agrégats protéiques cérébraux composés principalement de protéine Tau ou de TDP-43. Les classifications diagnostiques développées combinent des critères cliniques, d'imagerie, neuropsychologiques et biologiques, permettant d'effectuer un diagnostic possible, probable ou certain. En dehors de l'examen neuropathologique, la certitude diagnostique peut être établie uniquement par l'identification d'un variant moléculaire pathogène. Concernant les formes sporadiques, aucun biomarqueur protéique étiologique n'est aujourd'hui disponible. Malgré une littérature riche sur le potentiel intérêt de la TDP-43 dans les fluides biologiques, les résultats des études restent aujourd'hui contrastés.

Dans ce contexte, le but de ce travail de thèse était de développer des anticorps dirigés contre la TDP-43 afin de disposer d'outils potentiellement plus spécifiques et sensibles pour mettre en évidence un profil qualitatif spécifique des formes pathologiques dans différentes matrices biologiques.

Dans un premier temps, de nouveaux anticorps anti-TDP-43 ont été synthétisés, dirigés contre la forme totale de la protéine ou contre une de ses formes phosphorylées. Ils ont alors été caractérisés sur des échantillons cérébraux.

Ensuite, ces anticorps ont été utilisés pour décrire les profils qualitatifs de la TDP-43 dans différentes matrices biologiques humaines, et leurs performances ont été comparées aux principaux anticorps de la littérature. Pour cela, une méthode spécifique a notamment été développée, faisant appel à une technologie automatisée et miniaturisée dérivant du Western Blot.

Enfin, une analyse quantitative de la TDP-43 et de marqueurs non spécifiques des DLFT a été réalisée par technique SiMoA. Cette technologie ultrasensible nous a permis de mesurer ces protéines dans des échantillons couplés de LCS et de plasma.

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

**PARTIE A :**

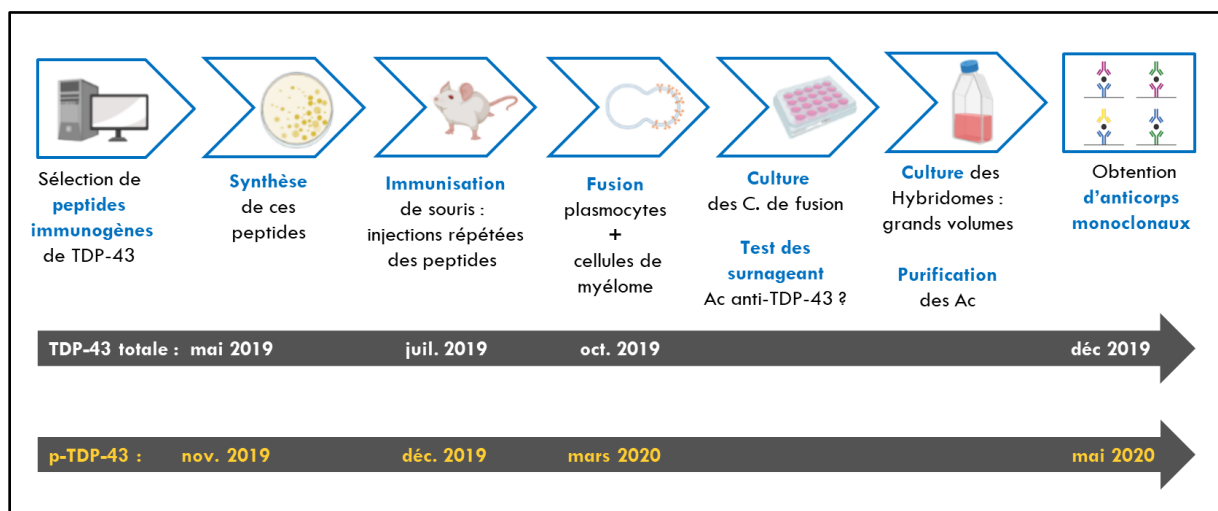
**SYNTHESE DE NOUVEAUX ANTICORPS ANTI-TDP-43 ET CARACTERISATION SUR PRELEVEMENTS CEREBRAUX**

# 1. Synthèse des anticorps

L'identification en 2006 de la TDP-43 dans des inclusions cérébrales « ubiquitine positives, Tau et alpha-synucléine négatives » chez des patients atteints de DLFT, eu comme conséquence la production biotechnologique de plusieurs dizaines d'anticorps, dirigés contre la forme totale de la protéine, contre l'une de ses extrémités ou contre certaines de ses formes phosphorylées (158). Cependant, les tentatives de caractérisation de la TDP-43 avec ces anticorps, dans les fluides biologiques des patients se sont révélées peu concluantes. Une des raisons de cet insuccès pourrait être le manque de sensibilité ou de spécificité des anticorps disponibles (220).

L'un des objectifs de cette thèse était alors de synthétiser de nouveaux anticorps anti-TDP-43. La méthode employée, décrite par Köhler *et al* en 1975, permet par la fusion d'un lymphocyte B activé et d'une cellule myélomateuse, d'obtenir une cellule capable de se multiplier indéfiniment en culture et de sécréter un anticorps ciblant un antigène préalablement choisi (462). Cette découverte leur a valu le prix Nobel de médecine en 1984.

L'ensemble du développement réalisé dans le cadre de cette thèse, depuis la sélection *in silico* des peptides immunogènes jusqu'à l'obtention d'anticorps monoclonaux purifiés, a été effectué au cours d'une année passée en Allemagne. Ce projet a été réalisé grâce au partenariat existant entre le Centre de recherche en neurosciences de Lyon, la société de biotechnologie Roboscreen GmbH et l'institut Paul Flechsig pour la recherche sur le cerveau, tous deux basés à Leipzig (figure 32).



**Figure 32 :** Principales étapes réalisées pour le développement de nouveaux anticorps anti-TDP-43 totale et phosphorylée.

## 1.1. Matériels et méthodes

### 1.1.1 Sélection et synthèse des peptides immunogènes

La sélection des peptides à synthétiser a été effectuée par outil informatique. En effet, de nombreux logiciels permettent d'appréhender le pouvoir immunogène des différentes séquences peptidiques composant une protéine (463,464). Dans ce travail, une liste de plusieurs peptides a été proposée par le logiciel « BepiPred-2.0 », créé en 2017 et qui semble démontrer de bonnes performances prédictives en comparaison d'outils moins récents. Il s'agit d'un logiciel édité par le département de biologie et d'informatique en santé de la faculté technique du Danemark, présentant la particularité de fonder ses prévisions sur le croisement aléatoire de plusieurs algorithmes, eux-mêmes basés sur l'analyse de la structure en trois dimensions des protéines. Les épitopes sont ainsi principalement déterminés en fonction de la structure secondaire des peptides, de la structure tertiaire de la protéine dans son ensemble et de l'accessibilité présumée de certains acides aminés (465). Deux parties d'un épitope pouvant ne pas être situées côte-à-côte dans la structure linéaire de la protéine, on parle alors d'épitope « discontinu ».

La liste des peptides obtenue par cet outil a ensuite été affinée, par l'analyse des séquences en acides aminés des candidats par le logiciel « Bepipred 1.0 », avec lequel chaque acide aminé de la protéine se voit attribuer un score, qui dépend de ses propriétés physicochimiques et de celles de ses voisins. Si plusieurs acides aminés de score élevé sont regroupés, on peut envisager que cette séquence soit un épitope dit « continu » (466).

Il a alors été effectué une comparaison des épitopes continus et discontinus de la TDP-43, ainsi qu'une sélection des peptides en fonction de leur longueur. En effet, plus ceux-ci sont longs, meilleure sera leur immunogénicité. Un seuil de 1 kDa a ainsi été défini pour qu'un peptide soit ou non immunogène, soit environ 10 peptides (467). Cependant, la taille peut aussi être un handicap, en permettant l'adoption par les peptides d'un nombre plus important de conformations chez l'animal, qui ne seront pas forcément retrouvées chez l'homme. Ce dernier point nous a alors incité à sélectionner essentiellement des peptides de moins de 15 acides aminés. L'affinage a enfin consisté à écarter des peptides trop proches de ceux utilisés pour la synthèse des anticorps commerciaux, peu satisfaisants pour des travaux effectués à partir de fluides biologiques humains (158).



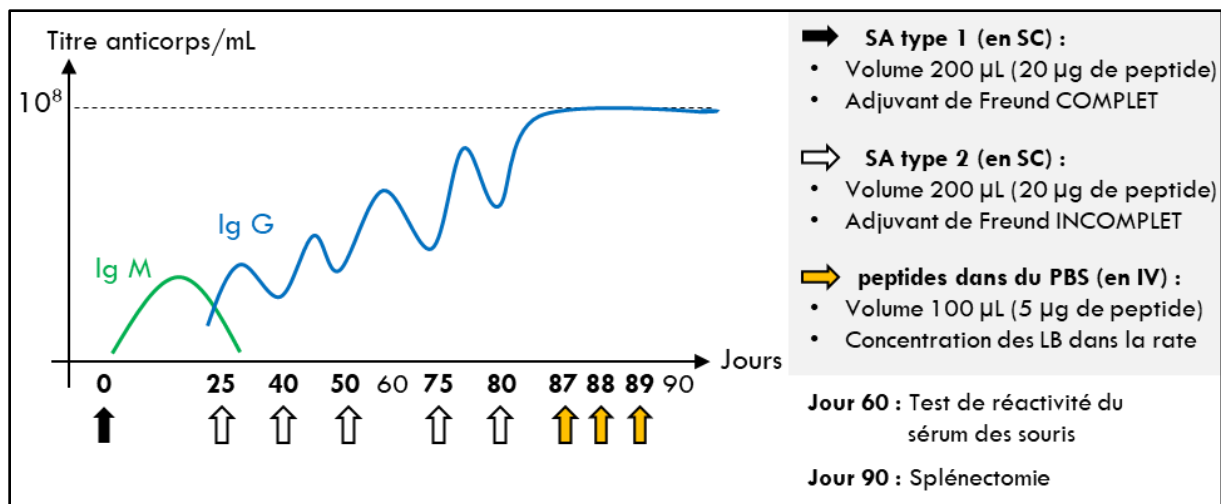
Finalement, la synthèse de trois peptides par la technique de synthèse en phase solide a été confiée à l'équipe de l'institut Paul Flechsig (468). L'un d'entre eux a été phosphorylé en position 409 et 410, car cette double phosphorylation est décrite comme pathologique dans la littérature (469).

### **1.1.2 Immunisation des souris**

Après la production et l'obtention des peptides de synthèse, ceux-ci ont été conjugués à l'hémocyanine de patelle (KLH pour *Keyhole Limpet Hemocyanin*) (Thermo Fisher, USA), en respectant le protocole établi par le fabricant. Cette opération avait pour but de stimuler la réponse immunitaire des souris contre ces peptides relativement courts, en augmentant artificiellement leur taille apparente pour le système immunitaire des animaux, cette molécule pouvant porter jusqu'à huit peptides. De plus, la KLH est elle-même immunogène, par stimulation des lymphocyte T helper.

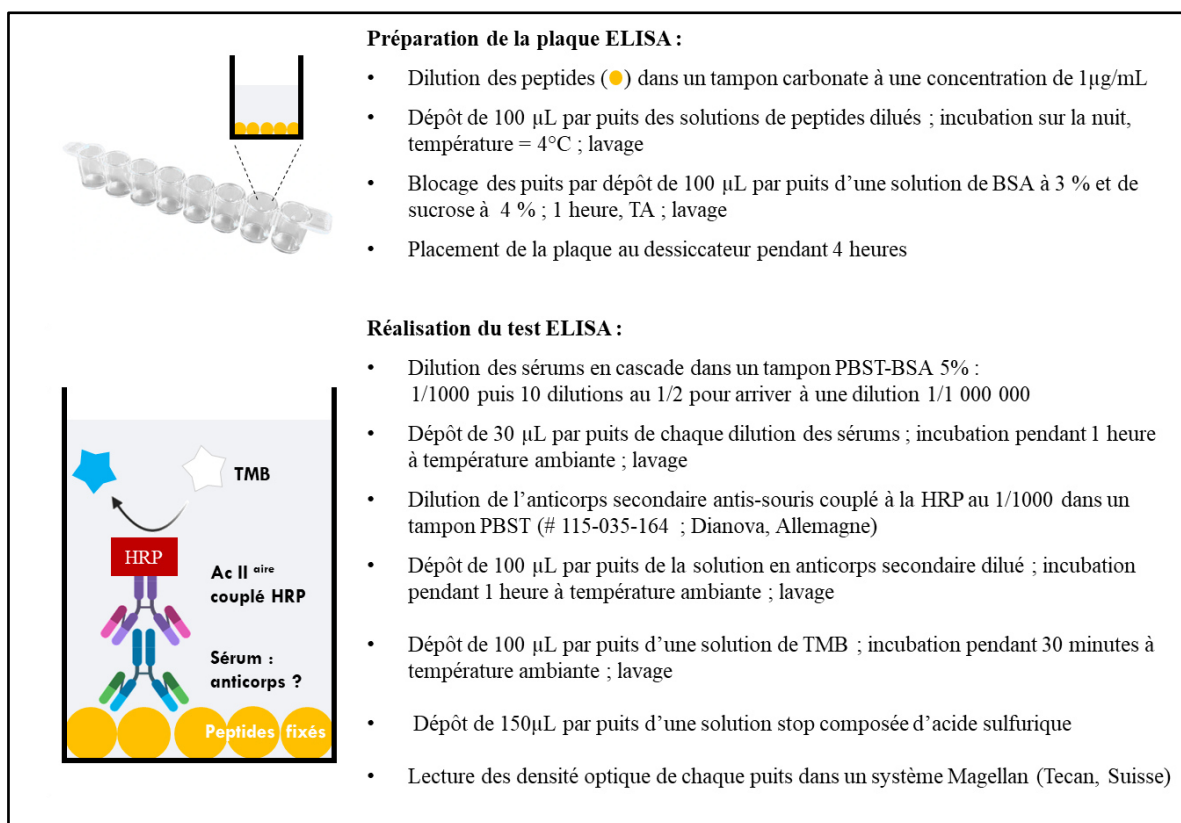
La réponse immunitaire a également été davantage stimulée grâce au solvant d'injection, utilisé volume à volume avec l'antigène. Cet « adjuvant de Freund » est composé d'huile minérale et d'un détergent, qui facilitent la dispersion des phases aqueuses et huileuses et permettent alors la formation d'émulsions. Qualifié d'« incomplet » avec cette composition, il peut aussi être « complet » en cas d'ajout de *Mycobacterium tuberculosis* ou *butyricum* inactivées. Dans les deux cas, la formation d'émulsion avait pour but d'augmenter la persistance des antigènes chez les souris, en les protégeant des protéases. De plus, cet adjuvant a stimulé les cellules réticulo-endothéliales des animaux, attiré les cellules mononuclées de l'immunité au niveau du site d'injection et accéléré la circulation des lymphocytes, augmentant alors la probabilité de contact avec l'antigène (470).

Pour chaque peptide, il a été injecté de manière répétée un volume de 200  $\mu$ L par voie intrapéritonéale à quatre souris BALB/c, représentant une quantité de 20  $\mu$ g d'antigène. Cette voie présente l'avantage d'être facile d'accès et peut être employée avec n'importe quel type d'adjuvant (figure 33).



**Figure 33 :** Chronologie de l'immunisation des souris. **Abbréviations :** Ig : Immunoglobulines ; IV : voie intraveineuse ; LB : lymphocytes B ; PBS : tampon phosphate salin ; SA : Stimulation antigénique par injection de peptide ; SC : voie sous-cutanée.

Quelques jours après la quatrième injection, un test de réactivité du sérum des souris a été réalisé, afin d'avoir une première estimation du succès de l'immunisation. Ce test a été réalisé par un dosage ELISA en plaque de 96 puits, au fond desquels le peptide d'intérêt a été fixé (figure 33 et 34).



**Figure 34 :** Réalisation du test de réactivité des sérums des souris après la quatrième injection. **Abbréviations :** BSA : albumine de sérum de bœuf ; HRP : peroxydase de raifort ; PBST-BSA 5 % : tampon phosphate salin contenant 0,1 % de twin et 5 % d'albumine de sérum de bovin ; TA : température ambiante ; TMB : 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine.

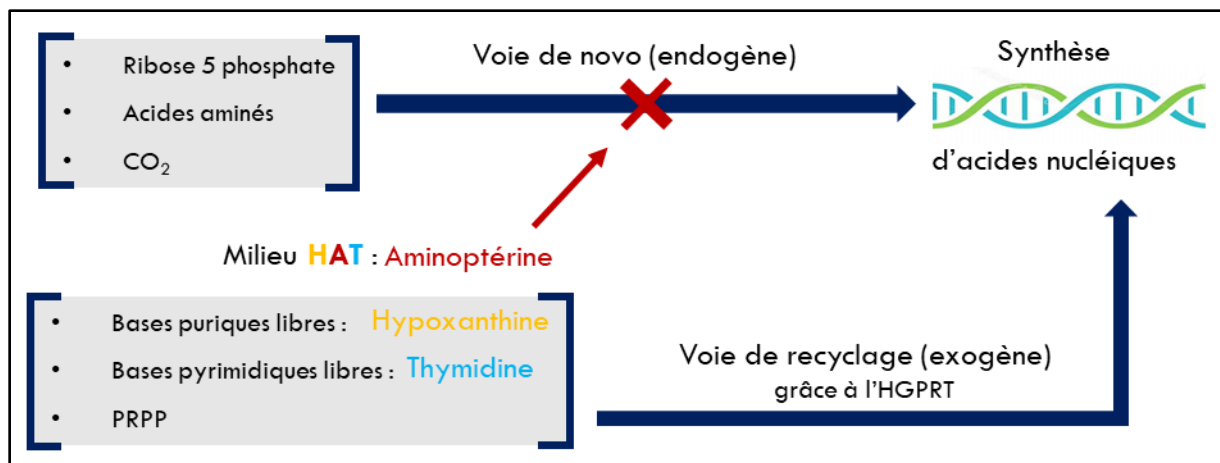
Pour chaque peptide, seules les deux souris sur les quatre ayant la meilleure immunisation ont poursuivi l'expérience. Dans les jours précédents la récupération de la rate de ces animaux, trois injections intraveineuses des peptides solubilisés dans une solution de PBS (pH = 7,4) ont été réalisées, afin de concentrer les lymphocytes B dans cet organe (figure 33).

En parallèle, il a été initié une culture de cellules myélomateuses « X63 Ag8.653 » de souris, pour permettre par la suite leur fusion avec les lymphocytes B des souris immunisées. Les cellules décongelées ont été placées dans une bouteille de 250 cm<sup>2</sup> de surface de culture, contenant 40 ml de milieu « hybridoma fusion and cloning supplement » (HFCS ; Sigma Aldrich, USA) supplémenté par 10 % sérum fœtal de veau (SFV), 10 % de L-glutamine et des acides aminés. Cette bouteille a alors été placée dans un incubateur. Un jour après la décongélation, il a été effectué un contrôle au microscope de l'aspect et du nombre des cellules. Après quatre jours de culture des cellules X63 Ag8.653, elles ont été réparties dans trois bouteilles de 250 cm<sup>2</sup> de surface de culture, contenant 40 mL de milieu HFCS enrichi de 5 % de SFV et de L-glutamine.

Dans une des trois bouteilles, il a été ajouté 5 mL de milieu HFCS supplémenté en hypoxanthine, aminoptérine et thymidine (milieu HAT ; Sigma-Aldrich, USA), afin de vérifier que les cellules myélomateuses ne pouvaient pas se multiplier dans un tel milieu. En effet, après la fusion, il ne faut pas que des cellules non fusionnées à multiplication rapide poursuivent leur croissance, car elles masqueraient la présence de jeunes cellules de fusion potentiellement obtenues.

Pour éviter ce phénomène, les cellules myélomateuses X63 Ag8.653 sont déficientes en hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase (HGPRT), impliquée dans la voie de recyclage de la synthèse de l'ADN. La seconde voie de synthèse des acides nucléiques, dite « de novo », étant bloquée par l'aminoptérine, les cellules myélomateuses ne pourront alors plus synthétiser d'ADN, freinant ainsi leur multiplication (figure 35).

La présence de l'hypoxanthine et de la thymidine permettra de s'assurer que les cellules de fusion pourront quant à elles synthétiser de l'ADN par la voie de recyclage de manière optimale.



**Figure 35 :** Les deux voies de synthèse possible pour l'ADN dans les cellules, et action du milieu HAT. **Abréviations :** HGPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase ; PRPP : phosphoribose 5 pyrophosphate.

### 1.1.3 Fusion des lymphocytes B et des cellules myéломateuses murines

Dans un premier temps, pour déterminer le nombre de cellules myéломateuses cultivées, les cultures cellulaires ont été transférés des bouteilles de culture à des tubes Falcon de 50 mL. Ensuite, 10  $\mu$ L du mélange recueilli ont été déposés dans une puce et un colorant ne marquant que les cellules mortes a été ajouté volume à volume. Le comptage des cellules X63 Ag8.653 vivantes/ $\text{mm}^2$  a alors été réalisé au microscope, permettant d'estimer le nombre de cellules/mL dans la culture par un simple calcul (nombre de cellules comptées/ $\text{mm}^2 \times 2 \times 10\ 000$ ).

Ensuite, les lymphocytes B activés ont été récupérés. Pour ce faire, les souris ont été anesthésiées par de l'éther, puis sacrifiées par luxation des cervicales. Après une désinfection complète de l'animal à l'éthanol et la découpe de la fourrure de l'abdomen puis du péritoine, la rate de chaque animal a alors été récupérée. En effet, il s'agit d'un organe lymphoïde périphérique de relativement grande taille, donc facile à prélever et riche en lymphocytes, qui s'activent localement par contact avec l'antigène. Cet organe a été broyé dans un micro-tamis et les cellules récupérées dans du milieu « Roswell Park Memorial Institute » (RPMI 1640 ; Thermo Fisher, USA). Les lymphocytes activés ont alors été dénombrés au microscope, après coloration des cellules mortes. Parmi l'ensemble des cellules spléniques, ils présentent une taille jusqu'à deux fois supérieure aux autres, car la stimulation antigénique active le cycle cellulaire. Ceci a permis de déterminer le volume de culture de cellules myéломateuses à prélever, car il est nécessaire d'appliquer un ratio de 1:5 en faveur des plasmocytes, pour éviter au maximum les fusions entre cellules myéломateuses.

Dans un tube Falcon de 50 ml, il a alors été mélangé l'intégralité des cellules issues de la rate des souris et une quantité cinq fois moins importante de cellules myélomateuses. Le volume final a été ajusté à 50 mL avec du milieu RPMI 1640. Afin de débarrasser le milieu des protéines qui pourraient gêner la fusion, trois centrifugations successives de 5 minutes à 400 G ont été réalisées, entrecoupées de l'évacuation du surnageant et du remplissage du tube par 50 mL de milieu RPMI 1640. Après la dernière centrifugation, le tube débarrassé de son surnageant a été placé dans un bain-marie à 37°C.

La fusion a été réalisée par ajout de polyéthylène glycol (PEG) (Roche Diagnostic, Allemagne) également chauffé à 37°C. Il s'agit d'une substance qui agit par réduction drastique de la distance entre les cellules, par abolition de la barrière hydrique qui existe naturellement entre elles. De plus, il induit une déstabilisation des bicouches lipidiques formant les membranes cytoplasmiques et nucléaires (471). Ces dernières, qui assurent une certaine protection à la cellule vis-à-vis de l'environnement extérieur et permettent la conservation du patrimoine génétique, empêchent normalement les fusions cellulaires.

A trop forte concentration, ou en cas d'exposition trop longue, le PEG est néanmoins toxique pour les cellules (472). Sa teneur doit ainsi être contrôlée tout au long du process, pour préserver l'intégrité des membranes fusionnées et ainsi obtenir des cellules de fusion viables. Il a ainsi été déposé 0,25 mL de PEG en 15 secondes, associé à une agitation qui s'est poursuivie pendant 90 secondes. Ensuite, du milieu RPMI 1640 a été ajouté pour diluer le PEG, à raison de 0,25 mL en 15 secondes, puis 1 mL en 1 minute, puis 3 mL en 1 minute, puis 16 mL en 80 secondes, toujours sous agitation, réalisée de la main ne tenant pas la pipette servant aux dépôts.

Le respect strict des temps indiqués ont permis d'optimiser les chances d'obtenir des hétérocaryons qui, après mitose, donneront naissance à des cellules hybrides à noyau unique, rassemblant tout ou une partie du matériel chromosomique des deux cellules parentales. Pour isoler le PEG des cellules fusionnées, le tube les contenant a été centrifugé pendant 10 minutes à 300 G. Ensuite, le tube a été placé au bain-marie à 37°C pendant 5 minutes. Pendant la centrifugation, le milieu de culture des cellules de fusion a été préparé, à partir de milieu HFCS supplémenté par 1% de SFV, 1% de L-glutamine et 1 % d'antibiotiques. Il a également été ajouté 2% de milieu HAT. Ce milieu de culture a alors été ajouté au culot contenant les potentielles cellules de fusion débarrassé du surnageant.

Enfin, il a été réalisé le remplissage de plaques de 96 puits. Pour chaque souris, douze plaques ont été nécessaires. Dans un premier temps, un volume de 200 µl de PBS stérile supplémenté par 0,1 % de NaOH a été déposé dans les puits bordants la plaque, afin d'assurer une bonne hygrométrie aux cultures et inhiber les infections. Ensuite, 100 µL du milieu contenant les cellules fusionnées ont été distribués dans chaque puits. Les plaques ont alors été placées dans l'incubateur réglé à 8 % de CO<sub>2</sub>. où elles y sont restées deux jours sans autre manipulations.

#### **1.1.4 Culture cellulaire post-fusion et test des surnageants**

Suite à la fusion, les cellules ont été laissée dans l'incubateur pendant deux jours. Ensuite, le milieu de culture a été changé régulièrement, par aspiration délicate du surnageant et remise de 100 µL de milieu HFCS associé à 2 % de SFV, 2 % de milieu HAT, 1 % de L-glutamine et 0,5 % d'antibiotiques. Il a également été effectué un contrôle régulier de l'aspect des cellules au microscope.

En parallèle, il a été réalisé la récupération des macrophages d'une souris, puis leur culture. Pour cela, un animal a été sacrifié suivant les mêmes modalités que précédemment.

Cependant, le péritoine n'a pas été ouvert et 5 mL de milieu HFCS ont été injectés par voie intrapéritonéale, sans percer aucun organe. Après plusieurs cycle d'aspiration et de refoulement, ces 5 mL de milieu HFCS alors concentrés en macrophages ont été réaspirés et transférés dans un bécher stérile. L'opération a été répétée une deuxième fois. Il a alors été ajouté, de la L-glutamine et des antibiotiques aux 10 mL de milieu récupérés. Ensuite, 50 µL par puits ont été déposés dans des plaques de 96 puits, sauf dans les puits périphériques préalablement remplis par 200 µl de PBS stérile supplémenté par 0,1 % de NaOH.

Après quelques jours, les macrophages ont été transférés dans des plaques de 24 puits, dans un milieu de culture similaire. Les volumes déposés dans les puits étaient de 300 µL. Au bout d'une semaine, les macrophages ont été récupérés et transférés dans une bouteille stérile. Il a été ajouté au milieu 5 % de SFV, 1 % de L-glutamine, 2% de milieu HAT et 0,5 % d'antibiotiques. Un volume de 50 µL de ce mélange a alors été ajouté à chaque puits contenant les cellules de fusion. Les macrophages permettent en effet de nettoyer les milieux de culture et sécrètent de l'interleukine 6 (IL-6) qui stimule la croissance cellulaire.

Après cinq jours de pousse des cellules de fusion en présence de macrophages, des tests du surnageant en ELISA ont été réalisés, afin d'évaluer la capacité des cellules à produire des anticorps anti-TDP-43 ou anti-p-TDP-43. Pour ce faire, 100  $\mu$ L de surnageant de chaque puits ont été transférés dans des plaques de 96 puits, pour y être dilués au demi dans du PBST-BSA 5 %. Ensuite, 100  $\mu$ L des surnageants dilués ont été incubés pendant une heure et à température ambiante dans des plaques 96 de puits, au fond desquels un peptide ayant servi à immuniser les souris était adsorbé. Après le lavage des puits, il a été ajouté 100  $\mu$ L d'anticorps secondaires couplé à la HRP et dilué au 1/1000. L'incubation d'une heure à température ambiante de cet anticorps s'est suivie du lavage des puits, puis de l'ajout de 100  $\mu$ L d'une solution de TMB, elle-même incubée 30 minutes avant ajout de 150  $\mu$ L d'une solution stop. Il a alors été réalisé la lecture de la densité optique (DO). En effet, la réaction colorimétrique de la transformation du TMB en son produit, catalysée par la HRP, présente une intensité proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans le surnageant. Un seuil de DO égale ou supérieure à 1,5 a été fixé pour sélectionner les puits d'intérêt.

Ces tests se sont suivis d'une expansion de la culture des cellules jugées intéressantes. Pour cela, le contenu des puits sélectionnés a été aspiré, puis disposé dans des puits de plaque de 24 puits. Il a alors été ajouté 400  $\mu$ L de milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de SFV, 1 % de L-glutamine et 0,5 % d'antibiotiques. Il a également été ajouté 1 % d'hypoxanthine et de thymidine. Il n'était plus nécessaire de leur associer l'aminoptérine, car les cellules déficientes en HGPRT ne peuvent pas survivre au-delà de douze jours de culture en milieu HAT.

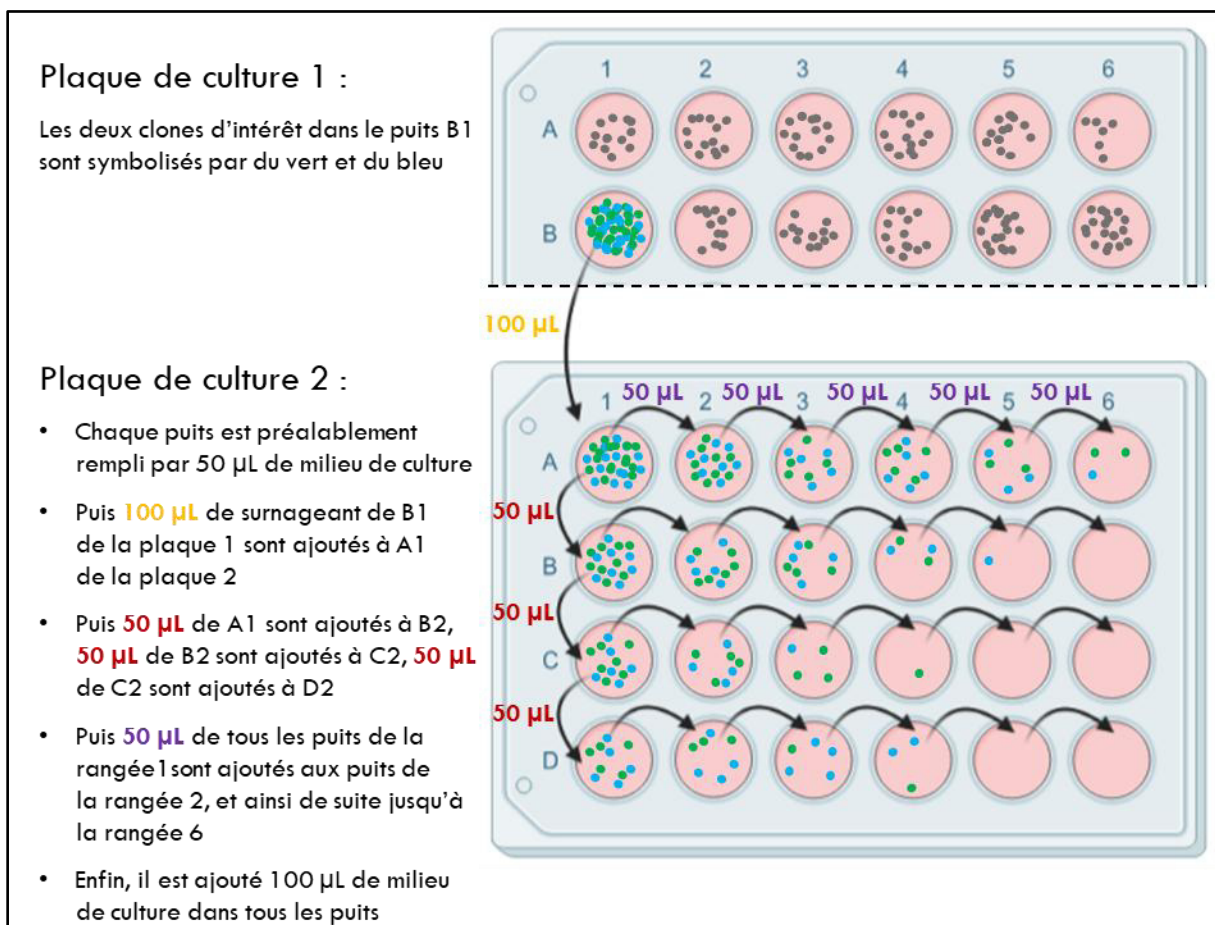
Concernant les cellules des puits présentant une DO inférieure à 1,5, leur culture a été maintenue dans les plaques de 96 puits, nécessitant un changement de milieu régulier et des tests de surnageant en ELISA pour contrôler l'éventuelle sécrétion tardive d'anticorps d'intérêt. En cas de positivité, les cellules des puits d'intérêt ont alors été transférées en plaque de 24 puits.

### **1.1.5 Reclonage et obtention d'anticorps monoclonaux**

Dans les puits d'intérêt déterminés précédemment, les cellules de fusion n'étaient pas forcément issues de la division d'une même cellule mère. En effet, lors de la fusion, plusieurs cellules sécrétrices d'anticorps d'intérêt ont pu être distribuées dans un même puits. L'utilisation de tels anticorps, dits polyclonaux, dans les tests de laboratoire est possible.

Cependant, les anticorps polyclonaux sont source de variations dans les résultats, notamment en cas de changement de lot d'anticorps, car la croissance de différents types cellulaires dans un même espace ne peut être strictement identique deux fois de suite. Pour obtenir des résultats reproductibles, il est ainsi préférable d'utiliser des anticorps monoclonaux, secrétés par des cellules jumelles issues de la même cellule mère. Pour obtenir ce type d'anticorps, il est alors nécessaire de « recloner » les cellules, c'est-à-dire d'isoler chaque clone de fusion dans des puits séparés.

Cette étape a été réalisée par la méthode des dilutions limites, qui consiste à déposer dans des plaques une concentration décroissante en cellules de culture pour n'obtenir qu'une cellule par puits, que l'on laisse se multiplier quelques jours avant de réaliser de nouveaux tests de surnageant en ELISA (figure 36).



**Figure 36 :** Méthode des dilutions limites employée pour obtenir des anticorps monoclonaux.



Après plusieurs dilutions limites effectuées, il est possible d'observer au microscope dans les puits présentant une DO satisfaisante, une colonie de cellules monoclonales. A ce stade, les cellules peuvent être qualifiées d'hybridomes. La perte de sécrétion d'un hybridome, due à des réarrangements chromosomiques, étant relativement courante, plusieurs reclonages ont été effectués pour s'assurer de leur stabilité. Pour mettre en œuvre les dilutions limites, le milieu de culture RPMI 1640 a été associé à 1 % de L-glutamine et d'antibiotiques, ainsi qu'à un pourcentage décroissant d'hypoxanthine et de thymidine au fur et à mesure des dilutions réalisées. En effet, pour ces dernières, la voie de novo de synthèse des acides nucléiques a normalement été progressivement réactivée par l'arrêt de l'adjonction d'aminoptérine. Pour les cellules dont la croissance était laborieuse, il a parfois aussi été nécessaire d'ajouter des macrophages ou de l'IL-6 (1000 unités par mL de culture) et jusqu'à 15 % de SFV.

Ce milieu a par la suite été employé, pour expandre la culture des colonies monoclonales d'intérêt dans des bouteilles de 75 cm<sup>2</sup> puis de 250 cm<sup>2</sup> de surface de culture, afin d'augmenter la masse des cellules et donc la production d'anticorps. Au-delà des résultats des tests de surnageant en ELISA, les cellules sélectionnées présentaient une croissance relativement rapide, et un aspect homogène.

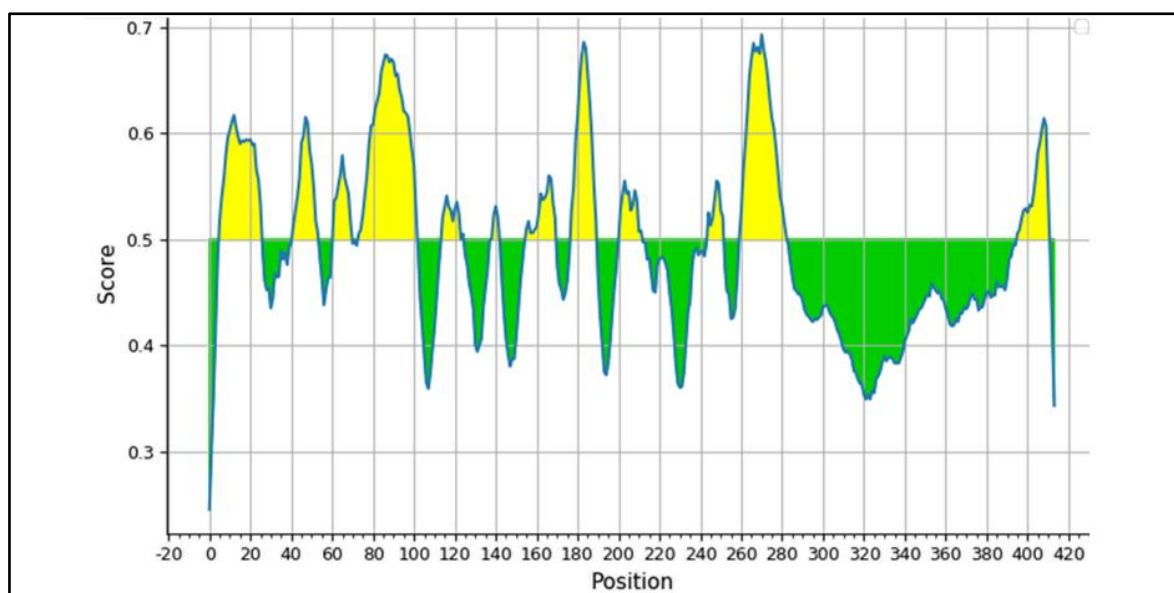
### **1.1.6 Purification**

Dans les cultures cellulaires réalisées, les hybridomes prolifèrent et secrètent leur anticorps directement dans le milieu de culture. Avant de pouvoir être utilisés dans des tests de laboratoire, ces anticorps ont alors dû être purifiés. Pour cela, le surnageant a été filtré par chromatographie d'affinité à l'aide d'un automate ÄKTA purifier (GE Healthcare, USA). La cartouche du dispositif (# 89924 ; Thermo Fisher, USA) était composée de billes d'agarose couplées à la protéine A. Cette protéine provient de la paroi des bactéries de l'espèce *Staphylococcus aureus* et présente une affinité très importante pour les immunoglobulines en général, et plus particulièrement pour les fragments constants des chaînes lourdes des Ig G. Le surnageant des cultures a été passé dans ces cartouches mélangé volume à volume avec une phase mobile composée d'un tampon glycine 1,5 M de pH égal à 8,9. Ce pH est en effet optimal pour la fixation des IgG sur la protéine A. L'éluat des anticorps s'est ensuite effectuée par le passage dans les cartouches d'un tampon d'acide citrique à 100 mM de pH égal à 3. Une solution tampon de TRIS 1M de pH égal à 9 a été ajoutée à l'éluat, et les anticorps ont été dialysés dans une solution de PBS de pH égal à 7,4 pendant 48 heures à une température de 4°C.

## 1.2. Résultats

### 1.2.1 Sélection des peptides

L'analyse de la séquence de la TDP-43 par le logiciel « Bepipred 2.0 », permettant la recherche d'épitopes discontinus, a abouti à la mise en évidence de 12 peptides (figure 37 et tableau XII).

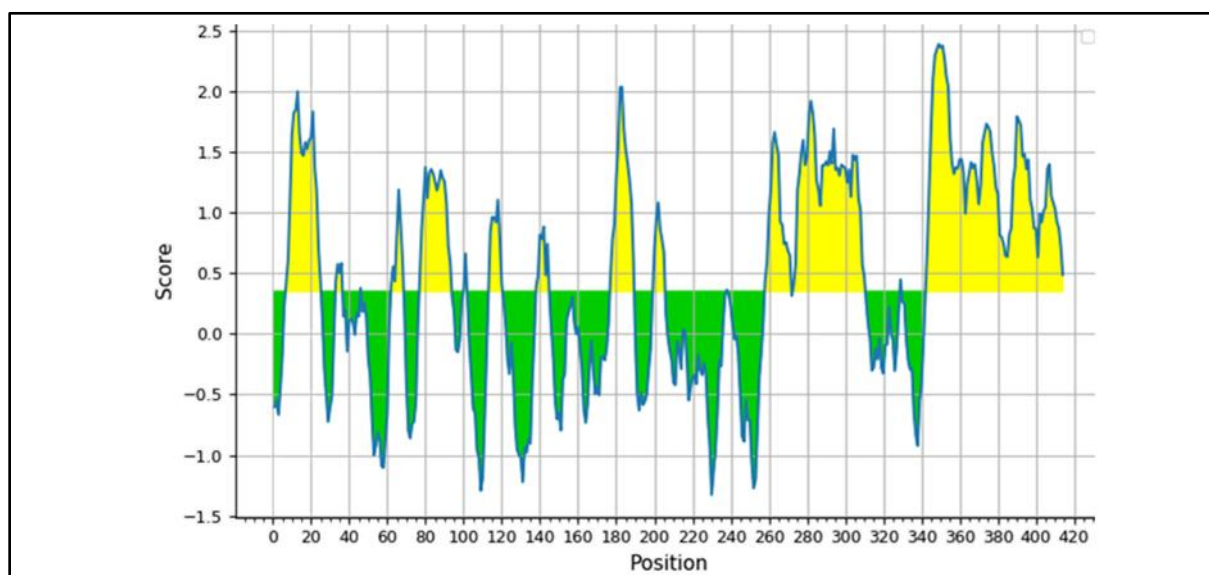


**Figure 37 :** Analyse de la séquence de la TDP-43 par le logiciel Bepipred 2.0. Les séquences en jaunes sont potentiellement immunogènes.

No.	Début	Fin	Peptide	Nombre d'acides aminés
1	6	26	RVTEDENDEPIEIPSEDDGTV	21
2	42	54	RYRNPVSQCMRGV	13
3	62	70	HAPDAGWGN	9
4	74	102	VVNYPKDNKRKMDETDASSAVKVKRAVQK	29
5	115	125	TTEQDLKEYFS	11
6	139	142	LKTG	4
7	156	170	ETQVKVMSQRHMIDG	15
8	178	190	PNSKQSQDEPLRS	13
9	201	212	DMTEDELREFFS	12
10	245	252	GEDLIKIG	8
11	260	283	AEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGF	24
12	396	411	GFNGGFGSSMSKSSG	16

**Tableau XII :** Peptides immunogènes prédits par le logiciel Bepipred 2.0.

L'analyse de la séquence de la TDP-43 par le logiciel « Bepipred 1.0 », permettant la recherche d'épitopes continus, a abouti à la mise en évidence de 14 peptides (figure 38 et tableau XIII).



**Figure 38 :** Analyse de la séquence de la TDP-43 par le logiciel Bepipred 1.0. Les séquences en jaunes sont potentiellement immunogènes.

No.	Début	Fin	Peptide	Nombre d'acides aminés
1	7	25	VTEDENDEPIEIPSEDDGT	19
2	33	36	AQFP	4
3	46	46	P	1
4	62	68	HAPDAGW	7
5	77	93	YPKDNKRKMDETDASSA	17
6	100	101	VQ	2
7	114	120	KTTEQDL	7
8	138	144	DLKTGHS	7
9	177	189	LPNSKQSQDEPLR	13
10	200	205	EDMTED	6
11	238	238	Q	1
12	258	271	SNAEPKHNSNRQLE	14
13	273	310	SGRFGGNPPGGFGNQGGFGNSRGGGAGLGNNQGSNMGGG	38
14	329	329	A	1

**Tableau XIII :** Peptides immunogènes prédits par le logiciel Bepipred 1.0.

Après comparaison des épitopes prédits par les deux méthodes, trois peptides composés des acides aminés ont été retenus (figure 39). Le dernier a été phosphorylé en position 409 et 410.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140		
MSEYIRVTEDE	ENDEPIETIPS	EDDGTLLVLLST	VTAQFPGACG	LRYRNPVSQC	MRGVRLVEGI	LHAPDAGWGN	LVVVVIVYK	DK NKRK'DETDA	S	SAVKVKRAV	QKTSDLIVLG	LPHKTTEQDL	KEYFSTFGEV	LMVQVKKDLK	
150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280		
TGHSKGFQFV	EYETQVK	VMSQRHMIDG	RWCDCKLPS	KQSQDEPLRS	RKVFVGRCTE	DHTEDELREF	FSQYGDVMDV	FIPKPFRAFA	FVTFADDQIA	QSLCGEDLII	KGISVHIS	IA EPKHNSNRQL	E	SGRFGGNP	
290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410			
GGFGNQGGFG	NSRGGGAGLG	NNQGSNMG	MNFGAFSINP	AMMAAAQAAL	QSSWGMGMML	ASQQNQSGPS	GNNQNGNMQ	REPNQAFGSG	NNSYSGSISG	AAIGWGSASN	AGSGSGFM	G	FGSSMDSKSS	G	NGM

Figure 39 : Epitopes théoriques de la TDP-43 choisis pour être la cible des anticorps produits.

### 1.2.2 Test du sérum des souris au soixantième jour d'immunisation

Le test du sérum des souris, effectué soixante jours après leur première immunisation, a permis d'apprécier la réactivité de leur plasma vis-à-vis des peptides. Pour le peptide composé des acides aminés 79 à 91 de la TDP-43, les quatre souris ont été immunisées avec succès. Le peptide composé des acides aminés 259 à 271 a provoqué une forte réponse immunitaire pour une souris, modérée pour deux souris et faible chez la dernière souris. Le dernier peptide, composé des acides aminés 400 à 411 et phosphorylé en position 409 et 410, a permis l'immunisation des quatre souris, dont deux présentaient une réactivité de leur sérum importante. Le tableau XIV récapitule les DO mesurées en ELISA dans chaque sérum.

Dilution des Sérums	Peptide 79-91				Peptide 259-271				Peptide 400-411 phosphorylé			
	Souris A	Souris B	Souris C	Souris D	Souris E	Souris F	Souris G	Souris H	Souris I	Souris J	Souris K	Souris L
1/1000	5,493	4,167	3,924	2,557	4,374	1,900	1,680	0,869	4,441	3,271	1,876	1,570
1/2000	4,803	4,149	4,123	1,234	4,527	1,084	0,950	0,485	4,586	3,363	1,520	0,846
1/4000	4,301	3,848	3,889	0,647	4,015	0,485	0,452	0,213	3,897	3,015	0,745	0,461
1/8000	4,305	4,116	3,999	0,289	4,037	0,290	0,256	0,135	4,023	2,940	0,312	0,241
1/16 000	4,114	4,033	3,588	0,172	3,690	0,160	0,148	0,090	3,984	2,110	0,160	0,126
1/32 000	4,157	3,837	2,600	0,130	2,701	0,102	0,096	0,060	3,566	2,623	0,056	0,084
1/64 000	3,830	3,548	1,345	0,070	1,347	0,055	0,054	0,041	2,435	1,481	0,079	0,040
1/128 000	3,718	2,754	0,810	0,064	0,814	0,056	0,053	0,046	1,380	0,774	0,077	0,032
1/256 000	2,579	1,326	0,381	0,044	0,408	0,033	0,033	0,030	0,791	0,359	0,044	0,039
1/512 000	1,393	0,871	0,225	0,018	0,225	0,019	0,018	0,013	0,366	0,163	0,032	0,024
1/10 <sup>6</sup>	0,790	0,460	0,132	0,033	0,137	0,025	0,026	0,025	0,154	0,801	0,064	0,079
Blanc	0,040	0,055	0,048	0,046	0,039	0,055	0,041	0,048	0,049	0,045	0,056	0,045

Tableau XIV : Densités optiques des sérums des souris, obtenues par des tests ELISA réalisés 60 jours après le début de l'immunisation. Les souris marquées en vert sont celles dont la rate a plus tard été récupérée pour extraction des lymphocytes.

### 1.2.3 Fusion

Le tableau XV présente la concentration des cellules myélomateuses dans la culture effectuée quelques jours avant la fusion, et le nombre de cellules lymphocytaires récupérées par souris, ainsi que les volumes mis en jeu pour réaliser la fusion. Pour la souris F, la fusion n'a finalement pas été réalisée, car ses résultats au test du sérum ont été jugés trop faibles.

Calculs effectués	Peptide 79-91		Peptide 259-271		Peptide 400-411 phosphorylé	
	Souris A	Souris B	Souris E	Souris F	Souris I	Souris J
Cellules X63 Ag8.653 (cellules/mL)	800 000		360 000		550 000	
Volume prélevé (mL)	35	40	62	na	49	60
Lymphocytes activés issus de la rate (cellules/mL)	14 000 000	16 000 000	11 200 000	na	12 300 000	15 000 000
Volume disponible (mL)	10	10	10	na	10	10

**Tableau XV** : Concentrations cellulaires et volumes prélevés pour la fusion des cellules myélomateuses avec les lymphocytes issus de la rate des souris. **Abréviations** : na : non appliqué.

### 1.2.4 Tests des surnageants en ELISA et expansion des cultures en plaque 24 puits

Pour la souris A, parmi les 720 puits cultivés en plaques 96 puits, un seul a présenté une DO > 1,5. Pour les souris B,E,I et J ce nombre était de 3, 2, 4 et 3 respectivement. Les cellules de ces puits ont alors été cultivées en plaque 24 puits, puis recloneés.

### 1.2.5 Anticorps obtenus

Finalement, à partir de l'immunisation des souris par le peptide 79-91, deux anticorps monoclonaux « 21B2 » et « 19C9 » ont été obtenus. L'immunisation par le peptide 259-271 a permis la synthèse d'un anticorps monoclonal, nommé « 35G7 ». Enfin, le peptide 400-411 phosphorylé en 409 et 410 injecté chez les souris a permis d'obtenir trois anticorps monoclonaux différents, nommés « 2F11 », « 1E6 » et « 11C10 ». Ces noms correspondent à la plaque et au puits dans lesquels le clone a été finalement cultivé.

## 2. Caractérisation des anticorps sur prélèvements cérébraux

### 2.1 Matériels et méthodes

#### 2.1.1 Prélèvements cérébraux

Des prélèvements de cortex frontaux de cinq patients ont été obtenus auprès de la « Tissu-Tumorotheque Est » des HCL (Professeur David Meyronet). Trois de ces prélèvements provenaient de patients atteints de DLFT-TDP. Les deux autres prélèvements étaient issus de patients atteints de DLFT-Tau.

L'extraction des protéines cérébrales a été réalisée selon un protocole décrit dans la littérature (79). Après la mise en suspension des homogénats de cortex frontaux dans une solution tampon « Low Salt » à une concentration de 5 mL/g de cortex, les protéines ont été extraites par des ultracentrifugations successives, entrecoupées de la remise en suspension des culots dans des tampons au pouvoir de solubilisation croissant. Dans l'ordre chronologique, il a été utilisé le triton-X, le triton-X associé au sucrose, le sarkosyl, puis le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou l'urée. Tous les surnageants ont été conservés, à une température de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Les protéines extraites des échantillons cérébraux traités à l'urée ont ensuite été dilués au 1/200 dans du tampon de migration « Laemmli 2X ». La composition du tampon de migration utilisé dans les WB peut varier légèrement d'un laboratoire à l'autre, mais elle inclut systématiquement certains composés décrits par Laemmli en 1970 (473). Ainsi, le  $\beta$ -mercaptoéthanol, qui est un agent réducteur dénaturant, casse les ponts disulfures établis entre les chaînes d'acides aminés. Le SDS, qui est un détergent anionique dénaturant, charge les protéines négativement. Le glycérol alourdit les échantillons afin de faciliter leur migration. Enfin, le bleu de bromophénol permet de colorer ces échantillons pour que l'opérateur puisse visualiser leur migration. Dans cette étude, le tampon de migration contenait 6 % mol/L de Tris HCl à pH 6,8 et 10 % de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 4 % de SDS, 20 % de glycérol ainsi qu'une faible fraction de bleu de bromophénol. Les préparations ont ensuite été dénaturées à une température de  $95^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes.

### 2.1.2 Western Blot

Le WB est une technique d'analyse des protéines très largement répandue dans les laboratoires. Son principe général est basé sur la détection immunologique de protéines présentes dans un échantillon, après que celles-ci aient été séparées par électrophorèse. Les résultats sont alors visualisés sous forme de bandes correspondant aux différentes formes de protéines dans le milieu. La méthode de détection de ces bandes dépend de la sensibilité souhaitée. Pour une détection très sensible, on utilise généralement la chimiluminescence. La visualisation se fait alors sur un film photographique et permet de conclure à la présence ou à l'absence d'une protéine dans l'échantillon analysé.

Si le WB est une technique essentiellement qualitative, des imageurs peuvent aussi réaliser une analyse semi-quantitative des profils obtenus par une acquisition de l'intensité des bandes lors de la réaction de chimiluminescence. Avec cette technique, une variabilité de mesure d'environ 35 % pour un même échantillon répété est généralement admise (474).

La réalisation d'un WB peut être décomposée en plusieurs étapes (figure 40). Le protocole réalisé dans cette étude est intégré à la description de ces étapes.

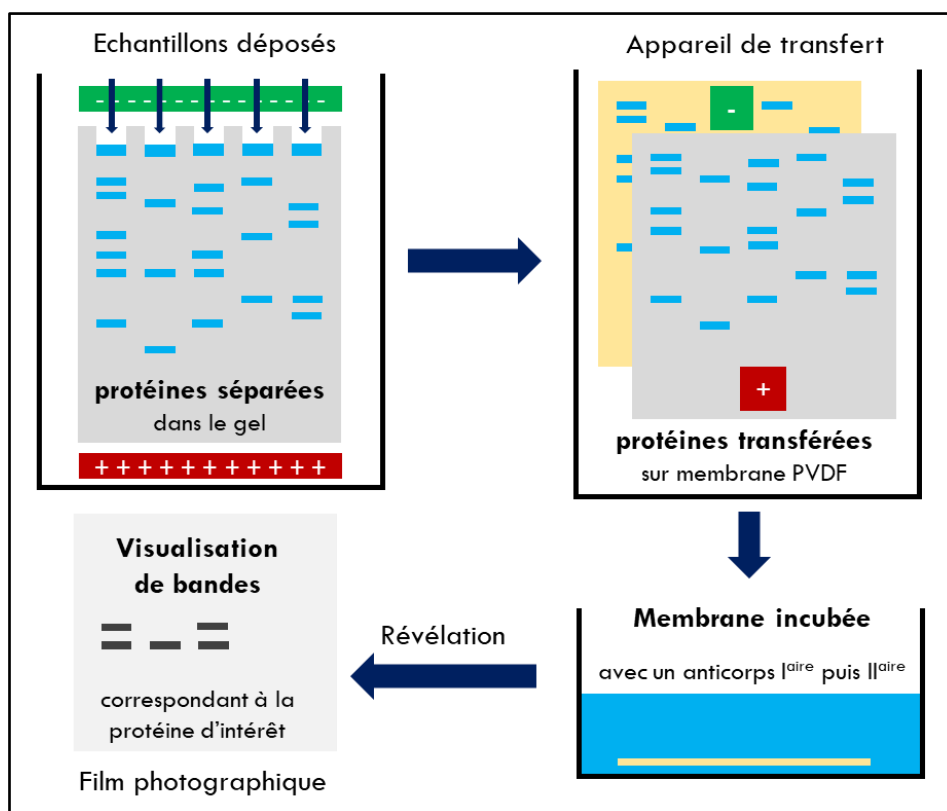


Figure 40 : Etapes de réalisation d'un Western Blot avec révélation sur film photographique.

Dans un premier temps, les échantillons sont dilués dans un tampon de migration dénaturant de type Laemmli, puis chauffés. Ensuite, la séparation des protéines nécessite le dépôt d'un certain volume d'échantillons dénaturés dans des puits situés sur la tranche supérieure du gel de migration, lui-même disposé dans une cuve d'électrophorèse. Ces dernières années, les gels les plus couramment utilisés sont composés de polyacrylamide. Cette substance, responsable de la rétention des protéines, va créer un maillage plus ou moins serré au sein du gel en fonction de sa concentration, exprimée en pourcentage. Il faut par conséquent choisir un gel présentant un pourcentage en polyacrylamide adapté à la masse moléculaire de la protéine d'intérêt. Après le dépôt, l'application d'un champ électrique dans la cuve d'électrophorèse permet de faire migrer les protéines, chargées négativement par le SDS, vers l'anode. La vitesse de migration sera dépendante de la masse moléculaire de chaque protéine. Dans ce travail, il a été utilisé des gels « NuPAGE » (Thermo Fisher, USA) présentant un gradient de polyacrylamide de 4 % à 12 %. Ce type de gel est classiquement utilisé dans les études qualitatives de la TDP-43 (358,359). Un volume de 10 µL d'échantillons dénaturés a été déposé dans les puits. Deux de ces puits étaient néanmoins dévolus au dépôt de 5 µL d'un marqueur de migration coloré « Amersham Full-Range Rainbow » (GE Healthcare, UK) et de 5 µL d'un marqueur de chimiluminescence « MagicMark XP Western Protein Standard » (Thermo Fisher, USA). Il a alors été appliqué un courant d'intensité fixée à 200 mA pendant 50 minutes.

Suite à l'électrophorèse des protéines, celles-ci doivent être transférées à la surface d'une membrane, car le gel ne permet pas la fixation des anticorps de détection des protéines. Ce transfert, réalisé en milieu humide ou semi-sec, se base sur le même phénomène physique que l'électrophorèse. En effet, en migrant vers l'anode, les protéines chargées négativement présentes dans le gel vont s'incorporer à la surface de la membrane, classiquement composée de polyvinylidène fluoride. Dans cette étude, les transferts de type semi-secs ont été réalisés par l'application d'un courant d'intensité fixée à 350 mA pendant 35 minutes, dans un assemblage composé du gel accolé à une membrane « Immobilon-P » (Millipore, USA).

L'étape suivante consiste à « bloquer » la membrane, par son incubation dans une solution riche en protéines, afin de limiter les futures interactions non spécifiques entre l'anticorps de détection et cette membrane. En effet, ce phénomène peut créer un bruit de fond lors de la révélation. Dans cette étude, les membranes ont été incubées dans des solutions de PBS contenant soit 5 % de lait, soit 3 % d'albumine bovine, durant 2 heures à température ambiante et sous agitation douce.

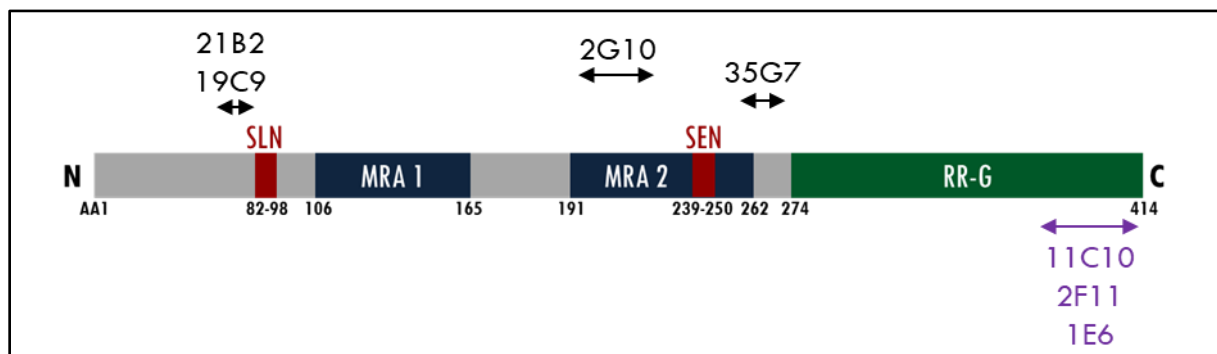


Une fois la membrane bloquée, elle va être incubée avec un anticorps dit « primaire », spécifique de la protéine d'intérêt. La mise en évidence de cette protéine dépendra alors beaucoup de la sensibilité et de la spécificité de l'anticorps. Ces deux paramètres dépendent eux-mêmes de la concentration de l'anticorps dans la solution d'incubation. Dans ce travail, les anticorps primaires ont été dilués dans une solution de PBS contenant 0,1 % de Tween 20 pour limiter leur agrégation (PBST) et l'incubation avec les membranes a été réalisée à la température de 4°C pendant une nuit. Diverses concentrations ayant été testées pour chaque anticorps primaires, celles-ci sont alors précisées dans les résultats. Le tableau XVI récapitule les anticorps utilisés. L'anticorps 2G10 n'a pas été synthétisé lors de ce travail, mais il provient de la même société et n'avait pas encore été caractérisé sur échantillons cérébraux.

Nom	Épitope	Sérintes phosphorylées	Espèce	Clonalité
21B2	78-91		Souris	Monoclonal
19C9				
2G10				
35G7	258-271			
11C10				
1E6	400-412	409 et 410	Souris	Monoclonal
2F11				

**Tableau XVI :** Récapitulatif des anticorps primaires utilisés dans cette étude. La police violette correspond aux anticorps anti-p-TDP-43.

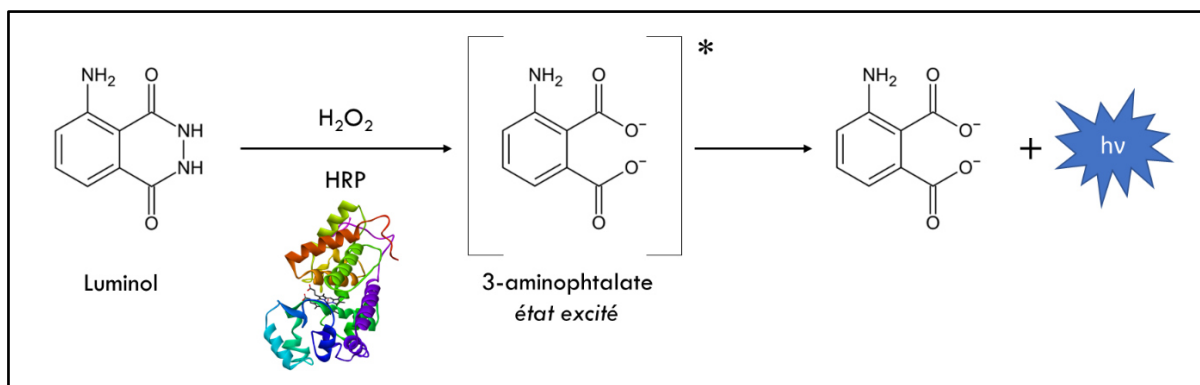
La figure 41 permet de rappeler les interactions potentielles entre la protéine et les différents anticorps testés.



**Figure 41 :** Interactions théoriques des anticorps avec la TDP-43. La police violette correspond aux anticorps anti-p-TDP-43. **Abbréviations :** AA : acide aminé ; C : extrémité carboxy terminale ; MRA : motifs de reconnaissance des acides nucléiques ; N : extrémité amino terminale ; RR-G : région riche en glycine ; SEN : signal d'exportation nucléaire ; SLN : signal de localisation nucléaire.

Suite à l'incubation de la membrane avec la solution d'anticorps primaire, une série de rinçages est alors effectuée, pour éliminer l'excès d'anticorps primaire non lié. Puis, la membrane est incubée avec un anticorps dit « secondaire », dirigé contre l'anticorps primaire. Cet anticorps peut être couplé à la biotine ou à une enzyme comme la phosphatase alcaline ou la peroxydase de raifort (HRP) suivant le type de détection envisagé. Dans notre étude, trois lavages successifs de 5 minutes par du PBST ont été réalisés, suivie d'une incubation sous agitation douce d'une durée de 30 minutes avec un anticorps anti-IgG de souris « Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG » (Jackson Immunoresearch, USA) dilué au 1/10 000 dans du PBST.

Après l'incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane est alors de nouveau lavée abondamment pour éliminer tout excès d'anticorps. Elle est ensuite séchée à l'air libre, puis l'ajout d'un substrat, dépendant du système associé à l'anticorps secondaire, permet enfin de mettre en évidence la présence ou l'absence de la protéine d'intérêt. Des détections colorimétriques, fluorescentes ou par autoradiographie peuvent être réalisées. Cependant, il est communément effectué une détection de la chimiluminescence, émise lors du retour du luminol à son état fondamental après son excitation par le peroxyde d'hydrogène catalysée par la HRP (figure 42).

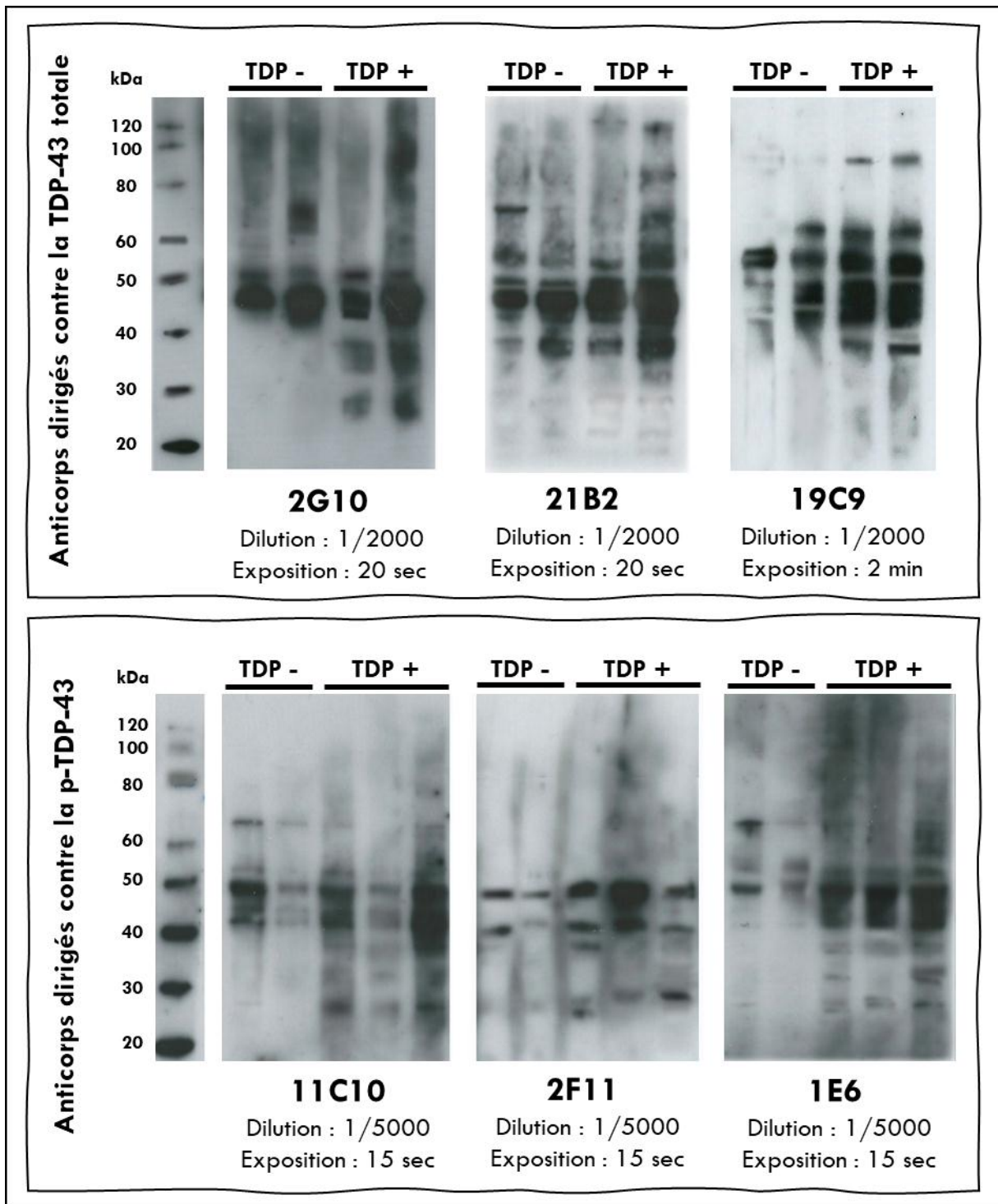


**Figure 42 :** Principe de la chimiluminescence émise avec le luminol.

Dans l'étape de révélation réalisée dans cette étude, quatre lavages de cinq minutes dans du PBST suivi de trois lavages de cinq minutes dans du PBS ont été réalisés. Puis, les membranes ont été mises en contact avec un réactif de révélation « Super Signal West Dura » (Pierce, USA). Les images ont été obtenues en chambre noire, grâce à des films photographiques « Amersham Hyperfilm ECL » (GE Healthcare, UK). La durée d'exposition de ces films avec la membrane était variable entre les anticorps, et est précisée systématiquement dans les résultats. Les films ont finalement été traités par un bain de révélateur puis de fixateur GBX (Kodak, USA).

## 2.2. Résultats

La figure 43 récapitule les résultats obtenus par WB à partir d'homogénats de tissus cérébraux précipité selon un protocole « SDS » avec les différents anticorps de cette étude et pour des conditions optimisées.



**Figure 43 :** Résultats des WB réalisés à partir de fractions cérébrales frontales de patients atteints de DLFT-TDP ou de DLFT-tau.

### **2.2.1 : Anticorps dirigés contre la forme totale de la TDP-43**

L'anticorps 21B2 a permis de mettre en évidence chez tous les patients une bande majoritaire de 45 kDa, complétée par trois bandes de 40, 43 et 50 kDa de plus faible intensité.

Les profils obtenus avec l'anticorps 2G10 étaient proches de ceux révélés par l'anticorps 21B2. En effet, tous les patients ont présenté une bande majoritaire de 45 kDa, accompagnée de plus faibles bandes de 43 et 50 kDa. Cependant, contrairement au 21B2, des bandes diffuses entre 20 et 30 kDa et entre 30 et 40 kDa ont également été révélées uniquement chez les sujets atteints de DLFT-TDP.

Avec l'anticorps 19C9, tous les patients présentaient trois bandes d'intensité comparable de 45, 50 et 60 kDa. Chez les sujets DLFT-TDP, deux bandes supplémentaires de 39 et 80 kDa ont été mises en évidence. L'exposition des films photographiques sur les membranes pour révéler les profils qualitatifs de la TDP-43 a nécessité d'être prolongée avec cet anticorps comparé aux anticorps 21B2 ou 2G10.

Enfin, malgré de nombreuses tentatives d'optimisation, l'utilisation de l'anticorps 35G7 n'a abouti à aucune image exploitable. Il a été essayé plusieurs temps d'incubation de la membrane avec la solution saturante (2 heures, 4 heures ou sur la nuit) et différentes composition pour cette solution (solution de PBS-lait 5% et solution de PBS-BSA 3%). Plusieurs temps d'incubation de la membrane avec le 35G7 ont également été testés (30 minutes, 1 heure, 2 heure, 4 heure, ou sur la nuit), avec des solution de 35G7 à différentes concentrations (1/2000, 1/5000, 1/10 000, 1/20 000).

### **2.2.2 Anticorps dirigés contre la forme de la TDP-43 phosphorylée en position 409 et 410**

Globalement, les images obtenues à l'aide des anticorps spécifiques de la TDP-43 phosphorylée en position 409 et 410 étaient plus nettes que celles obtenues par l'utilisation des anticorps dirigés contre la forme totale de la TDP-43, notamment car les bandes comprises entre 40 et 50 kDa étaient moins intenses.

L'anticorps 2F11 a permis d'observer chez tous les patients deux bandes de 43 et 50 kDa. Chez les trois patients présentant des agrégats de TDP-43, une bande de 25 kDa était également plus ou moins visible.

Avec l'anticorps 11C10, les patients ont tous présenté deux bandes de 43 kDa et 50 kDa d'intensité comparable, parfois complétées par une bande de plus faible intensité d'environ 45 kDa. Chez les patients présentant des agrégats de TDP-43, des bandes de 25, 35 et 39 kDa étaient également bien visibles, tandis que chez les patients atteints de DLFT-Tau, une bande d'environ 70 kDa est spécifiquement apparue.

Enfin, l'utilisation de l'anticorps 1E6 a permis de mettre en évidence chez tous les patients trois bandes de 43, 45 et 50 kDa d'intensité comparable. Comme pour l'anticorps 11C10, des bandes de 25, 35 et 39 kDa étaient également visibles chez les trois patients atteints de DLFT-TDP.

### 3. Discussion

Cette première partie du travail était dévolue à la synthèse de nouveau anticorps anti-TDP-43 et anti-p-TDP-43, avec l'espoir qu'ils présentent de meilleures sensibilité et spécificité que les anticorps commerciaux pour la détection de cette protéine, notamment dans les fluides biologiques des patients. Cette synthèse a été réalisée par l'hybridation entre des lymphocytes B activés et des cellules cancéreuses, induite par un agent permettant la fluidification des membranes. Les cellules fusionnées ont alors hérité du caractère d'immortalité des cellules malignes plasmocytaires, et pourront donc produire les anticorps monoclonaux indéfiniment. Bien que cette technique soit aujourd'hui bien maîtrisée, le faible nombre de clones finalement obtenus démontre que la réponse immunitaire au sein d'un organisme vivant est un processus complexe, qui dépend de nombreux facteurs non contrôlables. Ce faible nombre pourrait aussi s'expliquer par la taille relativement petite des peptides utilisés comme éléments immunogènes, permettant d'éviter des problèmes de conformations inter-espèces ultérieurs. Ce choix, longuement discuté lors de la réflexion sur la stratégie d'immunisation, comportait en effet le risque de développement d'une faible réponse immunitaire des souris malgré les artifices utilisés pour la stimuler.

Durant ce travail, des interrogations sur la nature des éléments à injecter se sont également posées. Il a ainsi été envisagé l'utilisation de protéines cérébrales plus ou moins purifiées, issues de tissus bien caractérisés sur le plan neuropathologique. Cette méthode s'est par exemple montrée performante pour la synthèse d'anticorps dirigés contre la protéine Prion dans un travail antérieur de l'équipe. Cependant, l'utilisation d'un tel matériel présente un certain nombre d'inconvénients, notamment au niveau de la méthode de purification à employer. En effet, à l'inverse du Prion, il n'est pas possible de traiter les échantillons par la protéinase K et de récupérer la TDP-43 dans sa conformation pathologique en quantité suffisante. De plus, la réglementation concernant la manipulation de produits d'origine humaine ne permet pas ce type d'immunisation dans tous les laboratoires. Pour certaines protéines, une purification par anticorps spécifique est également possible, mais nous ne disposons pas d'un tel outil pour la TDP-43. Enfin, quelle que soit la méthode de purification des échantillons employée, il existe systématiquement un taux résiduel de protéines interférentes, pouvant conduire à une diminution de la sensibilité des anticorps produits. Ces difficultés de purification expliquent en partie l'émergence du développement d'anticorps par injection de peptides synthétiques.

Cette méthode d'immunisation par peptides synthétiques a ainsi permis à d'autres équipes d'obtenir un anticorps spécifique de fragments de la TDP-43 coupée par la caspase-3 en position 219. L'analyse du tissu cérébral en WB de patients atteints de MA ou de maladie de Parkinson avec cet anticorps a permis de mettre en évidence des bandes spécifiques de 25 kDa (475,476).

Dans un contexte de DLFT, cette approche a également abouti à l'émergence d'un anticorps ayant la capacité de détecter la TDP-43 cytoplasmique anormale en immunohistochimie, à partir de l'immunisation de souris avec un peptide composé de la séquence en acides aminés 182 à 261 de la TDP-43 (477). Il a également été développé des anticorps anti-p-TDP-43 par cette méthode (157,159,161,251).

Les premiers tests de détection de la TDP-43 humaine avec les anticorps développés dans notre travail à partir de peptides de synthèse ont globalement présenté des résultats encourageants sur tissus cérébraux. En effet, les profils protéiques obtenus par WB étaient exploitables pour six anticorps sur les sept et ont permis de mettre en évidence différentes isoformes de la TDP-43 dans les échantillons. Par ailleurs, les performances décevantes de l'anticorps 35G7 étaient quelque peu prévisibles, car sur les quatre souris immunisées par le peptide 259-271, une seule présentait des DO compatibles avec un processus d'immunisation efficient. Cette remarque démontre l'intérêt d'immuniser plusieurs animaux pour un même peptide, tout en suivant la règle des 3 « R » régissant l'expérimentation animale (réduire, raffiner, remplacer).

Trois anticorps anti-TDP-43 totale sur les quatre produits ont permis de mettre en évidence une bande à 43 kDa, ce qui est en accord avec l'étude de Neumann *et al*, dans laquelle l'extraction séquentielle des protéines cérébrales a été effectuée en suivant le même protocole que dans ce travail (75). Une bande de 50 kDa a été également souvent révélée par ces anticorps, ce qui est en accord avec l'étude de Steinacker *et al* (358). Dans les deux études citées, les profils des fractions cérébrales obtenus étaient cependant différents. Cette diversité a été retrouvée dans nos travaux. Une comparaison des profils obtenus avec les anticorps 21B2 et 19C9, issus de l'immunisation par le peptide composé des acides aminés 79-91 de la TDP-43, a permis une première comparaison de leurs performances analytiques. Le 21B2 semble plus sensible que le 19C9, car à dilution égale et pour un temps d'exposition plus court, le premier a permis de mettre en évidence plus d'isoformes de la protéine que le second. Cependant, le 19C9 pourrait être plus spécifique, car les profils obtenus en l'utilisant étaient différents entre les sujets présentant des inclusions de TDP-43 cérébrales et des sujets contrôles.

Parmi les anticorps dirigés contre la TDP-43 totale, le 2G10 a été le seul à mettre en évidence des bandes de poids moléculaire inférieur à 30 kDa. Comme il ciblait un épitope plus proche de l'extrémité carboxy-terminale de la protéine que les anticorps 21B2 et 19C9, ce résultat pourrait confirmer l'hypothèse que les fragments de la TDP-43 détectables en WB correspondent plutôt aux acides aminés carboxy-terminaux de la protéine (75,478).

Contrairement aux anticorps dirigés contre la forme totale de la TDP-43, les anticorps anti-p-TDP-43 ont été obtenus par l'injection d'un peptide carboxy-terminal phosphorylé de séquence en acides aminés similaire aux peptides utilisés dans d'autres études (tableau III). Ceci s'explique par le fait que cette protéine phosphorylée à la fois en 409 et 410 semble spécifiquement impliquée dans la formation d'agrégats cérébraux de TDP-43 (157,159,251). Dans notre étude, les profils obtenus avec ces anticorps confirment l'hétérogénéité des profils dépendante de l'anticorps. Néanmoins, de façon intéressante, tous les anticorps anti-p-TDP-43 ont permis de révéler des bandes inférieures à 40 kDa uniquement chez les sujets atteints de DLFT-TDP. La bande de 43 kDa parfois aussi détectée permet de penser que les anticorps 11C10 et 1E6 se fixent également sur la forme non pathologique de la TDP-43. Ce constat a déjà été rapporté dans une étude des lésions cérébrales par techniques immunohistochimiques en utilisant des anticorps anti-TDP-43 phosphorylés, dans laquelle il a été mis en évidence également la TDP-43 nucléaire (477). Les résultats des WB réalisés dans cette même étude, ainsi que dans d'autres publications, sont concordants avec nos résultats, puisque les profils protéiques présentaient une bande de 45 kDa, associée à plusieurs bandes d'environ 25 kDa chez les sujets atteints de DLFT-TDP (157,159,251). Dans la littérature, l'analyse du profil de ces petits fragments ont par ailleurs permis de différencier les sous-types de DLFT-TDP, malgré de nombreux recouvrements (131,251).

Finalement, les profils protéiques obtenus par WB en utilisant ces nouveaux anticorps se sont révélés intéressants et au moins équivalents à ceux décrits dans la littérature. Leur évaluation a alors été poursuivie en les testant dans d'autres milieux biologiques. Ces travaux sont présentés dans la partie B de la thèse.



**PARTIE B :**

**CARACTERISATION DE LA TDP-43 DANS LES  
FLUIDES BIOLOGIQUES ET LES ELEMENTS  
FIGURES DU SANG**

Le développement puis la validation d'un marqueur protéique pour une pathologie passe classiquement par plusieurs étapes successives. Dans un premier temps, des recherches sont menées dans le but d'identifier un processus physiopathologique, idéalement relativement spécifique. Ensuite, un paramètre caractéristique de ce processus est déterminé. Enfin, l'émergence du marqueur passe par le développement d'une méthode permettant sa détection facile et robuste. Dans les DLFT, la réalisation d'analyses immunohistochimiques, ainsi que des recherches en modèle cellulaire ou animal, ont permis d'identifier plusieurs processus pathologiques impliquant la TDP-43.

Un des objectifs principaux de cette thèse était alors de déterminer si la TDP-43 présente dans les inclusions cérébrales pouvait être mise en évidence dans des fluides biologiques accessibles du vivant du patient grâce aux nouveaux anticorps préalablement développés.

Pour cela, il a dans un premier temps été effectué une caractérisation qualitative de la protéine totale et phosphorylée en 409/410, par WB et par la technologie Simple Western (ProteinSimple, USA) dans différentes matrices biologiques.

Ensuite, le travail s'est poursuivi par l'analyse semi-quantitative de ces deux formes de TDP-43 dans des échantillons plaquettaires.

Enfin, une analyse quantitative de la protéine dans le LCS et le plasma de patients a également été réalisée par technique SiMoA (Quanterix, USA).

## **1. Approche qualitative**

## 1.1 Matériels et méthodes

### 1.1.1 Echantillons

- *Solution d'albumine diluée à 0,4 g/L*

Une solution de Vialebex à 40 g/L (LFB Biomedicaments, France) a été diluée au 1/100 dans du NaCl. Cette dilution permet de retrouver une concentration en albumine du même ordre de grandeur que celle des plasmas dilués.

- *Solution d'immunoglobulines à 0,5 g/L*

Une solution de Privigen à 100 g/L (CSL Behring, Allemagne) a été diluée au 1/200 dans du NaCl.

- *Cultures cellulaires productrices de TDP-43*

Deux lignées cellulaires humaines produisant naturellement de la TDP-43 ont été cultivées par le Docteur Pascal Leblanc (Equipe Interactions Neurone-Muscle, Institut Neuromyogène, CNRS UMR5310 - INSERM U1217, Université de Lyon). Les cellules *Human embryonic kidney* (HEK 293T ; Généthon, France) étaient d'origine rénale, et les cellules SH-SY5Y (Sigma Aldrich, USA) étaient issues d'un neuroblastome humain.

Après la récupération d'échantillons de cultures cellulaires, l'extraction des protéines de ces milieux a débuté par leur mise en suspension dans un tampon PBS suivie de leur centrifugation à une température de 4°C. Les culots cellulaires ont alors été dissous puis lysés par un tampon Laemmli 2X, contenant 6 % de Tris-HCl à pH 6,8 et 10%  $\beta$ -mercaptoéthanol, 4% SDS ainsi que du glycérol et du bleu de bromophénol. Après sonication, les lysats cellulaires ont été congelés à une température de – 20°C jusqu'à analyse.

- ***Fluides biologiques et éléments figurés du sang des patients***

S'agissant d'une étude rétrospective, les échantillons biologiques analysés ont été recueilli dans le cadre du soin courant pour le bilan diagnostique des troubles cognitifs. Les patients inclus dans ce travail ont tous signé un consentement pour la conservation et l'utilisation de leurs reliquats biologiques à des fins de recherche lors de ce bilan (autorisation numéro DC2008-304).

Les recherches de variants pathogènes dans les gènes *C9ORF72* et *GRN* ont également été réalisés au laboratoire dans le cadre du soin courant. Le statut génétique des patients est ainsi précisé dans les résultats présentés.

Le diagnostic des patients atteints de DLFT et de MA inclus dans l'étude a été réalisé selon les recommandations en vigueur et validé au cours de Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP MAGICC – HCL) par les neurologues et les biologistes experts du centre mémoire ressource recherche (CMRR) de Lyon (19,25,26).

#### *Prélèvements de LCS*

Le LCS des patients a été recueilli par ponction lombaire dans un tube en polypropylène standardisé (Sarstedt, Allemagne). Les prélèvements reçus dans le service de biologie moléculaire (UF « pathologies neurodégénératives » ; Docteur Isabelle Quadrio) ont alors été centrifugés à 2000 G pendant 10 minutes, aliquotés et congelés à une température de - 80°C jusqu'à analyse selon les recommandations internationales (479).

La caractérisation qualitative de la TDP-43 a été effectuée sur des échantillons natifs ou après pré-traitement, consistant à une concentration par précipitation à l'acétone pendant une nuit à une température de 4°C et/ou à une déplétion en albumine et en Ig G à l'aide d'un kit *Albumin/IgG removal* (Thermo Fisher, USA), selon le protocole établi par le fabricant.

### *Prélèvements plasmatiques et plaquettaires*

Le sang des sujets a été recueilli dans des tubes EDTA, puis centrifugé à 200 G pendant 15 minutes. Le plasma riche en plaquette ainsi obtenu a été transféré dans un nouveau tube, puis centrifugé à 2000 G pendant 15 minutes.

Le plasma pauvre en plaquettes généré a alors été aliquoté et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Avant analyse, la concentration totale des protéines plasmatiques a été mesurée par un automate Alinity (Abbott, USA), puis les plasmas ont été dilués dans du NaCl pour obtenir une concentration en protéine totale harmonisée égale à 1 g/L. Certains plasmas ont été déplétés en albumine et en Ig G à l'aide d'un kit *Albumin/IgG removal* (Thermo Fisher, USA) et/ou concentrés par une précipitation à l'acétone pendant une nuit à une température de  $4^{\circ}\text{C}$ .

Le culot du plasma riche en plaquettes a été suspendu dans 4 mL d'une solution tampon « 1 », de pH égal à 7,35 et contenant 50 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl et 2,7 mmol/L d'EDTA.

Après une nouvelle centrifugation à 2000 G pendant 15 minutes, le culot a été repris par 4 mL de la même solution tampon 1, pour permettre la numération des plaquettes, effectuée sur un automate XN-2000 (Sysmex, Japon).

Cette numération plaquettaire a été suivie d'une nouvelle centrifugation des tubes à 2000 G pendant 15 minutes. Le culot plaquettaire obtenu a alors été repris par une solution tampon « 2 », de pH identique à la solution 1 mais qui ne contenait pas d'EDTA. Le volume de reprise dépendait ici de la concentration en plaquettes de l'échantillon, car le but était d'obtenir une concentration finale standardisée de 200 G/L de plaquettes.

Enfin, les plaquettes ont été lysées par l'ajout d'un volume 40 fois inférieur au volume de tampon 2 de triton X-100 préalablement dilué au 1/5 dans de l'eau distillée, associé au chauffage des échantillons à une température de  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes. Les lysats plaquettaires ont alors été aliquotés puis congelés jusqu'à analyse.

### 1.1.2 Techniques employées

- *Western blot*

Le protocole des expériences réalisées étant semblable à celui développé dans la première partie de cette thèse, seuls les nouveautés ou les points clefs seront décrits ici.

Dans cette étude, les solutions d'albumine à 0,4 g/L, d'immunoglobuline à 0,5 g/L, de TDP-43 recombinante, ainsi que les échantillons de LCS, de plasma et de plaquettes ont été dilués au 1/2 dans du tampon de migration Laemmli 2X. Les cultures cellulaires ont été dilués au 1/50 respectivement dans le même tampon. Les préparations ont alors été dénaturées à une température de 95°C pendant 5 minutes.

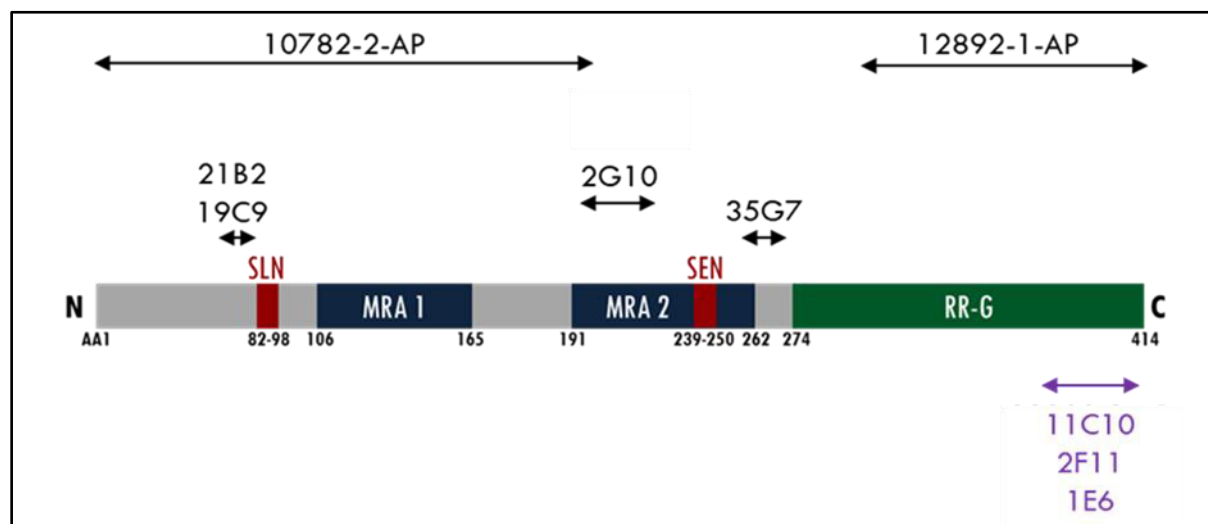
Un volume de 10 µL d'échantillons dénaturés a été déposé dans les puits de gels « NuPAGE » (Thermo Fisher ,USA) présentant un gradient de polyacrylamide de 4 % à 12 %.

Ensuite, les anticorps primaires ont été dilués dans une solution de PBST, et l'incubation avec les membranes a été réalisée à la température de 4°C pendant une nuit. Plusieurs dilutions ayant été testées pour chaque anticorps primaires, celles-ci sont précisées dans les résultats. Nous avons utilisés des anticorps commerciaux les plus fréquemment cités dans la littérature pour comparer les résultats obtenus avec les nouveaux anticorps anti-TDP-43 synthétisés dans la première partie de ce travail (158). Le tableau XVII récapitule les anticorps utilisés et la figure 44 permet de représenter les interactions potentielles entre la protéine et les différents anticorps testés.

Enfin, une incubation de la membrane sous agitation douce de 30 minutes a été effectuée, avec un anticorps anti-IgG de lapin « Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins HRP » (Dako, USA) dilué au 1/2000 dans du PBST, ou un anticorps anti-IgG de souris « Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG » (Jackson Immunoresearch, USA) dilué au 1/10 000 dans du PBST.

Fabricant	Nom	Épitope du peptide recombinant	Sérines phosphorylées	Espèce	Clonalité	
Proteintech	<b>10782-2-AP</b>	N-ter + 203-209	nc	Lapin	Polyclonal	
	<b>12892-1-AP</b>	288-414				
Roboscreen	<b>2G10</b>	201-220	nc	Souris	Monoclonal	
	<b>21B2</b>	78-91				
	<b>19C9</b>					
	<b>35G7</b>	258-271				
	<b>11C10</b>					
	<b>1E6</b>	400-412				409/410
	<b>2F11</b>					

**Tableau XVII :** Récapitulatif des anticorps primaires utilisés dans cette étude. La police violette correspond aux anticorps anti-p-TDP-43. **Abréviation :** nc : non concerné.



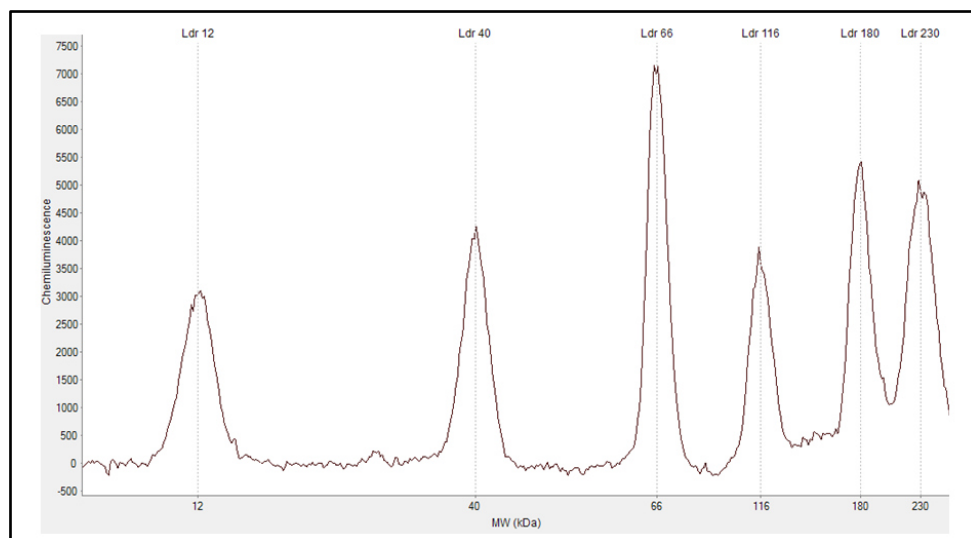
**Figure 44 :** Interactions théoriques des anticorps avec la TDP-43. La police violette correspond aux anticorps anti-p-TDP-43. **Abréviations :** AA : acide aminé ; C : extrémité carboxy terminale ; MRA : motifs de reconnaissance des acides nucléiques ; N : extrémité amino terminale ; RR-G : région riche en glycine ; SEN : signal d'exportation nucléaire ; SLN : signal de localisation nucléaire.

- **Technique Simple Western (Peggy sue ; ProteinSimple, USA)**

La technologie Simple Western (automate Peggy Sue ; ProteinSimple, USA) disponible dans l'UF « pathologies neurodégénératives » des HCL, propose une électrophorèse et une détection automatiques des protéines, réalisées en microcapillaires. Il permet ainsi un gain de temps et une amélioration théorique de la variabilité des résultats. De plus, la miniaturisation de la réaction permet de consommer de très petits volumes d'échantillons et d'anticorps.

La réalisation des analyses effectuées sur cet automate dans le cadre de cette thèse peut être décomposée en trois étapes :

Dans une première étape de préparation, les échantillons (natifs ou traités) ont été dilués au 4/5 dans une solution de « master mix » fournie par le fabricant. Il a également été réalisé la reconstitution de marqueurs fluorescents, témoins du bon déroulé de l'électrophorèse, ainsi que de la « ladder », constituée de poids moléculaires chimiluminescents permettant d'évaluer la masse molaire des différentes protéines mises en évidence. Dans cette étude, la ladder permettait d'analyser des protéines dont la masse molaire était comprise entre 12 et 230 kDa (figure 45). Ces opérations se sont suivies d'une dénaturation des échantillons et de la ladder à une température de 95°C durant 5 minutes.

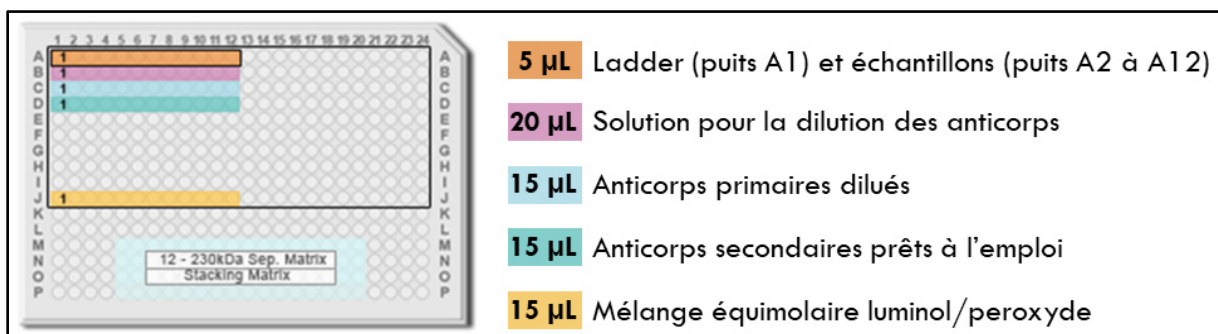


**Figure 45 :** La « ladder » était composée de protéines de poids moléculaire égal à 12, 40, 66, 118, 180 et 230 kDa.



En parallèle, les anticorps primaires anti-TDP-43 ont été dilués dans une solution fournie par le fabricant. Il s'agissait des mêmes anticorps que ceux utilisés dans les analyses en WB (tableau XVII). Les dilutions réalisées sont précisées dans les résultats. Finalement, une solution de révélation a été préparée par un mélange équimolaire de luminol et de peroxyde. Les anticorps secondaires couplés à la HRP fournis par le fabricant étaient prêts à l'emploi et dirigés contre les espèces lapin ou souris, en fonction de l'anticorps primaire choisi. Deux préparations gélifiées pour la migration en capillaires étaient également prêtes à l'emploi. La matrice de « stacking » est utilisée par l'automate au début du cycle pour permettre à toutes les protéines d'initier leur migration à partir d'un même niveau.

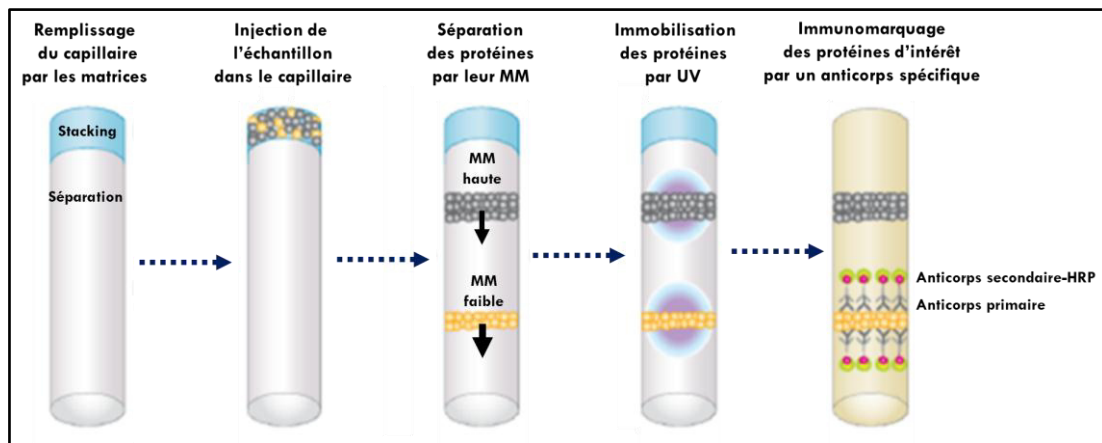
Une fois l'étape de préparation terminée, les échantillons et les différents réactifs ont été déposés dans une plaque de 384 micropuits, en respectant certaines recommandations (figure 46). En effet, la solution de révélation doit être placée au moins à deux lignes des anticorps secondaires couplés à la peroxydase, pour éviter toute contamination, et les puits entourant les matrices de séparation et de stacking doivent être remplis avec de l'eau, pour éviter la déshydratation de celles-ci. Après les dépôts, la plaque a été centrifugée à 1000 G durant 5 minutes, pour chasser les bulles d'air éventuellement présentes.



**Figure 46 :** Exemple type d'un plan de plaque pour une analyse par Simple western. Ici, il sera réalisé un cycle d'analyse, c'est-à-dire l'étude d'une ladder et de onze échantillons.

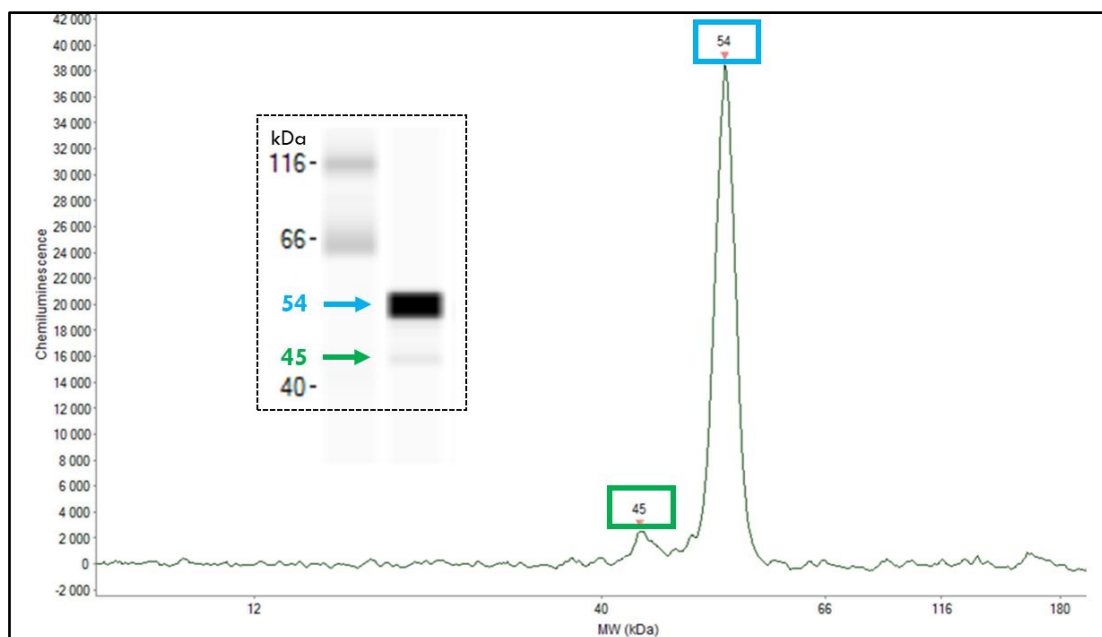
La dernière phase de l'analyse, de l'électrophorèse jusqu'à la révélation par chimiluminescence, est entièrement automatisée, après le chargement par l'opérateur dans l'automate de la plaque, du tampon de lavage et des tampons « Upper Running » et « Lower Running ». Elle débute par le remplissage des capillaires par les matrices de stacking et de séparation. Ensuite, chaque échantillon est injecté dans un capillaire différent. L'application d'un courant électrique permet la migration des protéines selon leur masse molaire. Une séparation par la charge électrique est aussi possible, mais n'a pas été réalisée dans le cadre de cette étude.

A la fin de la migration, l'activation des capillaires par un rayonnement ultra-violet aboutit à la fixation des protéines sur la surface interne des capillaires. Les matrices de stacking et de révélation sont alors éliminées, et l'incubation avec l'anticorps primaire est réalisée. L'analyse se poursuit par des lavages et l'ajout de l'anticorps secondaire, puis par l'intégration du mélange composé de luminol et de peroxyde (figure 47). Des mesures de chimiluminescence par l'automate sont alors réalisées, entre 4 et 512 secondes après l'ajout de cette dernière solution. Les temps d'exposition sont précisés dans les résultats.



**Figure 47** : Fonctionnement de l'automate Peggy Sue. **Abréviations** : MM : masse moléculaire ; UV : rayons ultra-violets.

Les données ont par la suite été interprétées grâce au logiciel « Compass for Simple Western » (version 3.1.7). Son interface permet de visualiser la taille des protéines d'intérêt, sous forme d'électrophorégramme ou de WB reconstitué numériquement (figure 48).



**Figure 48** : Deux visualisations des résultats sont fournies par le logiciel « Compass for simple Western ».

## 1.2. Résultats

Le tableau XVIII synthétise les profils protéiques de la TDP-43 et de la p-TDP-43 obtenus pour tous les anticorps et dans toutes les matrices. Ces résultats sont détaillés et illustrés par la suite.

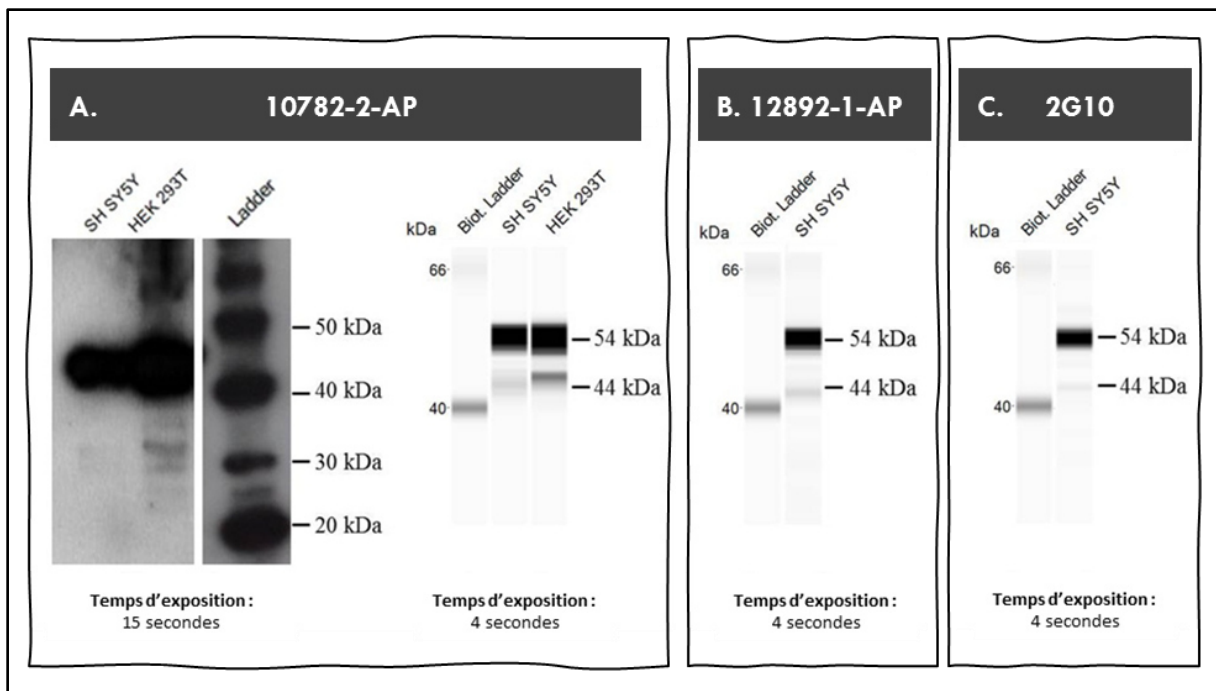
Anticorps	Cellules de culture		LCS		Plasma		Plaquettes	
	WB	PS	WB	PS	WB	PS	WB	PS
<b>10782-2-AP</b> (Proteintech)  N-ter	<b>BP :</b> - 45 kDa	<b>BP :</b> - 54 kDa	<b>BP :</b> - 50 kDa * - 25 kDa #*	<b>BP :</b> - 62 kDa *	<b>BP :</b> - 52 kDa *	<b>BP :</b> - 60 kDa *	<b>BP :</b> - 45 kDa	<b>BP :</b> - 52 kDa
	<b>BS :</b> - 35 kDa	<b>BS :</b> - 44 kDa	<b>BS :</b> - 60 kDa	<b>BS :</b> - 35 kDa # *	<b>BS :</b> - 25 kDa *	<b>BS :</b> - 35 kDa *		<b>BS :</b> - 44 kDa
<b>2G10</b>  central (201-220)	<b>BP :</b> - 45 kDa	<b>BP :</b> - 54 kDa	<b>BP :</b> - 60 kDa - 50 kDa * - 25 kDa *	<b>BP :</b> 62 kDa *	<b>BP :</b> - 70 kDa - 55 kDa * - 28 kDa *	<b>BP :</b> - 80 kDa - 62 kDa * - 35 kDa *	<b>BP :</b> - 45 kDa	<b>BP :</b> - 54 kDa
	<b>BS :</b> - 35 kDa	<b>BS :</b> - 44 kDa		<b>BS :</b> 32 kDa *				<b>BS :</b> - 44 kDa
<b>19 C9</b>  N-ter (78-91)	<b>BP :</b> - 45 kDa	<b>BP :</b> - 54 kDa	<b>BP :</b> - 60 kDa - 50 kDa *	<b>BP :</b> - 63 kDa *	<b>BP :</b> - 70 kDa * - 52 kDa * - 28 kDa *	<b>NR</b>	<b>BP :</b> - 45 kDa	<b>BP :</b> - 52 kDa
	<b>BS :</b> - 38 kDa	<b>BS :</b> - 46 kDa		<b>BS :</b> - 70 kDa - 32 kDa *				
<b>21B2</b>  N-ter (78-91)	<b>BP :</b> - 45 kDa	<b>BP :</b> - 54 kDa	<b>BP :</b> - 60 kDa - 50 kDa *	<b>BP :</b> - 58 kDa *	<b>BP :</b> - 70 kDa * - 52 kDa * - 48 kDa - 32 kDa *	<b>NR</b>	<b>BP :</b> - 45 kDa	<b>BP :</b> - 54 kDa
				<b>BS :</b> - 70 kDa - 31 kDa *				
<b>1E6</b>  C-ter (400-412) phospho	<b>Absence</b>	<b>Absence</b>	<b>BP :</b> - 50 kDa *	<b>BP :</b> - 62 kDa *	<b>BP :</b> - 70 kDa - 52 kDa * - 40 kDa # - 32 kDa # - 28 kDa *	<b>BP :</b> - 63 kDa * - 56 kDa	<b>BP :</b> - 45 kDa	<b>BP :</b> - 52 kDa
			<b>BS :</b> - 60 kDa	<b>BS :</b> - 32 kDa *		<b>BS :</b> - 32 kDa *		
<b>11C10</b>  C-ter (400-412) phospho	<b>Absence</b>	<b>Absence</b>	<b>BP :</b> - 50 kDa *	<b>BP :</b> - 63 kDa *	<b>BP :</b> - 70 kDa - 52 kDa * - 40 kDa # - 32 kDa # - 28 kDa *	<b>BP :</b> - 63 kDa * - 56 kDa - 32 kDa *	<b>BP :</b> - 45 kDa	<b>BP :</b> - 52 kDa
			<b>BS :</b> - 60 kDa					
<b>2F11</b>  C-ter (400-412) phospho	<b>Absence</b>	<b>Absence</b>	<b>BP :</b> - 50 kDa *	<b>BP :</b> - 62 kDa * - 58 kDa	<b>BP :</b> - 70 kDa - 52 kDa * - 32 kDa # - 28 kDa *	<b>BP :</b> - 64 kDa * - 32 kDa *	<b>BP :</b> - 45 kDa	<b>BP :</b> - 52 kDa
			<b>BS :</b> - 60 kDa	<b>BS :</b> - 36 kDa *				

**Tableau XVIII :** Profils protéiques de la TDP-43 et de la p-TDP-43. La police violette concerne la mise en évidence de la TDP-43 phosphorylée **Abréviations :** # bandes révélées après précipitation des échantillons ; \* bandes communes avec les Ig G ; Absence : aucune bande détectée ; BP : bande(s) principale(s) ; BS : bande(s) secondaire(s) ; NR : non réalisé.

- **Cultures cellulaires**

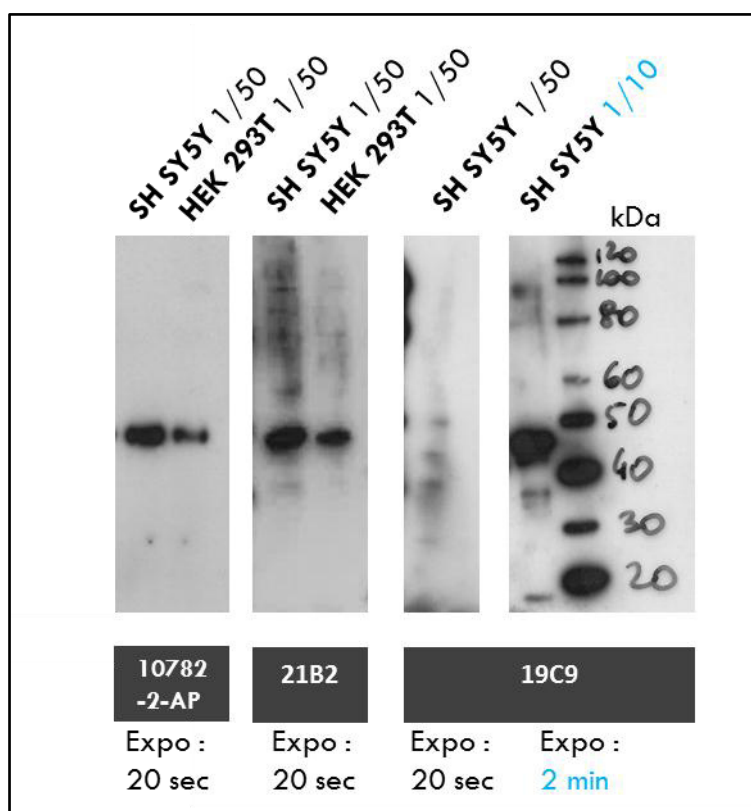
Par technique WB, l'anticorps 10782-2-AP dilué au 1/2000 a permis de mettre en évidence une bande de 45 kDa de forte intensité, associée à des bandes de plus faible intensité situées entre 30 et 40 kDa, dans les deux cultures cellulaires HEK 293T et SH-SY5Y dilués au 1/50. A dilution égale, les bandes obtenues avec ces dernières étaient moins intenses qu'avec la première lignée de cellules. Par la technique Simple Western, le même anticorps dilué au 1/50 a permis d'obtenir un profil similaire avec ces mêmes extraits cellulaires. Cependant, une différence d'environ 10 kDa entre les bandes obtenues par les deux techniques a été mise en évidence. En effet, avec l'automate, la bande principale était à 54 kDa et les bandes secondaires étaient détectées à environ 44 kDa (figure 49 A).

Cette variation de masse apparente de la TDP-43 observée en cas de recours à la technique Simple Western a par la suite été confirmée avec deux autres anticorps anti-TDP-43 totale, toujours dilués au 1/50 et qui présentaient un épitope différent de l'anticorps de référence 10782-2-AP. L'anticorps 2G10 était en outre issu d'une autre espèce animale (figure 49 B et C).



**Figure 49 :** Comparaison des profils de la TDP-43 des cellules SH SY5Y et HEK193T obtenus (A) en WB et en Simple Western avec l'anticorps polyclonal de lapin 10782-2-AP à épitope amino-terminal et (B et C) en Simple Western avec l'anticorps polyclonal de lapin 12892-1-AP à épitope carboxy-terminal et l'anticorps monoclonal de souris 2G10 à épitope central.

L'utilisation de l'anticorps 19C9 a permis de retrouver des profils de la TDP-43 identiques à ceux mis en évidence par les anticorps 10782-2-AP, 12892-1-AP et 2G10. En revanche, pour l'analyse réalisée en WB, il a été nécessaire de ne diluer les échantillons qu'au 1/10, et d'exposer le film photographique au contact de la membrane pendant un temps plus long comparé aux autres anticorps testés. L'anticorps 21B2 dilué au 1/2000 en Western Blot, a permis de révéler une bande de 45 kDa pour les deux types cellulaires dilués au 1/50 et pour un temps d'exposition de 20 secondes (figure 50).



**Figure 50** : Profils en WB de la TDP-43 des cellules SH SY5Y et HEK193T obtenus avec les anticorps 21B2 et 19C9 dilués au 1/2000, comparé au profil protéique obtenu avec l'anticorps de référence 10782-2-AP à la même dilution.

Concernant le 35G7, quelle que soit sa dilution (1/5000, 1/10 000, 1/20 000), la nature de la solution saturante (PBS-lait 5% ou PBS-BSA 3%) ou la durée d'exposition, le film est apparu intégralement noir, comme lors de la caractérisation des anticorps sur fractions cérébrales.

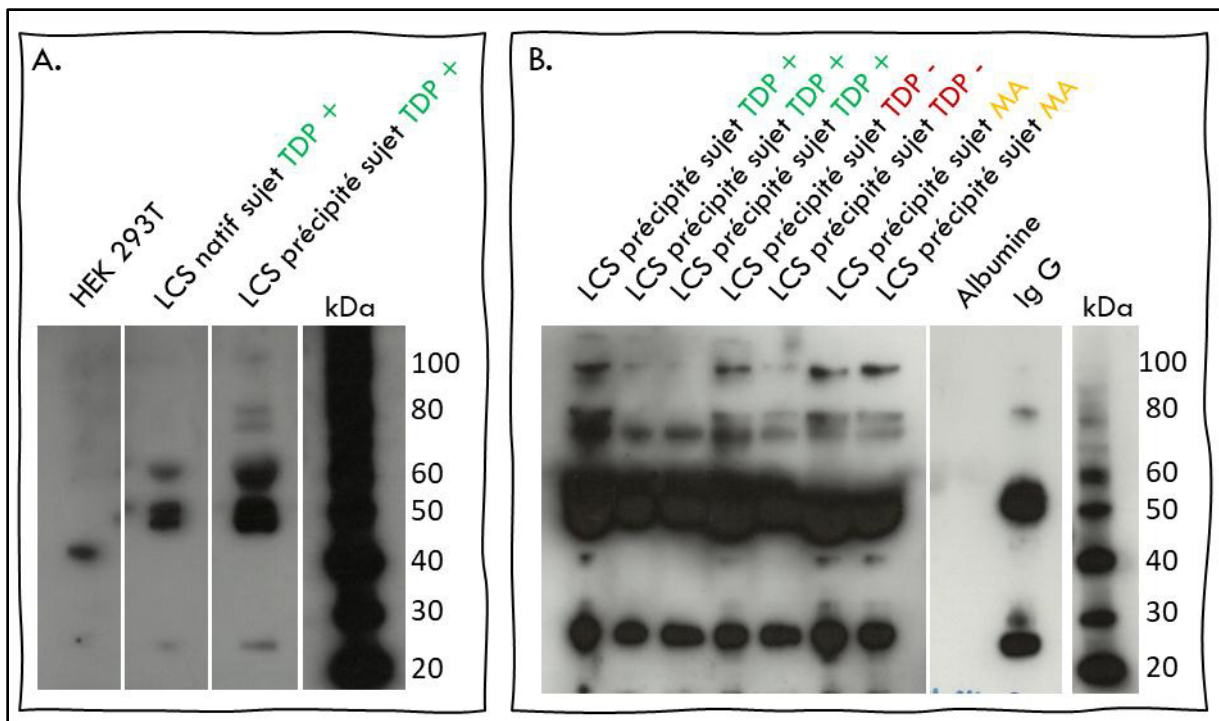
Avec les trois anticorps anti-p-TDP-43 409/410 synthétisés précédemment et testés ici à différentes dilutions (1/1000, 1/5000, 1/10 000), il n'a pas été possible non plus de détecter les cultures cellulaires, elles-mêmes préparées à différentes dilutions (1/5, 1/10, 1/50). Cependant, contrairement aux essais menés avec l'anticorps 35G7, les films obtenus étaient transparents et le marqueur de taille est apparu normalement.

- **LCS**

L'analyse qualitative par technique WB de la TDP-43 dans le LCS de patients atteints de DLFT-TDP a permis d'obtenir des profils différents suivant les anticorps utilisés. Cependant, quel que soit l'anticorps, aucune bande commune n'a été retrouvée avec les cultures cellulaires.

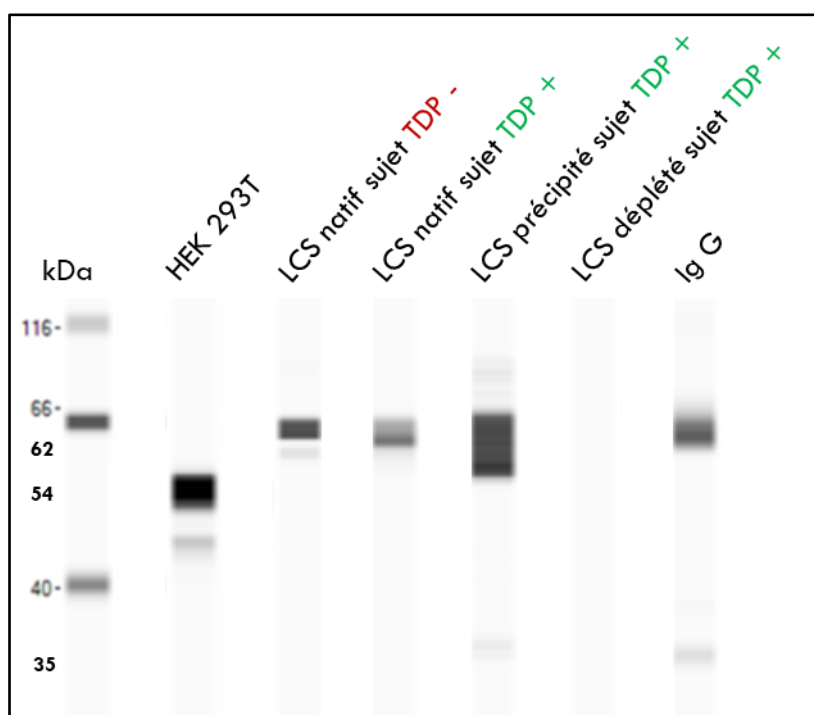
Avec l'anticorps 10782-2-AP dilué au 1/2000, il a été observé pour les LCS natifs un profil à une bande intense de 50 kDa, associée à une bande de 60 kDa de plus faible intensité. Ces deux bandes étaient plus fortes en cas de précipitation préalable des échantillons. Ce traitement préanalytique a aussi permis de mettre en évidence une bande de 25 kDa et de faibles bandes situées entre 70 et 80 kDa (figure 51 A).

Aucune différence n'a été observée entre les sujets. En revanche, l'étude d'une solution d'Ig G de concentration égale à 0,5 g/L a révélée des bandes d'environ 25 et 50 kDa communes avec les échantillons de LCS. Aucune bande n'a été mise en évidence par cet anticorps en travaillant avec une solution d'albumine de concentration égale à 0,4 g/L (Figure 51 B).



**Figure 51** : Profils obtenus en WB pour la TDP-43 issue du LCS en utilisant l'anticorps 10782-2-AP dilué au 1/2000 après une exposition de 2 minutes (A) comparé à une culture cellulaire et (B) comparé entre des patients atteints de DLFT-TDP et de DLFT-Tau ou de MA, ainsi qu'à une solution d'albumine à 0,4 g/L ou d'Ig G à 0,5 g/L.

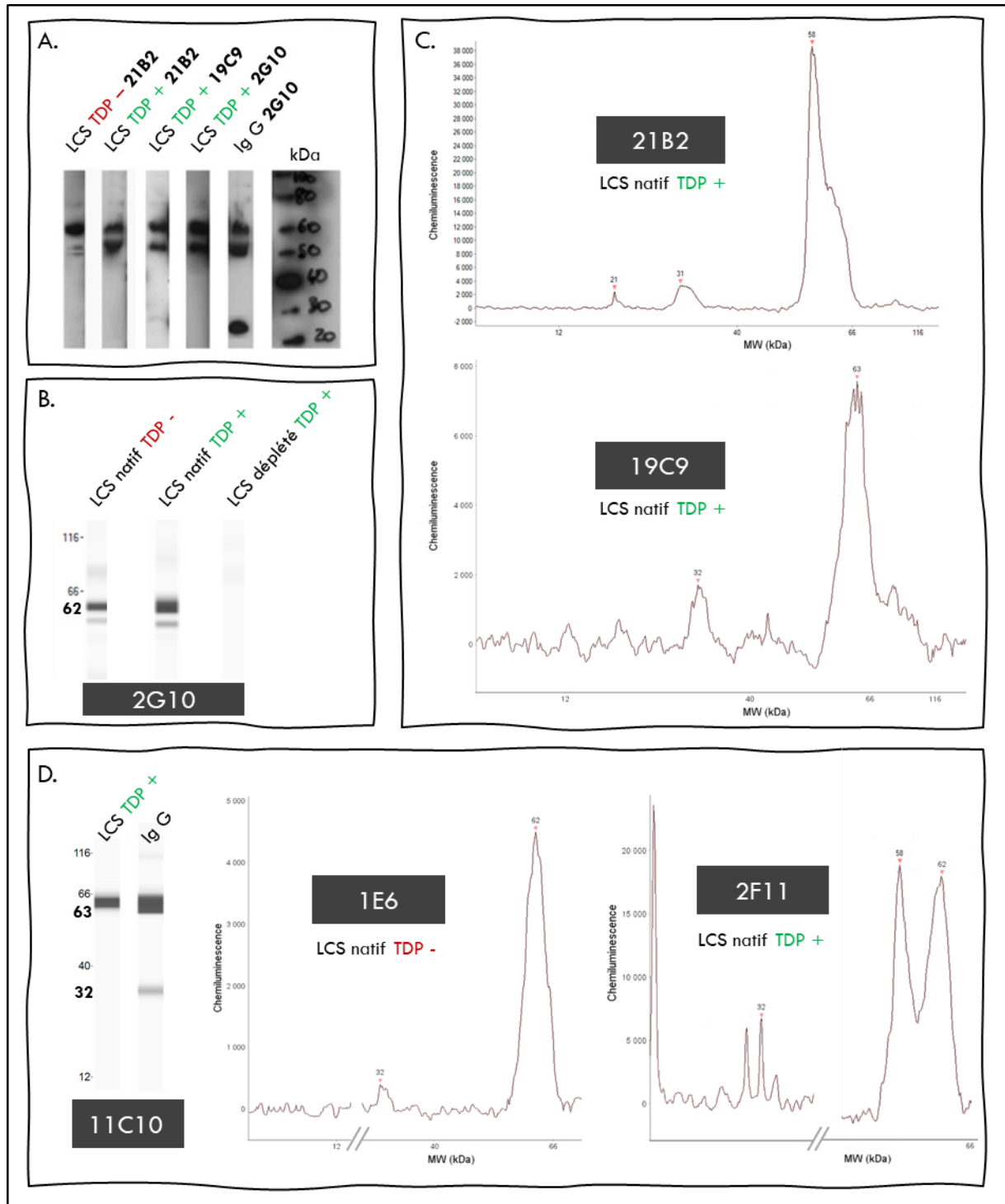
L'analyse par technique Simple Western de la protéine TDP-43 dans le LCS de patients atteints de DLFT-TDP et de DLFT-Tau, avec l'anticorps 10782-2-AP dilué au 1/50, a permis de mettre en évidence une bande majoritaire de 62 kDa chez tous les individus. La précipitation des échantillons de LCS à l'acétone a parfois fait apparaître une bande d'environ 35 kDa d'intensité modérée. Comme pour l'analyse réalisée par la technique du WB, il n'y avait aucune bande commune entre les échantillons et les cultures cellulaires. En revanche, les profils obtenus étaient superposables à ceux observés par l'analyse d'une solution d'Ig G de concentration égale à 0,5 g/L. Par ailleurs, une fois déplétés de ces Ig G, les échantillons de LCS ne présentaient plus aucun signal (figure 52).



**Figure 52 :** Profils obtenus par Simple Western pour la TDP-43 avec une exposition de 4 secondes en utilisant l'anticorps 10782-2-AP dilué au 1/50, en travaillant à partir du LCS d'un patient atteints de DLFT-TDP natif, concentré, ou déplété en albumine et en Ig G et comparé à une culture cellulaire, à un patients souffrant de DLFT-Tau, ainsi qu'à une solution d'Ig G à 0,5 g/L.

En utilisant les anticorps 21B2, 19C9 et 2G10 ou l'un des trois anticorps anti-p-TDP-43 409/410 synthétisés dans la première partie des travaux, l'analyse de la TDP-43 dans des échantillons de LCS, réalisée par WB ou par Simple Western a permis de mettre en évidence des profils similaires à ceux obtenus par l'utilisation de l'anticorps de référence 10782-2-AP. En effet, deux bandes principales de 50 et 60 kDa ont été révélées, associées à une bande de 25 kDa uniquement en cas d'utilisation de l'anticorps 2G10 (figure 53).

Avec ces six anticorps, les bandes révélées dans les échantillons étaient identiques entre tous les patients et présentaient également des masses moléculaires apparentes similaires aux bandes obtenues en travaillant avec une solution d'Ig G de concentration égale à 0,5 g/L.



**Figure 53 :** Détection de la TDP-43 dans le LCS de patients atteints de DLFT-TDP ou de DLFT-Tau (A) par WB avec les anticorps 21B2 (1/2000 ; exposition 1 minute), 19C9 (1/2000 ; exposition 5 minutes) et 2G10 (1/5000 ; exposition 2 minutes) et (B-D) par Simple western avec ces mêmes anticorps et les anticorps 1E6, 2F11 ou 11C10, tous dilués au 1/50 et pour un temps d'exposition de 4 secondes.

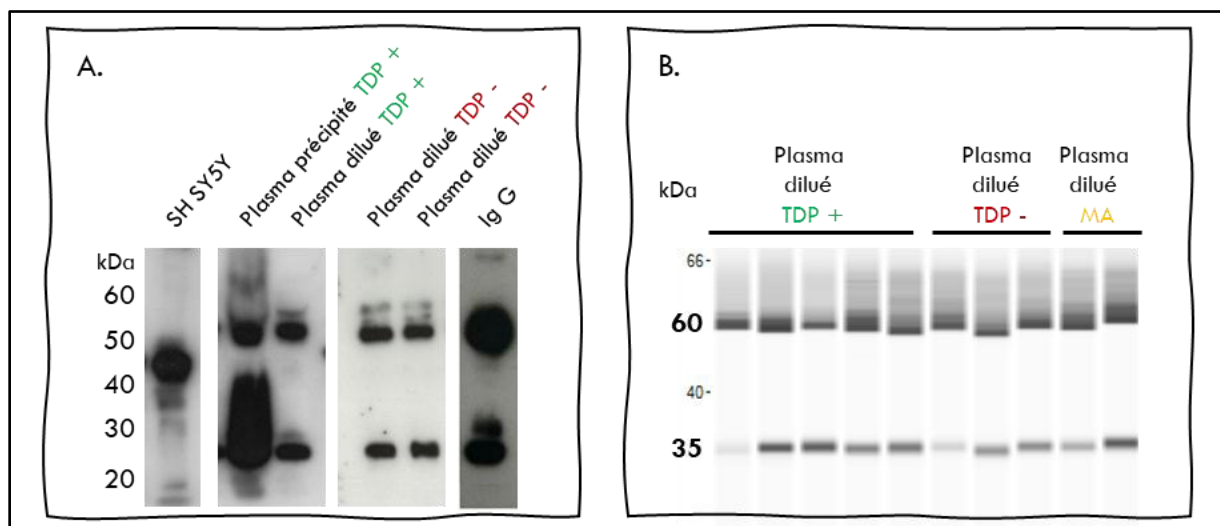


Concernant le 35G7, quelle que soit sa dilution (1/5000, 1/10 000, 1/20 000) et la nature de la solution saturante (PBS-lait 5% ou PBS-BSA 3%) utilisée, et malgré l'application d'une durée d'exposition de quelques secondes uniquement, les films sont apparus intégralement noir avec cette matrice.

- **Plasma**

Les travaux de caractérisation de la TDP-43 dans les fluides biologiques se sont poursuivis par l'analyse des profils de la TDP-43 issue de plasmas normalisés à une concentration de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , issus de patients atteints de DLFT-TDP, de DLFT-Tau ou de MA.

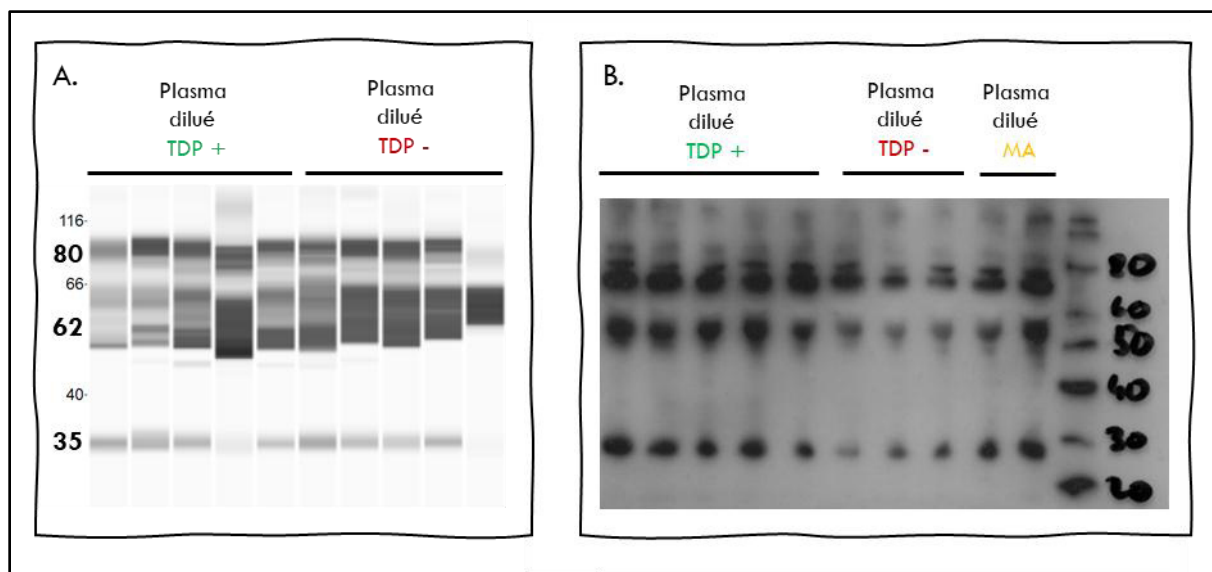
Dans un premier temps, l'anticorps 10782-2-AP dilué au 1/2000 en WB et au 1/50 en Simple Western a été utilisé. La concordance des résultats entre les deux techniques et le décalage de 10 kDa des bandes en faveur de l'automate se sont confirmées pour cette matrice (figure 54). D'autre part, comme avec les échantillons de LCS, les profils de la TDP-43 plasmatique étaient identiques entre les patients, et aucune bande située vers 45 kDa en WB (ou 55 kDa par Simple Western) n'a été mise en évidence, que le plasma soit dilué ou précipité par l'acétone. Ce traitement préanalytique a simplement eu pour effet de renforcer l'intensité des bandes. Par ailleurs, les profils de la TDP-43 plasmatique étaient similaires à celui observé pour une solution d'Ig G à 0,5 g/L (figure 54).



**Figure 54 :** Profils de la TDP-43 plasmatique révélés par l'anticorps 10782-2-AP chez des patients atteints de DLFT-TDP, de DLFT-Tau ou de MA, comparé aux profils d'une culture cellulaire SH SY5Y et d'une solution d'Ig G de concentration égale à 0,5 g/L (A) en WB et (B) par Simple Western.

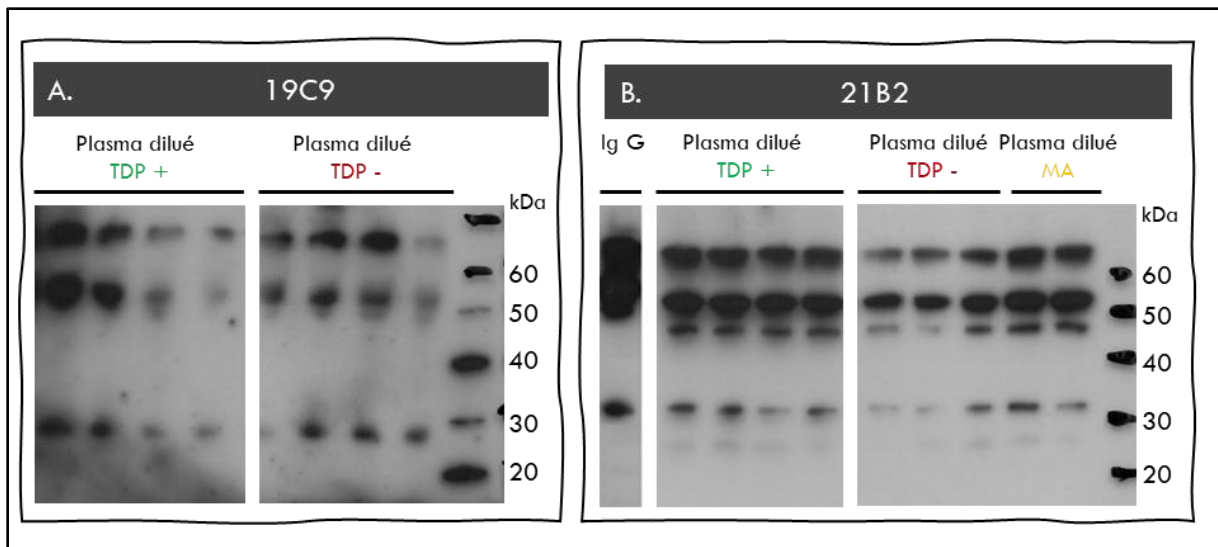
Ensuite, des analyses similaires par technique WB et par l'automate Peggy Sue ont été réalisées avec les anticorps anti-TDP-43 produit au sein de la société Roboscreen.

Avec les anticorps 2G10 et 19C9, les profils étaient proches de ceux déterminés en travaillant avec l'anticorps de référence 10782-2-AP, pour les échantillons de patients comme pour la solution d'Ig G. Cependant une bande supplémentaire d'environ 70 kDa en WB (et 80 kDa par Simple Western) a également été révélée avec ces deux nouveaux anticorps (figure 55 et figure 56 A).



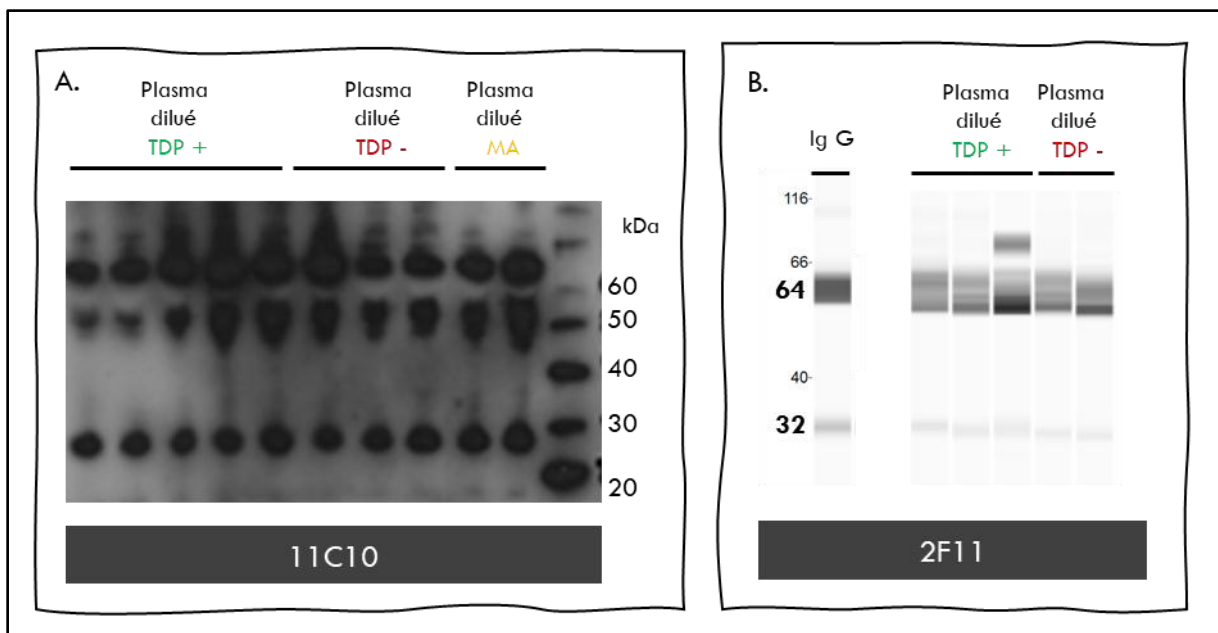
**Figure 55 :** Profils de la TDP-43 plasmatique révélés par l'anticorps 2G10 chez des patients atteints de DLFT-TDP, de DLFT-Tau ou de MA, comparé au profil d'une solution d'Ig G de concentration égale à 0,5 g/L (A) par Simple Western (anticorps dilué au 1/50 ; exposition de 4 secondes) et (B) en WB (anticorps dilué au 1/5000 ; exposition de 2 minutes).

Les profils de la TPD-43 plasmatique obtenus avec l'anticorps 21B2 étaient légèrement différents de ceux obtenus avec les autres nouveaux anticorps anti-TDP-43 totale. En effet, si les bandes d'environ 52 kDa et 70 kDa ont été retrouvées, la bande de plus petit poids moléculaire est apparue à 32 kDa au lieu de 28 kDa et une bande supplémentaire de 48 kDa a été révélée. Cette dernière n'était pas retrouvée dans le profil d'une solution d'Ig G de concentration égale à 0,5 g/L. Cependant, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les patients (figure 56 B).



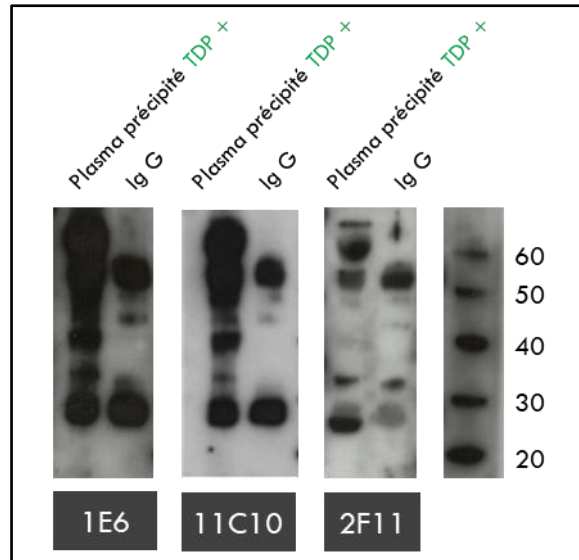
**Figure 56 :** Profils de la TDP-43 plasmatique (A) révélés par l'anticorps 19C9 (dilution au 1/2000 ; exposition de 10 minutes) chez des patients atteints de DLFT-TDP ou de DLFT-Tau et (B) révélés par l'anticorps 21B2 (dilution au 1/2000 ; exposition de 2 minutes) chez les mêmes patients et comparé au profil d'une solution d'Ig G de concentration égale à 0,5 g/L.

Les travaux réalisés avec les anticorps 1E6 et 11C10 ont permis d'obtenir des profils par technique WB et par l'automate Peggy Sue semblables aux profils protéiques révélés par les anticorps 2G10 et 19C9 (figure 57 A). En utilisant l'anticorps 2F11, les profils étaient plutôt similaires à ceux révélés par l'anticorps de référence 10782-2-AP (figure 57 B). Dans tous les cas, aucune différence entre les patients n'a été mise en évidence.



**Figure 57 :** Profils de la p-TDP-43 409/410 dans des plasmas dilués de patients atteints de DLFT-TDP, de DLFT-Tau ou de MA (A) révélés par WB avec l'anticorps 11C10 (dilution au 1/10 000 ; exposition de 2 minutes) et (B) obtenus par l'automate Peggy Sue avec l'anticorps 2F11 (dilution au 1/50 ; exposition de 4 secondes).

Après la précipitation des échantillons plasmatiques, les anticorps 1E6 et 11C10 ont permis de mettre en évidence des profils présentant des bandes supplémentaires de 32 et 40 kDa, qui n'étaient pas présentes dans les profils de la solution d'Ig G. Cependant, ce traitement préanalytique n'a pas permis de révéler de différence entre les patients (Figure 58).

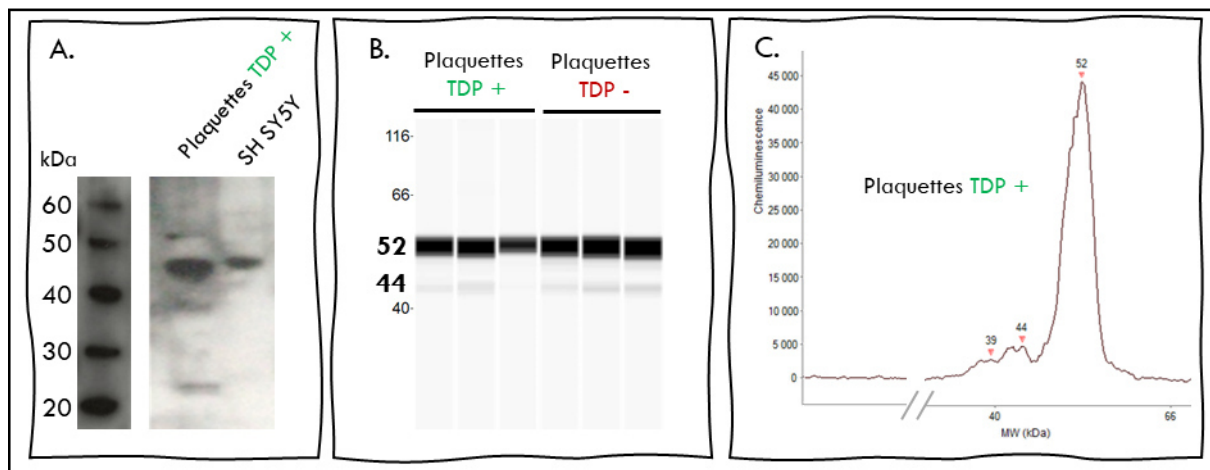


**Figure 58** : Profils de la p-TDP-43 409/410 dans des plasmas précipités de patients atteints de DLFT-TDP révélés par technique WB en utilisant l'anticorps 1E6 (dilution au 1/10 000 ; exposition de 2 minutes), l'anticorps 11C10 (dilution au 1/10 000 ; exposition de 5 minutes) ou l'anticorps 2F11 (dilution au 1/10 000 ; exposition de 2 minutes) en comparaison d'une solution d'Ig G de concentration égale à 0,5 g/L.

- **Plaquettes**

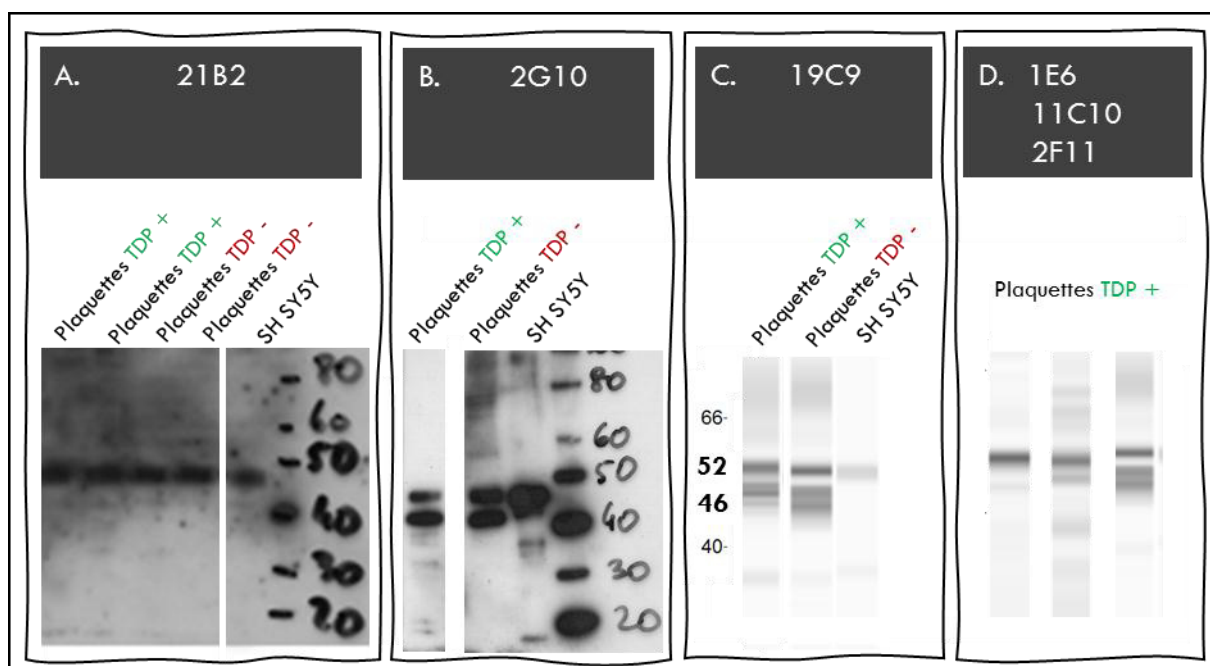
L'analyse des lysats plaquettaires avec l'anticorps 10782-2-AP dilué au 1/2000 en WB a révélé une bande très intense de 45 kDa. Par Simple Western, cette bande présentait une masse moléculaire apparente de 52 kDa avec le même anticorps dilué au 1/50.

Avec ces deux techniques, le poids moléculaire de cette bande était identique à celui de la bande mise en évidence dans les cultures cellulaires. En revanche, aucune différence dans les profils qualitatifs n'a été observée entre les patients atteints de DLFT-TDP et de DLFT-Tau (figure 59).



**Figure 59 :** Profils de la TDP-43 plaquettaire révélés par l'anticorps 10782-2-AP chez des patients atteints de DLFT-TDP ou de DLFT-Tau (A) en WB après une exposition de 2 minutes et comparé aux profils d'une culture cellulaire SH SY5Y diluée au 1/50 (B-C) par simple Western après une exposition de 4 secondes.

En analysant ces lysats plaquettaires avec les anticorps anti-TDP-43 (figure 60 A, B et C) et les anticorps anti-p-TDP-43 (figure 60 D) produits au sein de la société Roboscreen, des résultats similaires ont été obtenus.



**Figure 60 :** Profils de la TDP-43 plaquettaire (A) révélés par l'anticorps 21B2 (dilution 1/2000 ; exposition de 2 minutes) chez des patients atteints de DLFT-TDP ou de DLFT-Tau, comparé aux profils d'une culture cellulaire SH SY5Y (B) par l'anticorps 2G10 (dilution 1/5000 ; exposition de 1 minute) (C) par l'anticorps 19C9 (dilution 1/50 ; exposition de 4 secondes) et (D) par les anticorps anti-TDP-43 phosphorylée 1E6, 11C10 et 2F11 (dilution 1/50 ; exposition de 4 secondes).

### 1.3. Discussion

L'objectif principal de cette partie des travaux expérimentaux était d'analyser les profils qualitatifs de la TDP-43 dans des fluides biologiques accessibles du vivant des patients avec les nouveaux anticorps produits. Pour cela, il a été utilisé la technique du Western Blot (WB) ainsi qu'un automate Peggy Sue (ProteinSimple, USA). Bien que datant de la fin des années 1970, le WB reste une technique de référence dans les laboratoires et la littérature. Cependant, sa réalisation présente un certain nombre d'inconvénients. En effet, elle nécessite beaucoup d'étapes, souvent manuelles. De plus, l'opérateur se trouve en contact avec des produits toxiques comme l'acrylamide qui compose les gels. Ainsi, ces dernières années, des technologies alternatives comme le Simple Western ont émergé.

Les résultats obtenus avec ces deux méthodes étaient comparables, quels que soient la matrice étudiée et l'anticorps de détection utilisé, validant ainsi l'intérêt de cette technologie automatisée et miniaturisée. Une différence d'environ 10 kDa dans les masses moléculaires apparentes a cependant été observée entre les deux techniques. Celle-ci pourrait s'expliquer notamment par le fait que la séparation des protéines est différente entre les deux méthodes. En effet, les gels et les tampons de dilution ou de migration n'étant pas les mêmes, ils peuvent alors influencer diversement sur la conformation de ces protéines (480,481). De telles différences de résolution sont spécifiées par le fabricant de l'automate, qui précise que des variations allant jusqu'à 20 % dans les masses attendues sont possibles.

La démonstration de l'intérêt de la technique automatisée Simple Western pour l'étude des profils qualitatifs de la TDP-43 dans plusieurs matrices biologiques humaines a fait l'objet d'une publication internationale (annexe 1).

Les profils de la TDP-43 ont été déterminés à l'aide des anticorps synthétisés dans la première partie de la thèse, et comparés aux profils obtenus en travaillant avec l'anticorps 10782-2-AP (Proteintech, USA), qui est une référence dans la littérature (80,128,171). Cet anticorps est dirigé contre une séquence N-terminale de la protéine et détecte donc sa forme totale. Ainsi, dans les lysats de cultures cellulaires sécrétant naturellement la TDP-43, une bande majoritaire de 45 kDa par technique WB et de 54 kDa par la technique Simple Western ont été mises en évidence avec cet anticorps. Ce résultat était compatible avec les données de la littérature (121,482).

Un profil similaire a logiquement été retrouvé avec les anticorps 21B2, 19C9 et 2G10, ciblant également la forme totale de la TDP-43. Dans ces lysats cellulaires, les anticorps 1E6, 11C10 et 2F11, développés spécifiquement pour détecter une forme phosphorylée de la protéine TDP-43 n'ont pas permis d'obtenir de profil protéique malgré des essais réalisés en utilisant des concentrations élevées en anticorps et en lysats cellulaires. Ces résultats suggèrent que ces anticorps dirigés contre la TDP-43 phosphorylée en 409/410 sont assez spécifiques de cette forme de la protéine.

Une fois la méthode de détection validée sur la TDP-43 issue de cultures cellulaires, nous avons étudié la TDP-43 dans des échantillons de LCS puisqu'il s'agit d'une matrice souvent intéressante dans un contexte de maladie neurodégénérative, du fait de sa proximité avec le tissu cérébral et d'une composition moins complexe et moins concentrée en protéine que le sang. Cette seconde matrice a cependant également été explorée, car elle présente des avantages par rapport au LCS, notamment en termes de facilité de prélèvement, ce qui permettrait de pouvoir utiliser un potentiel biomarqueur sanguin pour le dépistage précoce des patients et pour le suivi dans le temps des sujets grâce à la réalisation de prélèvements répétés. Dans ces deux fluides biologiques, les profils protéiques ont été comparé avec une solution d'Ig G, car ce sont des protéines qui y sont abondantes.

Aucune bande commune avec celles des cultures cellulaires n'a pu être mise en évidence dans ces deux milieux, quel que soit l'anticorps utilisé. De plus, les bandes révélées étaient souvent de mêmes masses moléculaires apparentes que celles observées en travaillant à partir d'une solution d'Ig G. Par ailleurs, après la déplétion des Ig G de ces matrices, plus aucune bande n'était visible dans les échantillons. Ces résultats démontrent que le signal majoritairement observé est non spécifique et correspond probablement à une détection des chaînes légères et lourdes des immunoglobulines. Le fait que l'anticorps de référence manque de spécificité vis-à-vis de la TDP-43 est en accord avec la littérature (355,358,359).

Les nouveaux anticorps produits dans ces travaux de thèse ne semblent cependant pas corriger ce défaut. Dans les échantillons plasmatiques, une bande de 40 kDa mise en évidence par l'anticorps 21B2, et une bande de 48 kDa mises en évidence par les anticorps 1E6 et 11C10, ont cependant semblé plus spécifiques. Ces bandes étaient malheureusement présentes chez tous les patients, indépendamment de leur diagnostic. Elles pourraient donc correspondre à des isoformes de la TDP-43 non pathologiques.

Pour tenter d'expliquer l'absence de résultat probant dans le LCS, on peut s'interroger sur l'origine de la TDP-43 retrouvée dans ce fluide biologique. En effet, il a été observé dans une étude qu'en WB il était nécessaire de déposer 200 fois moins de sérum que de LCS pour obtenir une intensité de bande similaire entre les deux matrices. Or, ce ratio est cohérent avec celui des protéines pouvant passer du sang au LCS. De plus, dans cette étude l'analyse structurale de la TDP-43 associée à sa taille ont également permis d'estimer que le rayon hydrodynamique de la protéine lui permettait un tel passage. Après estimation de l'état de la BHE chez les patients étudiés, les auteurs ont alors conclu que la protéine présente dans le LCS serait plutôt d'origine périphérique (355). Cette altération de l'intégrité de la BHE et de la BHM dans les maladies neurodégénératives a par ailleurs été décrite dans d'autres publications, ce qui peut faciliter le passage d'éléments entre les deux fluides biologiques (483). La libération de la TDP-43 dans le LCS lors de la lyse neuronale ou par des systèmes d'excrétion a également été décrite dans la littérature (223). Ce phénomène pourrait alors être masqué par la présence importante de protéine d'origine périphérique, rendant très complexe l'identification spécifique de la protéine d'origine cérébrale.

Finalement, les résultats les plus intéressants ont été obtenus à partir de l'analyse des échantillons de lysats plaquettaires. Les profils qualitatifs obtenus par technique WB aussi bien que par la technique Simple Western étaient similaires à ceux de la TDP-43 issue des cultures cellulaires que l'on peut considérer comme des contrôles positifs. Il s'agit d'un milieu relativement simple à obtenir, puisque ces cellules peuvent être facilement isolées du sang total et ne sont pas particulièrement exigeantes en termes de conservation (484). De façon intéressante, elles présentent également des similitudes de fonctionnement et de composition protéique avec les neurones (380,381). Ces résultats ont été obtenus pour l'ensemble des anticorps utilisés, sans aucun signal parasite dû aux immunoglobulines. Aucune différence de profil en lien avec le diagnostic n'a toutefois été mise en évidence avec les premiers patients testés. Nous avons alors poursuivi notre étude de la TDP-43 plaquettaire totale et phosphorylée en position 409 et 410 par une analyse semi-quantitative des données obtenues avec plus de patients.



## 2. Approche semi-quantitative

### 2.1. Matériels et méthodes

#### 2.1.1 Echantillons

- *Protéine TDP43 recombinante*

La protéine recombinante « Ag1231 » (Proteintech, USA) utilisée était composée de la séquence en acides aminés 1 à 260 de la TDP-43, correspondant à son extrémité amino-terminale, associée à un marqueur « Gluthation-S-transférase ». Son poids moléculaire était de 56 kDa. Diverses dilutions de cette protéine ont été réalisées dans du NaCl, afin d'obtenir une gamme de concentration comprise entre 0,2 et 20 pg/mL, à partir d'une solution mère de concentration égale à 0,5 mg/mL.

- *Patients*

Dans une première partie des travaux, la TDP-43 a été étudiée dans les échantillons plaquettaires de neuf patients atteints de DLFT. Leur diagnostic a été réalisé selon les modalités décrites dans le paragraphe « Matériels et Méthodes » de la caractérisation qualitative de la TDP-43. Ces patients présentaient tous une histoire familiale de DLFT ou de SLA. Cependant, aucun variant pathologique associé au DLFT n'a été mis en évidence.

Ensuite, une cohorte plus importante a été constituée et comportait des patients atteints de DLFT-TDP ou de SLA. Le diagnostic des premiers a été réalisé toujours selon les mêmes modalités. Seuls des patients présentant un variant pathologique impliqué dans les DLFT-TDP ont été sélectionnés. Ainsi, parmi ces dix-sept sujets, neuf présentaient une mutation dans les gènes *C9ORF72* et sept une mutation dans le gène *GRN*. Le dernier patient était porteur d'une mutation dans le gène *TARDBP*. Le diagnostic des six patients atteints de SLA a été réalisé par un examen clinique, associé à l'imagerie médicale et à une analyse biologique en accord avec les critères d'El Escorial (47). Parmi ces individus, deux étaient porteurs d'une mutation dans le gène *C9ORF72*.

Quatorze sujets présymptomatiques (pré-S) et douze contrôles sains (CTS) ont également été ajoutés dans la cohorte de la seconde partie des travaux. Les CTS présentaient au moins un membre de leur famille souffrant d'une DLFT ou d'une SLA de type génétique. Cependant, n'étant pas eux-mêmes porteurs d'une telle mutation, la probabilité qu'ils développent une de ces maladies était théoriquement identique à celle de la population générale. Les prélèvements biologiques de ces deux groupes d'individus ont été recueillis dans le cadre du diagnostic génétique présymptomatique selon les recommandations établies pour la prise en charge des personnes à risque de maladie de Huntington (485).

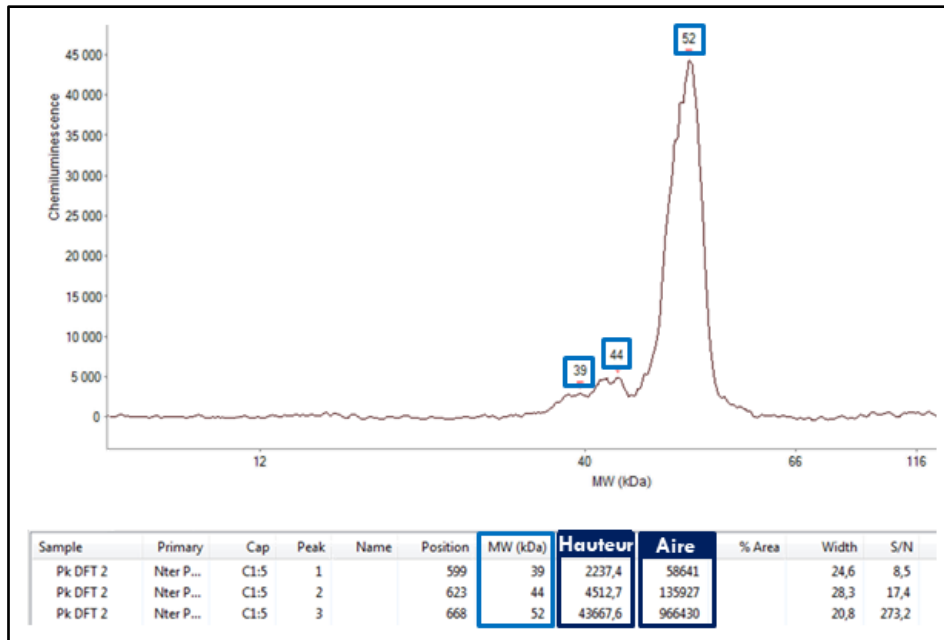
La cohorte a été constituée de façon à ce qu'il n'y ait pas de différence significative entre les groupes, concernant le sexe des sujets. Leurs données épidémiologiques sont résumées dans le tableau XIX.

	SLA (n = 6)	DLFT-TDP (n = 17)	Pré-S (n = 14)	CTS (n = 12)	p-value
Sexe (homme/femme)	2/4	7/10	6/8	6/6	0,9207
Age médian au prélèvement (années)	59,5	63	40,5	52,5	0,003722
Interquartiles	52-65	61-65,5	34-56	47-61,5	

**Tableau XIX** : Données épidémiologiques des patients constituant la cohorte pour l'étude de l'intérêt de la mesure semi-quantitative de la TDP-43 par technique Simple Western. **Abréviation** : CTS : contrôles sains non mutés ; Pré-S : sujets présymptomatiques porteurs de mutations impliquées dans les DLFT.

### 2.1.2 Méthode Simple Western semi-quantitative

Cette étude a été réalisée sur l'automate Peggy Sue. En effet, une évaluation semi-quantitative des protéines détectées est également possible du fait de la représentation des résultats sous la forme d'électrophorégramme. Des données chiffrées d'aires et de hauteurs de pic sont alors disponibles via l'interface du logiciel « Compass for Simple Western » (figure 61).



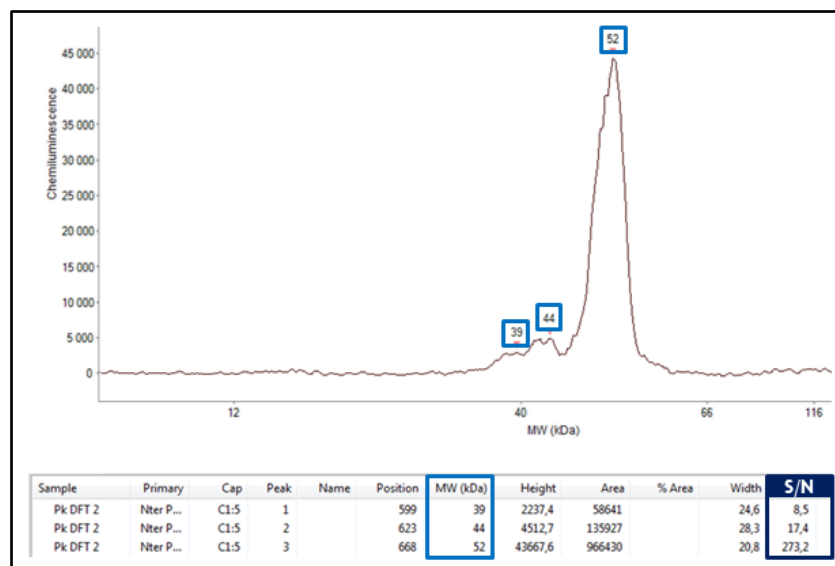
**Figure 61 :** Données semi-quantitatives fournies par l'automate Peggy Sue. A la fin de l'analyse, l'utilisateur dispose de l'aire et de la hauteur de chaque pic.

Pour l'évaluation initiale des performances semi-quantitatives de la technologie Simple Western, l'anticorps 10782-2-AP (Proteintech, USA) dilué au 1/50 a été utilisé, car lors de la réalisation de ces travaux les nouveaux anticorps développés chez Roboscreen n'étaient pas encore disponibles. Dans un premier temps, les limites de détection (LDD) et de quantification (LDQ) ont été calculées à partir de la mesure de six prélèvements contenant uniquement le tampon de dilution des réactifs, par les formules  $LDD = (\text{signal moyen de hauteur ou d'aire}) + 3 \times (\text{coefficient de variation})$  et  $LDQ = (\text{signal moyen de hauteur ou d'aire}) + 10 \times (\text{coefficient de variation})$ . Puis, la linéarité des signaux obtenus pour différentes concentrations de TDP-43 recombinante (Proteintech, USA) a été étudiée par une régression linéaire et par un modèle quadratique, ce dernier étant généralement plus proche de la réalité en biologie. Cette protéine de synthèse était constituée de l'extrémité amino-terminale de la TDP-43 pour pouvoir être détectée par l'anticorps.

Ensuite, les échantillons plaquettaires de neuf patients ont été analysés. Comme pour la TDP-43 recombinante, la linéarité des signaux obtenus pour différentes dilutions de ces échantillons a été étudiée par une régression linéaire. Pour les échantillons non dilués, la corrélation entre les hauteurs et les aires des pics a été déterminée par le coefficient de Person ( $r$ ). La variabilité entre les capillaires a été estimée par six passages du même échantillon au cours de la même série de mesure.

A la suite de cette première évaluation, les échantillons plaquettaires d'une plus grande cohorte de patients ont été analysés. La TDP-43 et la p-TDP-43 ont été détectées en utilisant l'anticorps 10782-2-AP (Proteintech, USA) et l'anticorps 22309-1-AP (Proteintech, USA) respectivement, toujours en raison de l'indisponibilité des nouveaux anticorps synthétisés au moment de la réalisation de ces travaux.

Les profils obtenus avec ces deux anticorps présentant plusieurs pics, le traitement des résultats a été effectué en sommant les aires des différents pics dont le rapport signal-sur-bruit était supérieur à 5 pour chaque échantillon et chacun des deux anticorps. Cette valeur correspond en effet au seuil au-delà duquel le fabricant considère qu'un pic est présent (figure 62). Nous avons ensuite exprimé les résultats sous la forme d'un rapport p-TDP-43/TDP-43 totale pour chaque échantillon.



**Figure 62 :** Pour chaque pic, l'automate fournit un indicateur de l'intensité du signal par rapport au bruit de fond.  
**Abréviation :** S/N : *signal-to-noise ratio*.

Enfin, la détermination quantitative des NfL a été réalisée à partir des échantillons plasmatiques appariés aux échantillons plaquettaires composant cette cohorte. Pour cela, l'automate MESO SECTOR S 600 (MSD, USA) a été utilisé. Cette technique, dans laquelle les signaux sont détectés par électrochimiluminescence, est suffisamment sensible pour mesurer les concentrations plasmatiques de ces protéines. Le kit « R-PLEX Human Neurofilament L Antibody Set » (# F217X-3 ; MSD, USA) a été utilisé conformément aux préconisations du fournisseur, à partir de 25µL d'échantillon mélangés volume à volume avec un tampon de dilution fourni par le fabricant.

### 2.1.3 Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel MedCalc (v 15.11.4). En raison du caractère non-gaussien des populations étudiées, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn ont été appliqués pour les comparaisons entre les groupes. La différence de répartition entre les hommes et les femmes au sein des cohortes a été évaluée par un test du Khi-deux. Dans l'ensemble des analyses, la valeur de probabilité p (p-value) qui correspond au degré de signification pour les probabilités, a été fixée à 0,05.

## 2.2. Résultats

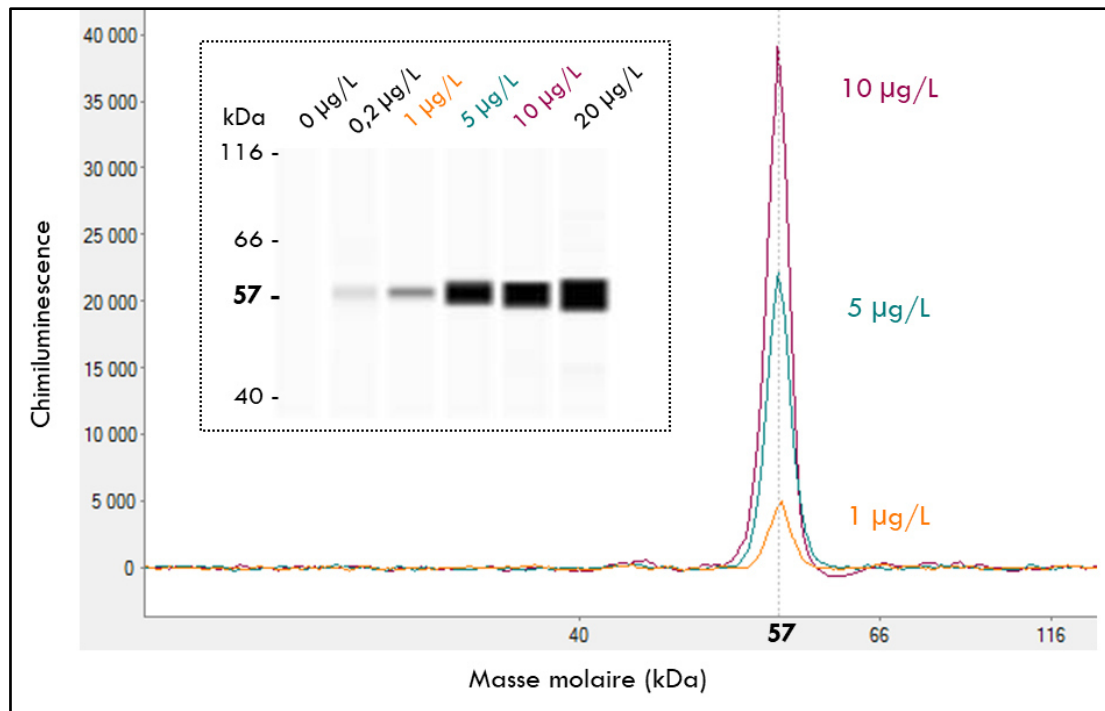
### 2.2.1 Validation de la méthode pour la caractérisation semi-quantitative de la TDP-43

Sur les échantillons ne contenant que le tampon de dilution, aucun pic présentant un rapport signal sur bruit supérieur à 5 n'était visible sur les tracés à la taille attendue pour la TDP-43. Le faible signal malgré tout mesuré à la taille attendue de 52 kDa a permis de calculer une LDD de 371 pour la hauteur des pics et de 1595 pour les aires. La LDQ a quant à elle été calculée à 930 pour la hauteur des pics et 4322 pour les aires.

L'analyse d'une dilution en cascade d'une solution de TDP-43 recombinante a mis en évidence un pic unique à 57 kDa dont l'intensité en termes de hauteur et d'aire était corrélée à la concentration en TDP-43 (tableau XX, figure 63).

TDP-43 recombinante (µg/L)	Hauteur	Aire
0	80	100
0,2	979	9 047
1	4 597	48 806
5	21 022	241 549
10	36 743	393 093
20	50 701	644 173

**Tableau XX :** Hauteurs du pic à 57 kDa et valeurs d'aire de solutions de TDP-43 recombinante après 4 secondes d'exposition.

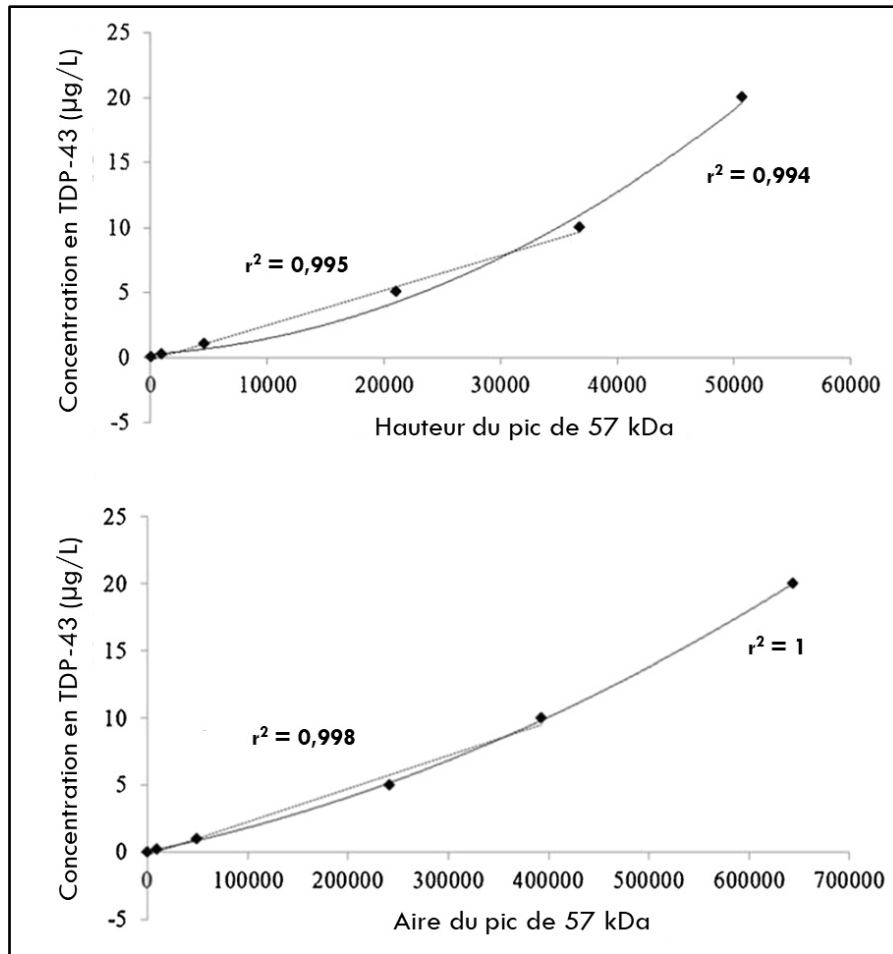


**Figure 63 :** Electrophorégramme et représentation en bande d'une dilution en cascade d'une solution de TDP-43 recombinante après 4 secondes d'exposition.

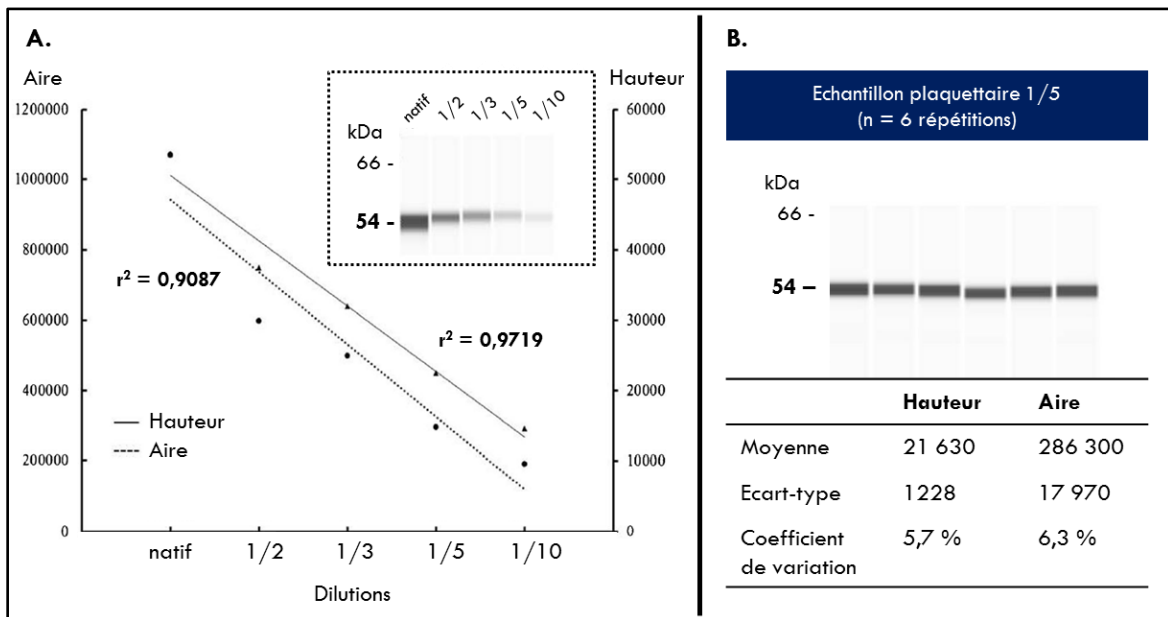
Les courbes de calibration obtenues ont montré un signal linéaire pour des concentrations en TDP-43 jusqu'à 10 µg/L. Une saturation du signal a été observée pour des concentrations entre 10 et 20 µg/L, que ce soit pour l'aire ou la hauteur des pics (figure 64). L'application d'un modèle quadratique a permis d'estimer une valeur de concentration pour les LDQ déterminées précédemment, égale à 0,35 µg/L pour les hauteurs des pics et à 0,13 µg/L pour les aires.

L'étude de neuf échantillons plaquettaires a permis d'identifier un pic majoritaire à 54 kDa, détectable jusqu'à une dilution au 1/10 des échantillons. La linéarité entre les dilutions des échantillons plaquettaires et les hauteurs ou les aires de ce pic était satisfaisante avec un coefficient de corrélation  $r^2$  supérieur à 0.90 (figure 65 A).

La variabilité de la méthode a été estimée par 6 mesures répétées du même échantillon au cours d'un même cycle de mesure. Le CV de répétabilité obtenu était de 5,7 % pour la hauteur du pic et de 6,3 % pour l'aire (figure 65 B).



**Figure 64 :** Courbes de calibration obtenues (A) pour les hauteurs et (B) pour les aires du pic à 57 kDa caractéristique de la TDP-43 recombinante, avec l'anticorps 10782-2-AP.



**Figure 65 :** Etude des performances analytiques de la détection semi-quantitative de la TDP-43 plaquettaire par Simple Western. (A) Etude de la linéarité par une dilution en cascade d'un échantillon de plaquettes. (B) Etude de la répétabilité de la détection de la TDP-43 plaquettaire selon la mesure de l'aire ou de la hauteur du pic à 54 kDa, exprimée en pourcentage de variation.

L'analyse en duplicat des échantillons plaquettaires chez les neuf patients a permis de mettre en évidence une variabilité dans les mesures de 0,1 % à 13,1 % pour les hauteurs et de 0,7 % à 13,6 % pour les aires (tableau XXI). Une excellente corrélation entre les valeurs d'aire et de hauteur du pic à 54 kDa a été observée ( $r = 0,986$ ).

	<b>Hauteur moyenne</b>	Ecart type	Coefficient de variation	<b>Aire moyenne</b>	Ecart type	Coefficient de variation
Patient 1	<b>19 750</b>	25	0,1 %	<b>363 476</b>	2580	0,7 %
Patient 2	<b>43 363</b>	79	0,2 %	<b>974 709</b>	15 054	1,5 %
Patient 3	<b>19 675</b>	2569	13,1 %	<b>379 628</b>	50 736	13,4 %
Patient 4	<b>28 583</b>	2742	9,6 %	<b>601 856</b>	37 526	6,2 %
Patient 5	<b>28 717</b>	3176	11,1 %	<b>523 724</b>	71 382	13,6 %
Patient 6	<b>41 743</b>	1015	2,4 %	<b>827 149</b>	12 269	1,5 %
Patient 7	<b>37 042</b>	1829	4,9 %	<b>693 959</b>	36 997	5,3 %
Patient 8	<b>25 686</b>	158	0,6 %	<b>479 711</b>	18 352	3,8 %
Patient 9	<b>1496</b>	28	1,9 %	<b>28 569</b>	2883	10,1 %

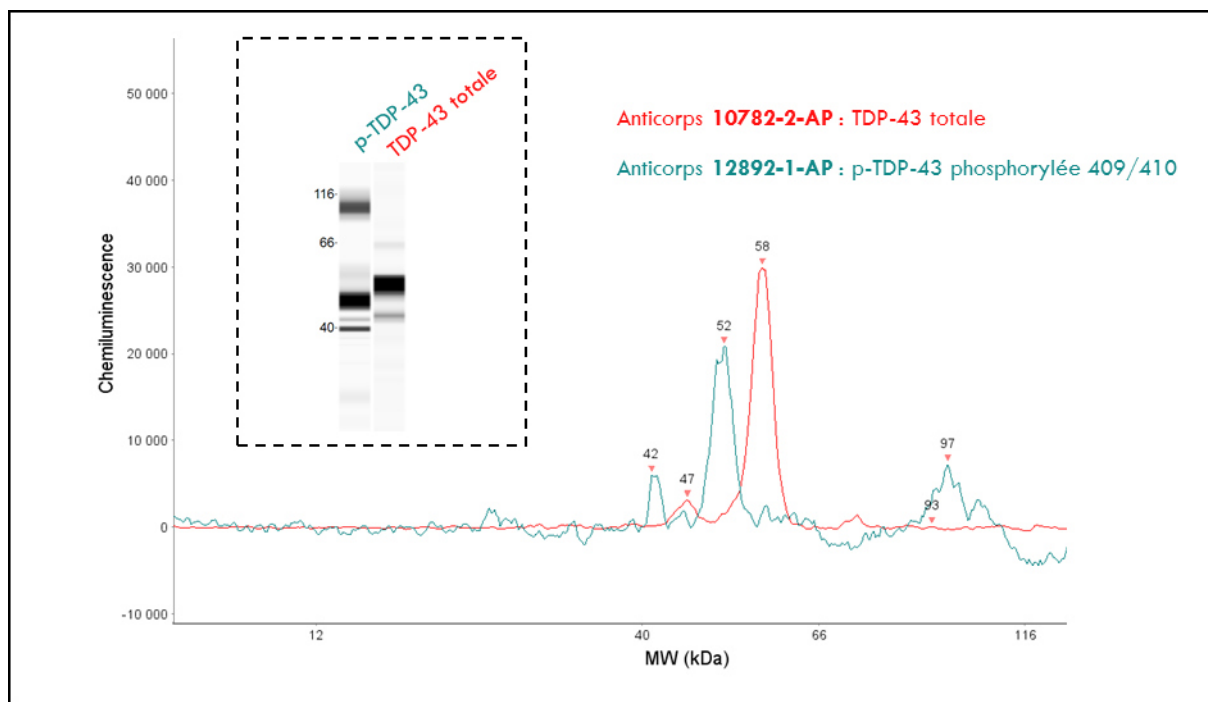
**Tableau XXI** : Résultats du dosage semi-quantitatif de la TDP-43 plaquettaire en duplicat chez neuf patients.

### 2.2.2 Etude semi-quantitative de la TDP-43 et de la p-TDP-43 plaquettaires dans une cohorte élargie de patients

Les profils protéiques obtenus par l'anticorps 10782-2-AP dirigé contre la forme totale de la TDP-43, et par l'anticorps 12892-1-AP dirigé contre la forme phosphorylée en position 409 et 410 de la protéine étaient relativement différents (figure 66).

Le tableau XXII résume le calcul de la somme des aires des pics principaux de la TDP-43 et de la p-TDP-43 plaquettaires dans la cohorte élargie. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les différents groupes, pour aucune des deux formes de la protéine.





**Figure 66** : Exemple de profils de migration protéique (A) de la TDP-43 plaquettaire totale et (B) de la p-TDP-43 plaquettaire obtenus par Simple Western avec des anticorps commercialisés par Proteintech dilués au 1/50 et après un temps d'exposition de 4 secondes.

	SLA (n = 6)	DLFT-TDP (n = 17)	Pré-S (n = 14)	CTS (n = 12)	p-value
<b>TDP-43</b>					
Valeur médiane	1 005 821	955 005	774 243	1 078 144	<b>0,5208</b>
25th percentile	386 879	653 326	565 094	727056	
75th percentile	1 292 479	1 399 523	1 093 535	1481531	
<b>p-TDP-43</b>					
Valeur médiane	946 372	372 827	454 077	333 733	<b>0,215125</b>
25th percentile	423 827	239 049	178 262	186 375	
75th percentile	1 032 860	565 359	877 710	548 851	

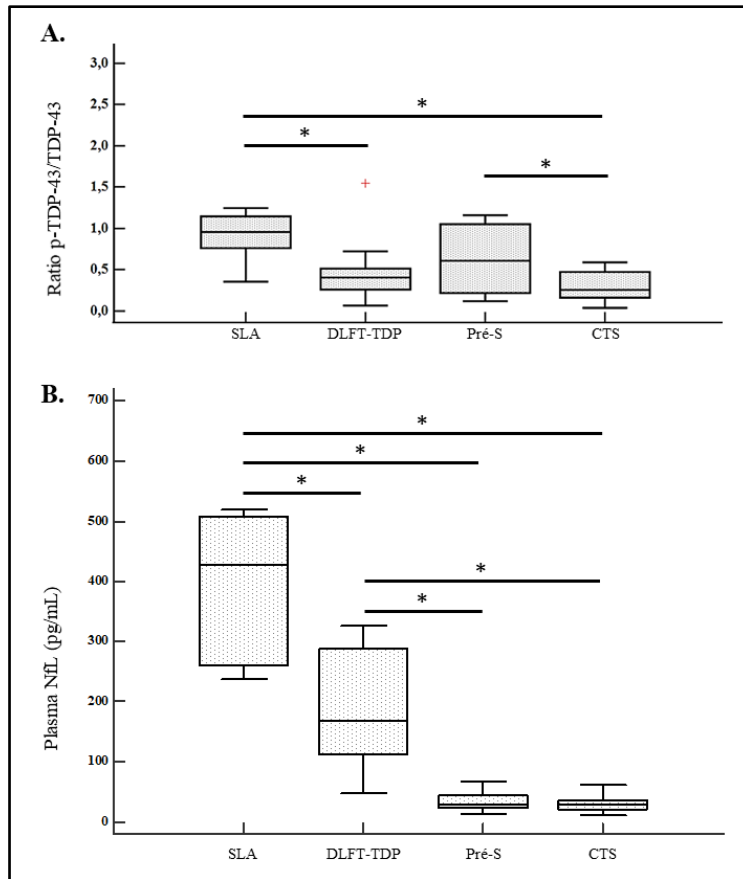
**Tableau XXII** : Somme des aires des pics de la TDP-43 et de la p-TDP-43 plaquettaires chez des patients atteints de SLA, de DLFT-TDP et chez des sujets pré-S ou CTS. **Abréviations** : CTS : contrôles sains non mutés ; Pré-S : sujets présymptomatiques porteurs de mutations impliquées dans les DLFT.

Le ratio p-TDP-43/TDP-43 était significativement augmenté chez les patients atteints de SLA comparé aux patients atteints de DLFT-TDP ou aux CTS. Aucune différence n'a en revanche été mise en évidence entre ces deux derniers groupes. Ce ratio était également plus élevé chez les sujets pré-S comparé aux CTS (tableau XXIII ; figure 67 A).

Concernant les concentrations en NfL dans les échantillons plasmatiques dont sont issues les extractions plaquettaires, il a été observé une différence significative entre tous les groupes, à l'exception des patients présymptomatiques qui n'étaient pas significativement différents des contrôles (tableau XXIII ; figure 67 B).

	SLA (n = 6)	DLFT-TDP (n = 17)	Pré-S (n = 14)	CTS (n = 12)	p-value
<b>ratio p-TDP-43/ TDP-43</b>	<b>0,957</b>	<b>0,407</b>	<b>0,609</b>	<b>0,257</b>	<b>0,02257</b>
<b>plaquettaires</b>					
Interquartiles	0,762-1.146	0,261-0,514	0,219-1,052	0,163-0,474	
<b>NfL plasmatiques</b>					
<b>Valeur médiane (pg/mL)</b>	<b>428,15</b>	<b>168</b>	<b>28,85</b>	<b>28,3</b>	<b>&lt; 0,000001</b>
Interquartiles (pg/mL)	260,5-507,9	112,5-287,1	22,9-45,1	20,9-37,4	

**Tableau XXIII :** Ratio entre la somme de l'aire des pics de la p-TDP-43 et celle de la TDP-43, et valeurs des NfL plasmatiques chez les patients atteints de SLA, de DLFT-TDP et chez les sujets pré-S ou CTS mesurées par MSD.  
**Abbréviations :** CTS : contrôles sains non mutés ; NfL : Neurofilaments à chaîne légère ; Pré-S : sujets présymptomatiques porteurs de mutations impliquées dans les DLFT.



**Figure 67** : Comparaison chez les sujets atteints de SLA, de DLFT-TDP et chez les sujets pré-S ou CTS (A) du ratio p-TDP-43/TDP-43 dans des échantillons plaquettaires et (B) des valeurs des NfL plasmatiques. La croix rouge symbolise une valeur aberrante. \* p value < 0,05. **Abréviations** : CTS : contrôles sains non mutés ; NfL : Neurofilaments à chaîne légère ; Pré-S : sujets présymptomatiques porteurs de mutations impliquées dans les DLFT.

### 2.3. Discussion

Dans ce travail, nous avons voulu savoir si une estimation semi-quantitative de la TDP-43 plaquettaire réalisée par une technique automatisée et miniaturisée sur l'automate Peggy Sue (ProteinSimple, USA) permettait de mettre en évidence des différences entre des sujets atteints de DLFT-TDP ou de SLA, comparé à des individus présymptomatiques ou des contrôles sains.

La technologie Simple Western n'étant pas encore très répandue et la méthode étant intégralement développée au laboratoire, il a été nécessaire de vérifier ses performances analytiques. Les premiers essais ont été réalisés avec de la protéine TDP-43 recombinante et l'anticorps commercial 10782-2-AP (Proteintech, USA), considéré comme une référence dans la littérature. Dans nos conditions opératoires, la taille du pic observé pour la protéine recombinante concordait avec sa taille théorique. Le signal obtenu linéaire pour des concentrations en protéine jusqu'à 10 µg/L, la LDQ égale à 0,35 µg/L pour les aires et à 0,13 µg/L pour les hauteur du pic permettaient d'envisager de travailler avec des échantillons issus de patients. Les données de répétabilité étaient également satisfaisantes pour une méthode semi-quantitative développée en interne, avec des CV inférieurs à 10 %.

Le choix s'est porté sur les lysats plaquettaires, car la première partie de cette étude a démontré qu'ils permettaient de s'affranchir des interactions croisées de l'anticorps 10782-2-AP avec les immunoglobulines. De plus, une étude réalisée avec le même automate et le même anticorps a permis de mettre en évidence des différences entre des patients atteints de MA et des individus contrôles avec ce type d'échantillons (391).

La relation entre la concentration en TDP-43 plaquettaire et l'intensité du signal a été confirmée dans notre travail, que ce soit pour l'aire ou la hauteur du pic à 54 kDa. De plus les valeurs de ces deux paramètres étaient bien corrélées et la part de leurs variations imputable à l'automate était inférieure à 7 %, soit du même ordre de grandeur qu'avec une technique quantitative de type ELISA (486). Parmi les neuf échantillons plaquettaires de notre première évaluation, la valeur minimale de la hauteur du pic à 54 kDa correspondant à une concentration de 0,39 µg/L en appliquant l'équation de la droite d'étalonnage déterminée en travaillant avec la protéine recombinante. Cette valeur supérieure à la LDQ était donc interprétable et permettait d'envisager d'utiliser cette technique de mesure dans des échantillons de patients.

D'autre part, les variations de TDP-43 observées entre les échantillons de la petite cohorte de neuf patients atteints de DLFT étaient supérieures à la variabilité de la technique, alors que les concentrations en plaquettes étaient normalisées à 200 G/L dans chaque préparation. Cette observation signifiait que la technique pouvait permettre d'envisager de mesurer des différences de TDP-43 entre les individus. L'ensemble de ces éléments a permis de valider notre technique sur échantillons plaquettaires. Cette validation a fait l'objet d'une publication internationale présentée à la fin de ce manuscrit (annexe 1).

Nous avons alors élargi notre travail à l'étude d'un plus grand nombre d'échantillons de patients de diagnostic de DLFT-TDP confirmé par des examens génétiques. Comme groupes de comparaison, nous avons inclus des patients atteints de SLA, car la TDP-43 est impliquée dans 97 % des cas de cette pathologie (71), ainsi que des sujets porteurs de mutations au stade présymptomatique et des apparentés non porteurs considérés comme contrôles.

L'étude de la TDP-43 plaquettaire totale a été complétée par l'étude de sa forme phosphorylée en 409 et 410, décrite comme plus spécifiquement impliquée dans le processus physiopathologique, car présente dans les inclusions de TDP-43 cytoplasmique neuronale et absente au niveau nucléaire (160). Pour prendre en compte la diversité des isoformes de la TDP-43 détectée lors de ces analyses qualitatives, la somme de tous les pics significatifs observés sur les profils a été réalisée. Malgré cela, aucune différence n'a été mise en évidence entre les différents sujets. Pourtant, les concentrations plaquettaires en TDP-43 chez des patients souffrant de SLA ont été rapportées comme augmentées par rapport à des sujets contrôles dans une étude (397). Cependant, un recouvrement important des valeurs a également été décrit. De plus, les plaquettes présentent une durée de vie relativement courte, de l'ordre de 7 à 10 jours, impliquant que les mesures de la TDP-43 plaquettaire reflètent uniquement des événements récents (487).

Le ratio de la TDP-43 phosphorylée en 409 et 410 sur la TDP-43 totale a ensuite été calculé pour évaluer si une mesure tenant compte d'une forme plus spécifique de la pathologie pouvait être plus informatif. Ce ratio était augmenté chez les sujets atteints de SLA en comparaison des individus contrôles, mais ce résultat n'a pas été retrouvé chez les sujets souffrant de DLFT-TDP, peut être en raison d'un effectif trop réduit. De façon intéressante, ce rapport était également augmenté chez les sujets présymptomatiques comparé aux apparentés non porteurs de variant pathologique impliqué dans les DLFT.

Le dosage des NfL plasmatiques était en accord avec les données de la littérature, avec une augmentation plus importante chez les patients atteints de SLA que de DLFT-TDP et des valeurs basses chez les contrôles. Dans notre cohorte, les porteurs présymptomatiques ne présentaient pas de concentrations en NfL différentes de celles des apparentés non porteurs, à l'inverse de ce que l'on peut observer pour le ratio de TDP-43 plaquettaire. Si ces données sont confirmées, cela pourrait permettre d'envisager que le ratio entre la TDP-43 pathologique et la TDP-43 totale soit plus précocement informatif que les NfL, au tout début d'évolution de la maladie. Ce ratio pourrait alors être envisagé comme un marqueur précoce d'entrée dans la maladie. Ce type de marqueur est particulièrement intéressant pour inclure dans des essais cliniques des patients chez lesquels la pathologie n'a pas encore trop progressée (305). Dans ce contexte d'utilisation, le fait que les plaquettes soient facilement obtenues à partir d'un prélèvement sanguin est un atout majeur (377).

### 3. Approche quantitative

Cette sous-partie des travaux de caractérisation de la TDP-43 dans les fluides biologiques accessibles du vivant des patients avait pour objectif d'évaluer une méthode de dosage ultra-sensible commerciale (SiMoA pour *Single Molecule Array* ; Quanterix, USA).

#### 3.1 Matériels et méthodes

##### 3.1.1 Patients

- *Conditions de réalisation du diagnostic*

Les patients inclus dans cette étude étaient atteints de DLFT ou de MPP. Leur diagnostic a été réalisé selon les modalités décrites dans le paragraphe « Matériels et Méthodes » de la caractérisation qualitative de la TDP-43. Parmi les quatorze patients atteints de DLFT de type comportemental inclus, un sujet présentait également des troubles moteurs. Grâce aux outils de diagnostic génétique disponibles au laboratoire de Neurochimie des HCL, il a été mis en évidence une mutation dans les gènes *C9ORF72* chez cinq patients et une mutation dans le gène *GRN* chez un patient. La cohorte comportait également dix patients atteints de MPP, composés de cinq cas de dépression majeure et cinq cas de troubles bipolaires.

La cohorte a été constituée de façon à ce qu'il n'y ait pas de différence significative entre les deux groupes de pathologies, concernant l'appariement en âge et en sexe. Leurs données épidémiologiques sont résumées dans le tableau XXIV.

	DLFT (n = 14)	MPP (n = 10)	p-value
Sexe (homme/femme)	4/10	5/5	0,4219
Age médian au prélèvement (années)	63,5	68	0,4702
Interquartiles	59-72	64-71	

**Tableau XXIV :** Données épidémiologiques des patients inclus dans la cohorte des échantillons couplés plasma/LCS pour le dosage de la TDP-43. **Abréviations :** DLFT : dégénérescences lobaires frontotemporales ; PSY : pathologies psychiatriques.

- **Conditions de réalisation des prélèvements et traitement préanalytique**

Les échantillons de sang et de LCS des patients ont été obtenus selon les modalités décrites dans le paragraphe « Matériels et Méthodes » de la caractérisation qualitative de la TDP-43.

Après la réalisation des examens diagnostiques spécialisés, les reliquats biologiques des patients ont été aliquotés et conservés à une température de -80°C. Ils n'ont été décongelés qu'à l'occasion de la réalisation de cette étude.

### 3.1.2 Réalisation des mesures

Les dosages ont été réalisés sur l'analyseur SiMoA HD-1 (Quanterix, USA), en suivant les instructions du fabricant. Cet outil est accessible aux équipes des HCL via une plateforme partagée avec la société bioMérieux.

Le kit commercial « Simoa TDP-43 Advantage Kit » (# 103293 ; Quanterix, USA) utilisé contient un mélange d'anticorps, dirigés à la fois contre la séquence en acides aminés 203 à 209 de la protéine et sa région carboxy-terminale. Ce kit devrait donc théoriquement permettre de détecter la forme totale de la TDP-43, mais aussi ces fragments tronqués pathologiques. Les dilutions nécessaires aux mesures ont été effectuées manuellement (tableau XXV).

Kit « TDP-43 »	
<b>Dilution du LCS et du plasma</b>	<p><b>1/4 manuellement</b></p> <p>Volume nécessaire en cas de monoplicat : 100 µL prélevé + 30 µL VM ⇒ 38 µL de LCS ou de plasma + 114 µL de diluant</p> <p>Volume nécessaire en cas de duplicat : (100 x 2) µL prélevé + 30 µL VM ⇒ 70 µL de LCS ou de plasma + 210 µL de diluant</p>
LDQ fabricant	8,23 pg/ml
LDD fabricant	2,48 pg/ml

**Tableau XXV :** Dilutions réalisées pour la mesure par le SiMoA HD-1 des protéines t-Tau, NfL, pNfH, UCHL1 et GFAP. **Abréviations :** LDD : Limite de détection ; LDQ : Limite de quantification ; VM : volume mort.



Les essais ont été réalisés par le même opérateur et sur le même automate. Par ailleurs, tous les réactifs portaient le même numéro de lot. Différents paramètres ont été vérifiés pour valider les expériences. Le coefficient de détermination de la droite d'étalonnage obtenue par la mesure des standards en duplicat était satisfaisant ( $R^2 > 0,99$  systématiquement). Les concentrations des contrôles haut et bas fournis dans le kit étaient dans l'intervalle des valeurs autorisées par le fabricant.

La sensibilité importante de la technologie SiMoA est obtenue par un système innovant de détection du signal (figure 68) (488,489) :

Dans ce système, les anticorps de capture sont couplés à des billes magnétiques. Lors du contact entre l'échantillon biologique dilué et un large excès de billes couplées, un et un seul analyte se fixera à la surface des billes selon la loi statistique de Poisson.

Ensuite, l'ajout d'un anticorps de détection biotinylé (« ACBi »), puis de la streptavidine couplée à la  $\beta$ -galactosidase permet de former le complexe immun « ACBi + biotine + streptavidine +  $\beta$ -galactosidase » uniquement pour les billes ayant fixées l'analyte cible.

L'ensemble des billes sera alors réparti dans plus de 5 millions de micropuits ne pouvant contenir qu'une seule bille. À la fin de la répartition, les puits pourront être vides, contenir une bille avec un complexe immun ou contenir une bille sans complexe immun.

Après ajout du substrat de l'enzyme, une caméra enregistre la fluorescence des puits. La détection de cette fluorescence dans chaque puits individuel donne une grande sensibilité à l'automate. De plus, effectuer cette mesure en micropuits, dont le volume réactionnel est un milliard de fois plus faible que celui d'un ELISA classique, permet de ne pas diluer le signal. La concentration de l'analyte sera alors calculée par le SiMoA, à partir du rapport entre le nombre de puits contenant des billes ayant fixé un complexe immun, et le nombre total de puits occupés par des billes.

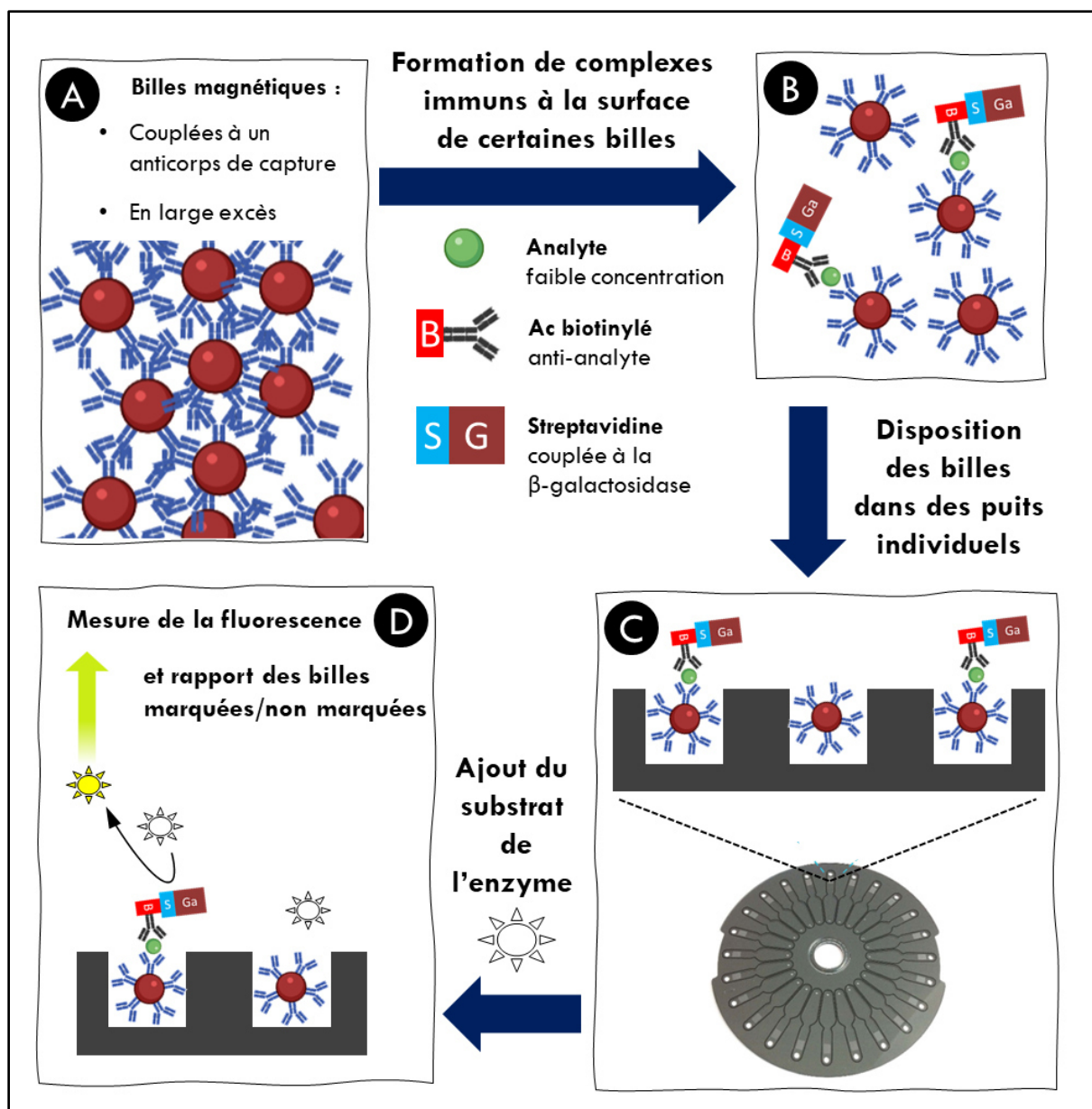


Figure 68 : Principe de fonctionnement de l'analyseur SiMoA HD-1. Abréviations : Ac : anticorps ; B : biotine ; G :  $\beta$ -galactosidase ; S : streptavidine.

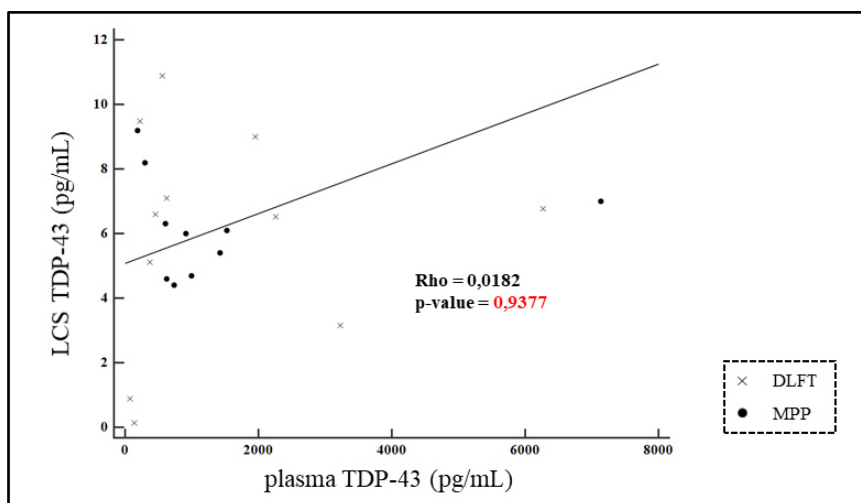
### 3.1.3 Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel MedCalc (v 15.11.4). En raison du caractère non-gaussien des populations étudiées, le test non paramétrique de Mann-Whitney a été employé pour la comparaison des deux groupes. La différence de répartition entre les hommes et les femmes au sein des cohortes a été évaluée par un test du Khi-deux. Les corrélations entre les concentrations obtenues dans le LCS et le plasma, ont été déterminées par le test de rang de Spearman. Dans l'ensemble des analyses, la valeur de probabilité p (p-value) qui correspond au degré de signification pour les probabilités, a été fixée à 0,05.

## 3.2. Résultats

### 3.2.1 Étude de corrélation entre le LCS et le plasma

Pour la TDP-43, aucune corrélation entre les concentrations mesurées dans le LCS et le plasma n'a été mise en évidence (figure 69).



**Figure 69** : Corrélation de rang des concentrations mesurées dans le LCS et le plasma pour la TDP-43. **Abréviation** : MPP : maladies psychiatriques primaires ; Rho : coefficient de corrélation de rang de Spearman.

### 3.2.2 Intérêt diagnostique de la TDP-43

Les concentrations de la TDP-43 dans la cohorte des échantillons de LCS/plasma couplés ne présentaient pas de différence statistique entre les patients atteints de maladies du spectre DLFT SLA et ceux souffrant de MPP. De plus, les concentrations dans le LCS étaient inférieures à la LDQ, fixée à 8,23 pg/mL par le fabricant (tableau XXVI).

TDP-43	DLFT (n = 14)	MPP (n = 10)	p-value
<b>Valeur médiane dans le LCS (pg/mL)</b>	<b>6,6</b>	<b>6,1</b>	<b>0,6727</b>
Interquartiles (pg/mL)	3,64 – 8,52	4,7 - 7	
<b>Valeur médiane dans le plasma (pg/mL)</b>	<b>509</b>	<b>822</b>	<b>0,4823</b>
Interquartiles (pg/mL)	346 – 1952	606 – 1422	

**Tableau XXVI** : Concentrations des pNfH dans le LCS et le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP. **Abréviation** : MPP : maladies psychiatriques primaires.

### 3.3. Discussion

Ce travail de caractérisation quantitative de la TDP-43 dans un contexte de DLFT avait deux objectifs principaux. Le premier consistait à évaluer la corrélation des concentrations en TDP-43 dans des échantillons couplés de LCS et de plasma, afin d'estimer si les valeurs plasmatiques de la protéine pouvaient être le reflet d'évènements cérébraux. Le second objectif était de tester la capacité de la TDP-43 mesurée par cette technologie à distinguer des sujets atteints de DLFT et de MPP. En effet, un recouvrement symptomatologique entre ces pathologies est fréquemment rencontré (254). Pourtant, à notre connaissance, aucune étude de la TDP-43 chez des patients atteints de MPP n'a été publiée.

La TDP-43 est une protéine pouvant circuler entre le cerveau et le LCS notamment dans un contexte de DLFT ou de SLA (357). Elle semble retrouvée dans ce fluide biologique, mais également dans le sang, sous forme libre ou incorporée dans des vésicules d'excrétion (220,223,355,356,371,372). Cependant, dans la littérature, la mesure de sa concentration par technique ELISA dans ces deux matrices biologiques a produit des résultats contradictoires, que les anticorps composants les kits de dosage détectent la TDP-43 dans sa forme totale ou la p-TDP-43 plus spécifiquement (tableaux IX et X). Ces divergences pourraient s'expliquer en partie par de grands niveaux de variabilités et un recouvrement important des concentrations de la TDP-43 et de la p-TDP-43.

De plus, lorsqu'elles étaient détectables, les concentrations mesurées étaient proches des limites de quantification des kits ELISA (72,358,359,361,363,364). Enfin, les kits de dosage ELISA utilisés manquaient parfois de standardisation (353). Il était donc pertinent d'utiliser une technologie pouvant potentiellement améliorer ces deux paramètres. La caractérisation quantitative de la TDP-43 a alors été réalisée par technologie SiMoA (pour *Single Molecule Array*; Quanterix, USA), décrite comme « ultrasensible ». De plus, le kit de dosage de la TDP-43 validé par le fabricant était constitué d'anticorps censés être capables de détecter des fragments pathologiques de la protéine. Son utilisation avait ainsi permis d'obtenir des résultats intéressants chez des patients atteints de SLA. En effet, une augmentation des concentrations mesurées dans le LCS et le plasma des patients a été décrite, en comparaison de contrôles atteints de maladies neuroinflammatoires hétérogènes (372).

Dans notre étude, il n'a pas été possible de distinguer les sujets atteints de DLFT des patients souffrant de MPP par le dosage de la TDP-43. Il serait alors envisageable que les concentrations de cette protéine soient augmentées dans les deux groupes de pathologies. En effet, une étude récente a mis en évidence des taux élevés de TDP-43 sérique mesurés par technique ELISA chez de sujets souffrant de dépression en comparaison de sujets contrôles (490). Concernant les patients atteints de DLFT, il était difficile de présumer des résultats, car les données de la littérature sont contradictoires (tableau IX et X). La TDP-43 mesurée dans leurs fluides biologiques pourrait ainsi être augmentée par rapport à des individus sains, en raison d'une lyse neuronale importante, mais également de l'abolition de son auto-rétrocontrôle négatif dû à un défaut de présence de la protéine dans le noyau des neurones pathologiques (150). Sur le modèle du peptide Ab-42 dans la MA, elle pourrait aussi être diminuée, notamment dans le LCS, en raison de son agrégation dans le tissu cérébral (75,76). Cette dernière situation, décrite dans une étude présentant l'avantage d'avoir inclus des patients caractérisés histologiquement (362), serait plutôt en accord avec nos résultats, puisque les concentrations en TDP-43 dans le LCS des patients étaient inférieures à la LDQ.

L'absence de différence significative du taux de TDP-43 entre les DLFT et les MPP était accompagnée d'une manque de corrélation des valeurs mesurée dans les échantillons de LCS/plasma couplés. Pourtant, le fait d'utiliser le même kit de dosage et le même automate devrait favoriser une telle corrélation. Un tel résultat a cependant aussi été décrit dans la littérature (363). De plus, de façon surprenante, les concentrations très basses de la protéine dans le LCS étaient associées à des valeurs au moins 100 fois supérieures dans le plasma.

Généralement, les protéines cérébrales présentent un déséquilibre de concentrations entre les deux fluides biologiques en faveur du LCS, explicable par la présence de la BHE et de la BHM, ainsi que par la différence de volume entre le sang et le LCS qui crée un phénomène de dilution, et la présence de protéases sanguines (368). Cependant, dans des travaux récents portant sur la mesure de la TDP-43 dans des échantillons de LCS/plasma couplés issus de patients atteints de SLA, les valeurs plasmatiques obtenues étaient supérieures à celles déterminées dans le LCS (491).

Deux hypothèses peuvent alors être émises pour expliquer ces discordances :

La première est d'ordre purement technique. Si l'automate utilisé présente généralement une très grande sensibilité, grâce à un mode de détection du signal innovant, celle-ci n'en reste pas moins dépendante de l'affinité entre les analytes et les anticorps qui composent chaque kit de dosage. Les performances analytiques des kits dépendent également de la spécificité de ces anticorps, notamment vis-à-vis de l'albumine et des IgG, qui sont les protéines majoritaires du plasma.

La deuxième hypothèse est plutôt d'ordre physiologique. La TDP-43 est une protéine présente chez tous les individus, malades ou sains. De plus elle est ubiquitaire, donc peu spécifique du SNC. Elle est en effet retrouvée à des taux élevés dans le pancréas, la rate, les ovaires ou encore les reins (74). Il est alors possible que sa concentration plasmatique ne reflète pas les variations de son expression au niveau cérébral, celles-ci étant masquées par la production périphérique importante de la protéine (492).

Les résultats obtenus dans notre travail, associés aux données de la littérature, permettent finalement de s'interroger sur le potentiel intérêt de la TDP-43 dans le diagnostic des DLFT (355). Pourtant, des agrégats de cette protéine ont été mis en évidence dans le cerveau de la majorité des patients atteints de ces maladies, et des formes pathologiques caractéristiques de la protéine ont été définies (75,76). De plus, de bons résultats ont été obtenus dans un contexte de SLA, qui partage des caractéristiques génétiques, physiopathologiques et parfois cliniques avec les DLFT. La taille réduite de la cohorte dans notre étude est sans doute une limite importante dans l'interprétation des résultats. Elle s'explique néanmoins par la nécessité d'inclure des patients pour lesquels étaient disponibles à la fois du plasma et du LCS.

Au vu de l'ensemble de nos résultats obtenus pour la caractérisation qualitative, semi-quantitative et quantitative de la TDP-43, l'exploration de matrices moins conventionnelles que le sang ou le LCS comme les plaquettes pourrait être une piste intéressante (353). De plus, les DLFT étant des maladies hétérogènes sur le plan physiopathologique, il est probable qu'un seul biomarqueur soit insuffisant pour renforcer le diagnostic et le suivi des patients. Une combinaison de marqueurs apparaît alors comme une piste à privilégier (354,414,493). Dans la dernière partie des travaux de thèse, il a ainsi été étudié divers marqueurs protéiques non spécifiques des DFLT, mais néanmoins potentiellement intéressants.

**PARTIE C :**

**EXPLORATION DE MARQUEURS PROTEIQUES NON  
SPECIFIQUES DES DLFT**

Cette dernière partie de la thèse concerne l'exploration de marqueurs non spécifiques des DLFT, et correspond au deuxième axe de recherche de biomarqueurs pour ces maladies. Elle peut être décomposée en 2 étapes :

Tout d'abord, cinq marqueurs protéiques ont été quantifiés dans des échantillons couplés de LCS et de plasma, dans des cohortes de patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP. Comme pour la TDP-43, le but était d'évaluer pour chaque marqueur la corrélation des concentrations entre les deux fluides biologiques, afin d'estimer si les valeurs plasmatiques mesurées pouvaient être le reflet d'évènements cérébraux. La capacité de ces protéines à distinguer les DLFT des MPP a également été testée, puisqu'un recouvrement symptomatologique entre ces deux groupes de pathologies a été décrit (254).

Ensuite, l'enrichissement de la cohorte en échantillons plasmatiques par des prélèvements de patients porteurs de mutations au stade présymptomatique et de leurs apparentés non porteurs a permis de préciser les contextes d'utilisation des NfL et des pNfH au sein des maladies du spectre DLFT-SLA. Cette sous-partie a fait l'objet d'une publication internationale (annexe 2).

Le panel de marqueurs indirects des DLFT était composé des NfL, des pNfH et de la t-Tau, qui sont des témoins de la dégénérescence axonale, déjà présentés dans les rappels bibliographiques. Il incluait également l'hydrolase *Ubiquitin carboxyl-terminal L1* (UCH L1). Cette protéine cytoplasmique, très exprimée dans les neurones et qui représente jusqu'à 5 % des protéines solubles du SNC, est liée au bon fonctionnement du SUP (494). Elle présente en effet la capacité d'ajouter ou de retirer des molécules d'ubiquitine aux protéines intraneurales (495,496). L'ajout de chaînes d'ubiquitine aux protéines est nécessaire pour leur identification par le protéasome. Une fois cette identification opérée, les chaînes d'ubiquitine vont alors être hydrolysées et permettre la dégradation des protéines par ce système. L'ajout d'une unique molécule d'ubiquitine à une protéine permet de réguler ses interactions avec les autres protéines, mais également d'influencer sa localisation et son expression (497). Il a été décrit dans la littérature, qu'un défaut dans le système d'ubiquitination des protéines pouvait engendrer une mort neuronale précoce (498). Or, des protéines anormalement ubiquitinylées et non dégradées sont classiquement retrouvées dans les maladies neurodégénératives, dont les DLFT (75,76). De plus, certaines mutations génétiques rencontrées dans les DLFT ont été associées à un défaut du SUP (tableaux VI et VII).



Ces éléments, alliés à son abondance au sein du SNC, font d'UCH L1 une protéine de choix à étudier dans un contexte de recherche de biomarqueur indirect des DLFT.

La protéine acide fibrillaire gliale (GFAP pour *Glial Fibrillary Acidic Protein*) constituait le dernier marqueur du panel. Il s'agit d'un filament intermédiaire, constitutif du cytosquelette des astrocytes. Ces cellules, jusqu'à dix fois plus nombreuses que les neurones, assurent un environnement favorable pour le développement et le fonctionnement de ces derniers (499). Les astrocytes sont également impliqués dans la neuroinflammation, durant laquelle leur activation entraîne, entre autres, une augmentation de la production de GFAP. À ce titre, cette protéine est un marqueur de développement astrocytaire très utilisé dans les études immunohistochimiques (500). La mesure de sa concentration dans le LCS s'est également révélée intéressante comme marqueur pronostic des traumatismes crâniens et des hémorragies cérébrales (501,502). Il semblerait également que dans certaines maladies neurodégénératives, des variations de sa concentration soient détectables dans ce fluide (503). Les phénomènes neuroinflammatoires, décrits comme plus importants dans les DLFT que dans les MPP, justifient son étude dans cette partie de la thèse (504,505).

## **1. Matériels et méthodes :**

### **1.1 Patients**

Ce travail peut être décomposé en deux sous-parties, dans lesquelles les cohortes de patients étaient différentes :

Dans un premier temps, il a été inclus uniquement des patients pour lesquels nous disposions d'échantillons couplés de LCS et de plasma.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes limités à l'étude d'échantillons plasmatiques sur une cohorte élargie.

Dans tous les cas, les conditions de réalisation des diagnostics et des prélèvements étaient identiques à celles décrites dans l'analyse qualitative et semi-quantitative de la TDP-43 et ne sont donc pas détaillées ici.

Dans la première sous-partie, parmi les vingt-neuf cas de DLFT finalement inclus, neuf patients présentaient une mutation dans le gène *C9ORF72*, deux patients présentaient une mutation dans le gène *GRN* et un patient était porteur d'une mutation du gène *MAPT*. Parmi les cas de DLFT sporadique, deux présentaient des troubles moteurs associés (DLFT+SLA). La cohorte comportait également un patient présentant une SLA sporadique et dix patients atteints de MPP, composés de cinq cas de dépression majeure et cinq cas de troubles bipolaires. La cohorte a été constituée de façon à ce qu'il n'y ait pas de différence significative entre les différents groupes concernant l'âge au prélèvement et le sexe des sujets. Leurs données épidémiologiques sont résumées dans le tableau XXVII.

	Spectre DLFT-SLA (n = 29)	MPP (n = 10)	p-value
Sexe (homme/femme)	11/18	5/5	0,7311
Age médian au prélèvement (années)	66	66,5	0,5208
Interquartiles	59-72	64-71	

**Tableau XXVII :** Données épidémiologiques des patients inclus dans la cohorte des échantillons de LCS/plasma couplés pour la mesure de la t-Tau, des NfL, des pNfH, d'UCH L1 et de la GFAP. **Abréviation :** MPP : maladies psychiatriques primaires.

Dans la deuxième sous partie, quarante-cinq patients atteints de DLFT ont été retenus. Parmi eux, trois présentaient des troubles moteurs associés (DLFT+SLA). Grâce aux outils de diagnostic génétique disponibles au laboratoire de Neurochimie des HCL, il a été mis en évidence une mutation dans les gènes *C9ORF72* chez dix-huit patients et une mutation sur le gène *GRN* chez six d'entre eux. Par ailleurs, un patient présentait une mutation du gène *MAPT*, tandis qu'un autre était porteur d'un variant pathogène sur le gène *TARDBP*. Le groupe des sujets symptomatiques était complété par sept patients atteints de SLA sporadique et douze patients souffrant de MPP, dont six cas de dépression majeure, cinq cas de troubles bipolaires et un cas de schizophrénie. Il a également été inclus huit sujets porteurs présymptomatiques (pré-S) de variants pathogènes dans les gènes *C9ORF72* (n = 6) et *GRN* (n = 2). Enfin, neuf personnes apparentés non porteur de mutation pathogène et considérés comme contrôles sains (CTS) ont été intégrés à l'étude.

Cette cohorte enrichie en échantillons plasmatiques a été constituée de façon à ce qu'il n'y ait pas de différence significative entre les groupes concernant leur sexe. Les données épidémiologiques des patients et des contrôles sont résumées dans le tableau XXVIII.

	Spectre DLFT-SLA (n = 52)			Pré-S (n = 8)	CTS (n = 9)	MPP (n = 12)	p-value
	SLA (n = 7)	DLFT+SLA (n = 3)	DLFT (n = 42)				
<b>Sexe (homme/femme)</b>	<b>1/6</b>	<b>1/2</b>	<b>19/23</b>	<b>3/5</b>	<b>4/5</b>	<b>6/6</b>	<b>0,7178</b>
<b>Age médian au prélèvement (années)</b>	<b>59</b>	<b>72</b>	<b>62</b>	<b>40,5</b>	<b>52</b>	<b>66</b>	<b>0,0042</b>
Interquartiles	48-71,5	61,5-73,5	59-72	36-60	41,25-60,5	60,5-70	
<b>Durée médiane des symptômes au prélèvement (années)</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>4</b>	<b>0,0052</b>
Interquartiles	0,5 - 2,6	n/a	2 - 3,8			2 - 8,5	

**Tableau XXVIII :** Données épidémiologiques des patients inclus dans la cohorte enrichies en échantillons plasmatiques. **Abréviations :** CTS : contrôles sains non mutés ; MPP : maladies psychiatriques primaires ; Pré-S : sujets présymptomatiques porteurs de mutations impliquées dans les DLFT.

## 1.2. Réalisation des mesures

Les dosages ont été réalisés sur l'analyseur SiMoA HD-1 (Quanterix, USA), en suivant les instructions du fabricant. Deux kits de dosage différents ont été utilisés, achetés grâce à l'obtention d'un financement d'un appel à projet organisé par le Comité Scientifique pour la Recherche du centre hospitalier spécialisé Le Vinatier (AO 2019 - CSR 09 « NFL COG »).

Le kit commercial « Neurology 4-plex A » (# 102153 ; Quanterix, USA) est un kit multiplexe, offrant la possibilité de mesurer simultanément les protéines t-Tau, NfL, UCH L1 et GFAP. Les dilutions nécessaires à ces mesures ont été effectuées manuellement (tableau XXIX).

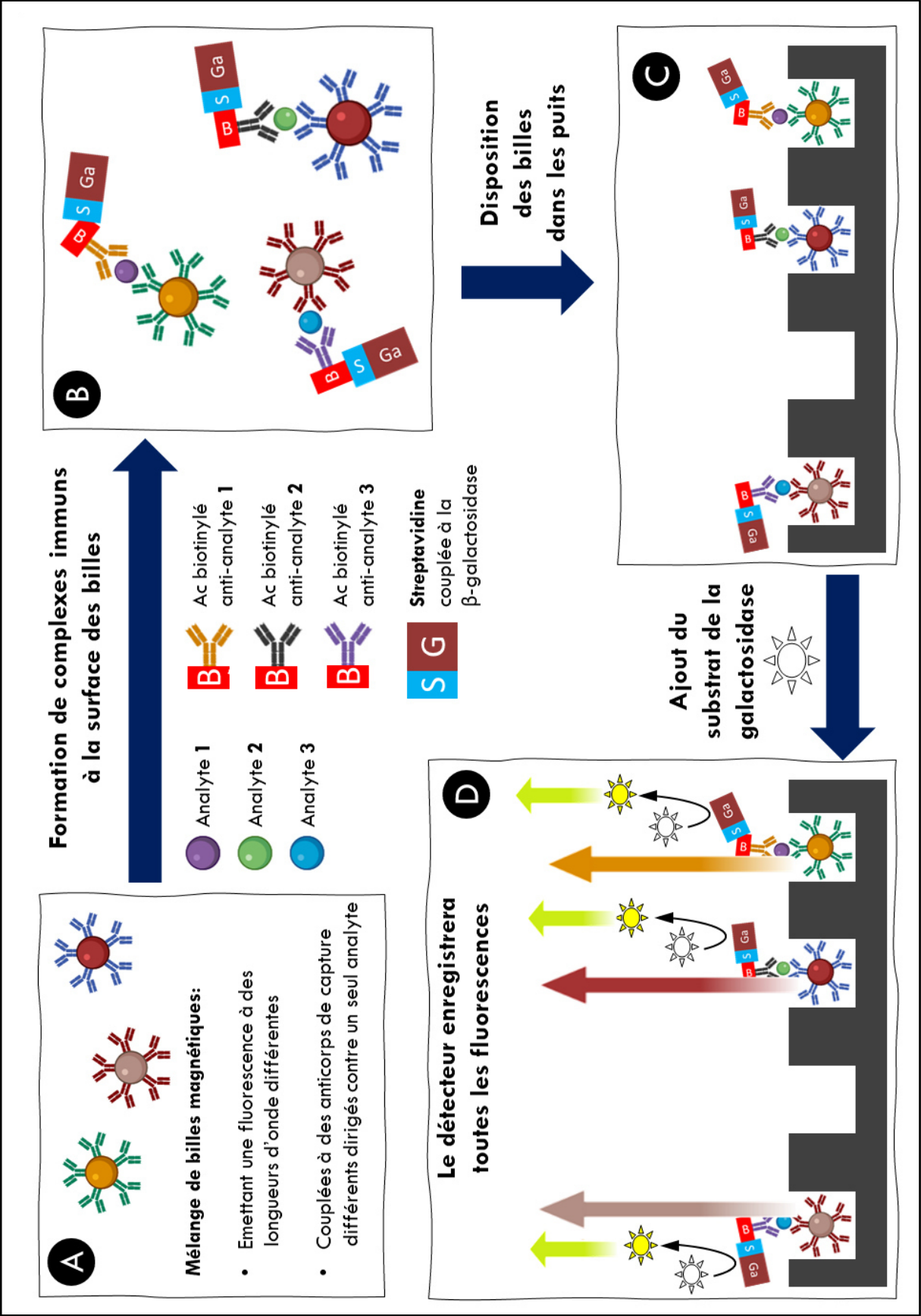
Le kit « PNF-HEAVY » (# 102669 ; Quanterix, USA) a été utilisé pour quantifier les pNfH dans les prélèvements biologiques. Les dilutions recommandées ont été réalisées automatiquement par la machine (tableau XXIX).

	<b>Kit « Neurology 4-Plex A »</b>	<b>Kit pNfH</b>
<b>Dilution du LCS</b>	<b>1/40 manuellement</b> Volume nécessaire en cas de monoplicat : 182 µL prélevé + 30 µL VM ⇒ 6 µL LCS + 234 µL diluant	<b>1/20 dans l'automate</b> Volume nécessaire en cas de monoplicat : 4 µL prélevé + 30 µL VM ⇒ 34 µL LCS
<b>Dilution du plasma</b>	<b>1/4 manuellement</b> Volume nécessaire en cas de monoplicat : 182 µL prélevé + 30 µL VM ⇒ 55 µL plasma + 165 µL diluant	<b>1/4 dans l'automate</b> Volume nécessaire en cas de monoplicat : 25 µL prélevé + 30 µL VM ⇒ 55 µL plasma
<b>LDQ fabricant (pg/mL)</b>	<b>t-Tau : 0,053</b> <b>NfL : 0,241</b> <b>UCH L1 : 5,45</b> <b>GFAP : 0,467</b>	<b>pNfH : 2,88</b>
<b>LDD fabricant (pg/mL)</b>	<b>t-Tau : 0,024</b> <b>NfL : 0,104</b> <b>UCH L1 : 1,74</b> <b>GFAP : 0,221</b>	<b>pNfH : 0,663</b>

**Tableau XXIX :** Dilutions réalisées pour la mesure par le SiMoA HD-1 des protéines t-Tau, NfL, pNfH, UCHL1 et GFAP. **Abréviations :** LDD : Limite de détection ; LDQ : Limite de quantification ; VM : volume mort.

Différents paramètres ont été vérifiés pour valider les expériences. Le coefficient de détermination de la droite d'étalonnage obtenue par la mesure des standards en duplicat était satisfaisant ( $R^2 > 0,99$  systématiquement). Les concentrations des contrôles haut et bas fournis dans le kit étaient dans l'intervalle des valeurs autorisées par le fabricant. Le principe de fonctionnement général du SiMoA est détaillé dans la partie de la thèse portant sur l'analyse quantitative de la TDP-43. Certains kits de mesure permettent le dosage de plusieurs analytes simultanément à partir d'un même prélèvement. Pour cela, ces kits multiplexes sont composés de différents types de billes magnétiques. Chaque type de billes étant couplé à un anticorps de capture différent, chaque analyte sera alors fixé sur un seul type de billes. D'autre part, ces types de billes émettent une fluorescence à des longueurs d'onde différentes les unes des autres, permettant à l'automate de les distinguer. L'analyse en parallèle de la fluorescence générique

émise par la fixation d'un analyte sur une bille permettra au SiMoA de déterminer la concentration de chaque composé d'intérêt (figure 70).



**Figure 70 :** Fonctionnement du multiplexage dans l'analyseur SiMoA HD-1. Il est rendu possible par la présence de billes portant des anticorps dirigés contre différents analytes. Ces billes seront distinguées par le SiMoA grâce à leur propre fluorescence. **Abréviations :** Ac : anticorps ; B : biotine ; G :  $\beta$ -galactosidase ; S : streptavidine.

### 1.3. Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel MedCalc (v 15.11.4). En raison du caractère non-gaussien des populations étudiées, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn ont été appliqués pour les comparaisons entre plusieurs groupes. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été employé pour la comparaison de deux groupes. La différence de répartition entre les hommes et les femmes au sein des cohortes a été évaluée par un test du Khi-deux. Les corrélations entre les concentrations obtenues dans le LCS et le plasma pour les cinq analytes, ainsi que la corrélation entre les valeurs des NfL et des pNfH, ont été déterminées par le test de rang de Spearman. Enfin, les seuils de concentration protéique, permettant de distinguer les cohortes avec le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité, ont été déterminés par des courbes *Receiver Operating Characteristics* (ROC) et le calcul de l'indice de Youden. Dans l'ensemble des analyses, la valeur de probabilité p (p-value) a été fixée à 0,05.

## 2. Résultats :

### 2.1 Cohorte d'échantillons de LCS/plasma couplés

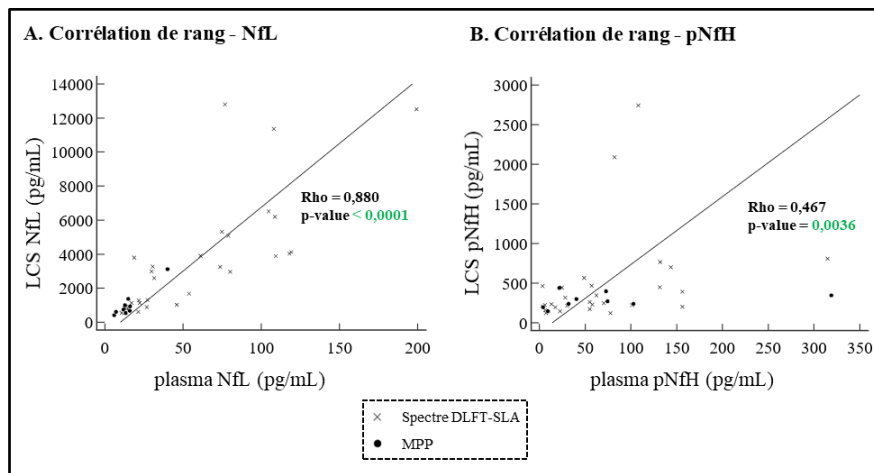
#### 2.1.1 Etude de la corrélation entre le LCS et le plasma

Pour les cinq analytes, les concentrations étaient plus élevées dans le LCS que dans le plasma des sujets, indépendamment du diagnostic. Une corrélation positive entre ces concentrations a été observée chez quatre d'entre elles (tableau XXX).

Analyte	Coefficient de Spearman	p-value
<b>NfL</b>	0,88	< 0,0001
<b>pNfH</b>	0,47	0,0036
<b>UCH L1</b>	0,42	0,0080
<b>GFAP</b>	0,31	0,0516
<b>t-Tau</b>	0,25	0,1301

**Tableau XXX :** Résultats du test de corrélation de rang de Spearman appliqué aux concentrations des cinq protéines d'intérêt mesurées dans le LCS et le plasma.

La corrélation entre les valeurs mesurées dans le LCS et le plasma était la plus forte pour les NfL, suivi des pNfH. Pour ces deux protéines, cette corrélation était d'autant plus importante que les patients présentaient de hautes concentrations en analytes. Le plus souvent, ces patients étaient atteints de maladies du spectre DLFT-SLA plutôt que de MPP (figure 71).



**Figure 71 :** Corrélation de rang des concentrations mesurées dans le LCS et le plasma pour (A) les NfL et (B) les pNfH. **Abréviation :** MPP : maladies psychiatriques primaires ; Rho : coefficient de corrélation de rang de Spearman.

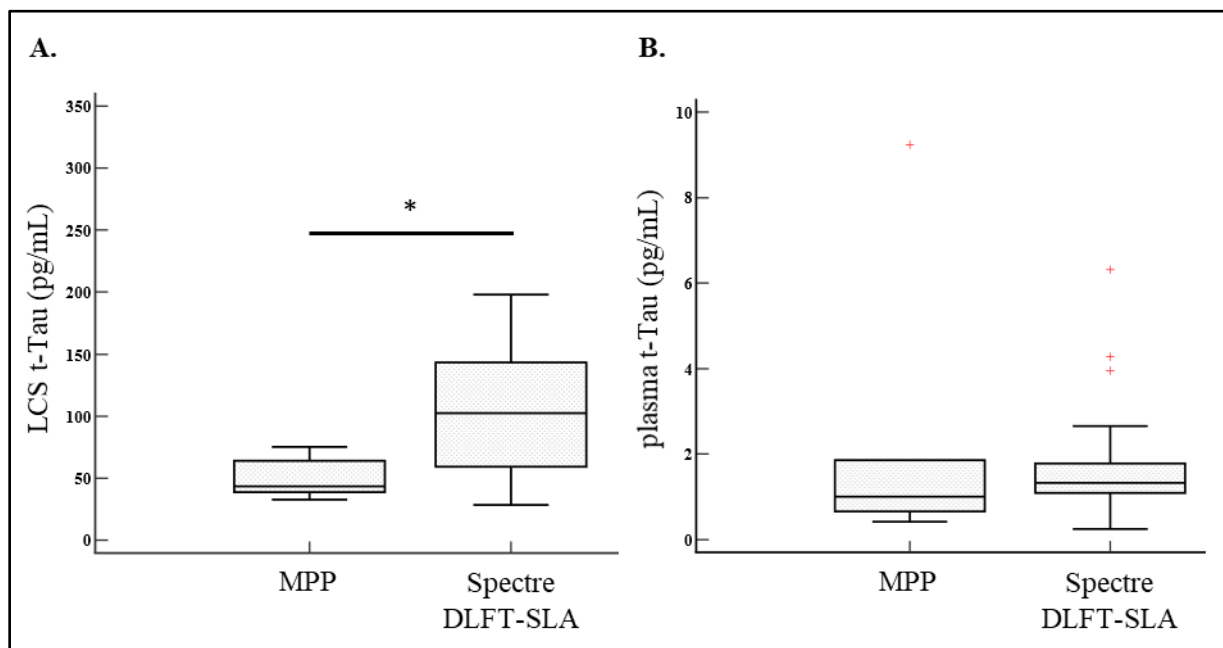
## 2.1.2 Intérêt diagnostique des six marqueurs

- **Protéine Tau totale**

Le tableau XXXI résume les mesures de la concentration de la t-Tau dans la cohorte des échantillons de LCS/plasma couplés. Dans le LCS, ces concentrations étaient statistiquement différentes entre les patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA et ceux souffrant de MPP. Cette différence n'a pas été retrouvée dans le plasma (tableau XXXI ; figure 72).

t-Tau	Spectre DLFT-SLA (n = 29)	MPP (n = 10)	p-value
<b>Valeur médiane dans le LCS (pg/mL)</b>	<b>102,4</b>	<b>43,4</b>	<b>0,0092</b>
Interquartiles (pg/mL)	59,2-143,3	38,72-64	
<b>Valeur médiane dans le plasma (pg/mL)</b>	<b>1,328</b>	<b>1,005</b>	<b>0,3346</b>
Interquartiles (pg/mL)	1,092-1,782	0,660-1,860	

**Tableau XXXI :** Concentrations de la t-Tau dans le LCS et le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP. **Abréviation :** MPP : maladies psychiatriques primaires.



**Figure 72 :** Concentrations de la t-Tau (A) dans le LCS et (B) le plasma des patients. Les croix rouges symbolisent les valeurs aberrantes. \* p values < 0,05. **Abréviation :** MPP : maladies psychiatriques primaires.



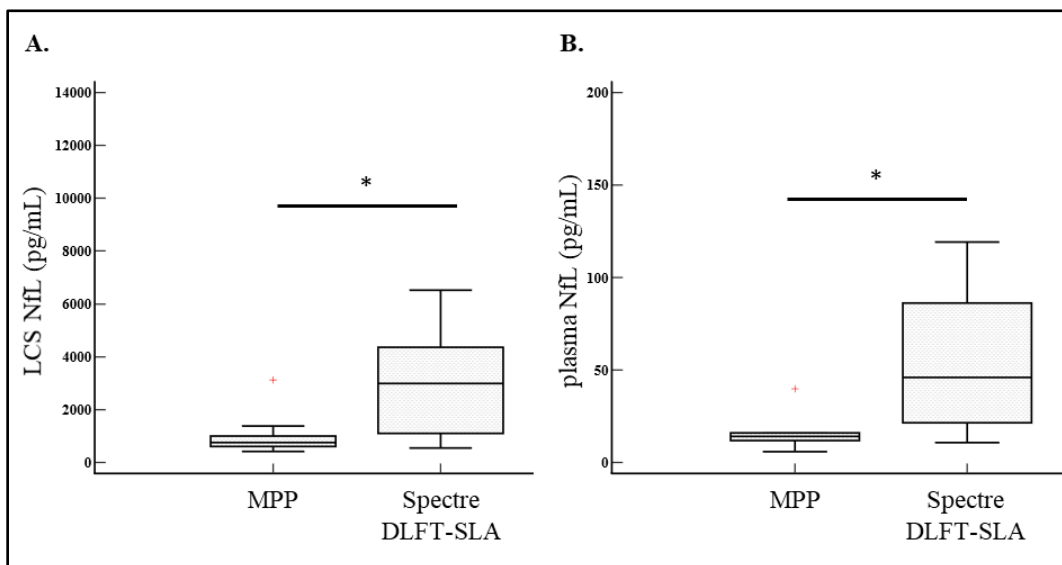
- **Neurofilaments à chaîne légère**

Le tableau XXXII résume les mesures de la concentration des NfL dans la cohorte des échantillons de LCS/plasma couplés. Dans les deux matrices biologiques, ces concentrations étaient statistiquement plus élevées chez les patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA que chez ceux souffrant de MPP (tableau XXXII ; figure 73).

Au sein de la cohorte des maladies du spectre DLFT-SLA, cette augmentation était indépendante de la présence de manifestations motrices ( $p_{LCS} = 0,062$  ;  $p_{plasma} = 0,066$ ) et du statut génétique ( $p_{LCS} = 0,41$  ;  $p_{plasma} = 0,78$ ) des patients.

NfL	Spectre DLFT-SLA (n = 29)	MPP (n = 10)	p-value
<b>Valeur médiane dans le LCS (pg/mL)</b>	<b>2990</b>	<b>756</b>	<b>0,0016</b>
Interquartiles (pg/mL)	1101 - 4360	606 - 1000	
<b>Valeur médiane dans le plasma (pg/mL)</b>	<b>46</b>	<b>14,1</b>	<b>0,0003</b>
Interquartiles (pg/mL)	21,5 – 86,2	11,8 - 16	

**Tableau XXXII :** Concentrations des NfL dans le LCS et le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP. **Abréviation :** MPP : maladies psychiatriques primaires.



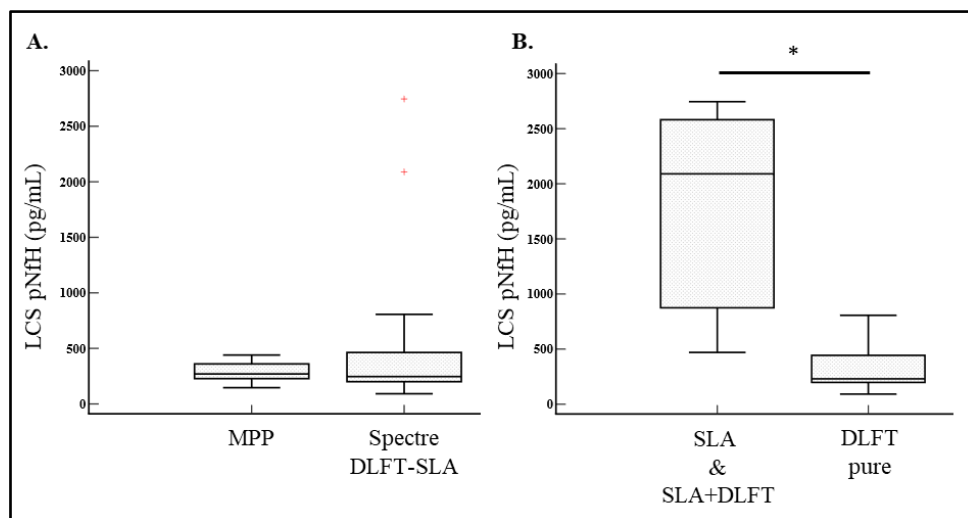
**Figure 73 :** Concentrations des NfL (A) dans le LCS et (B) le plasma des patients. Les croix rouges symbolisent les valeurs aberrantes. \* p values < 0,05. **Abréviation :** MPP : maladies psychiatriques primaires.

- **Neurofilaments à chaîne lourde phosphorylés**

Le tableau XXXIII : résume les mesures de la concentration des pNfH dans la cohorte des échantillons de LCS/plasma couplés. Ces concentrations ne présentaient pas de différence statistique entre les patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA et ceux souffrant de MPP, que ce soit dans le LCS ou dans le plasma (tableau XXXIII ; figure 74 A). En revanche, au sein du spectre DLFT-SLA, elles étaient significativement plus élevées dans le LCS des patients présentant des manifestations motrices (SLA et DLFT+SLA regroupées), que chez les sujets présentant une DLFT pure (figure 74 B). Cette différence n'a pas été observée dans le plasma ( $p = 0,32$ ). Enfin, la concentration en PNfH n'étaient pas dépendantes du statut génétique des patients, que ce soit dans le LCS ( $p = 0,57$ ) ou dans le plasma ( $p = 0,41$ ).

pNfH	Spectre DLFT-SLA (n = 29)	MPP (n = 10)	p-value
<b>Valeur médiane dans le LCS (pg/mL)</b>	<b>246,5</b>	<b>270</b>	<b>0,8908</b>
Interquartiles (pg/mL)	200,5 – 463,3	227,8 - 360	
<b>Valeur médiane dans le plasma (pg/mL)</b>	<b>56</b>	<b>40,4</b>	<b>0,8595</b>
Interquartiles (pg/mL)	20,1 – 104,5	18,8 – 81,6	

**Tableau XXXIII :** Concentrations des pNfH dans le LCS et le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP. **Abréviation :** MPP : maladies psychiatriques primaires.



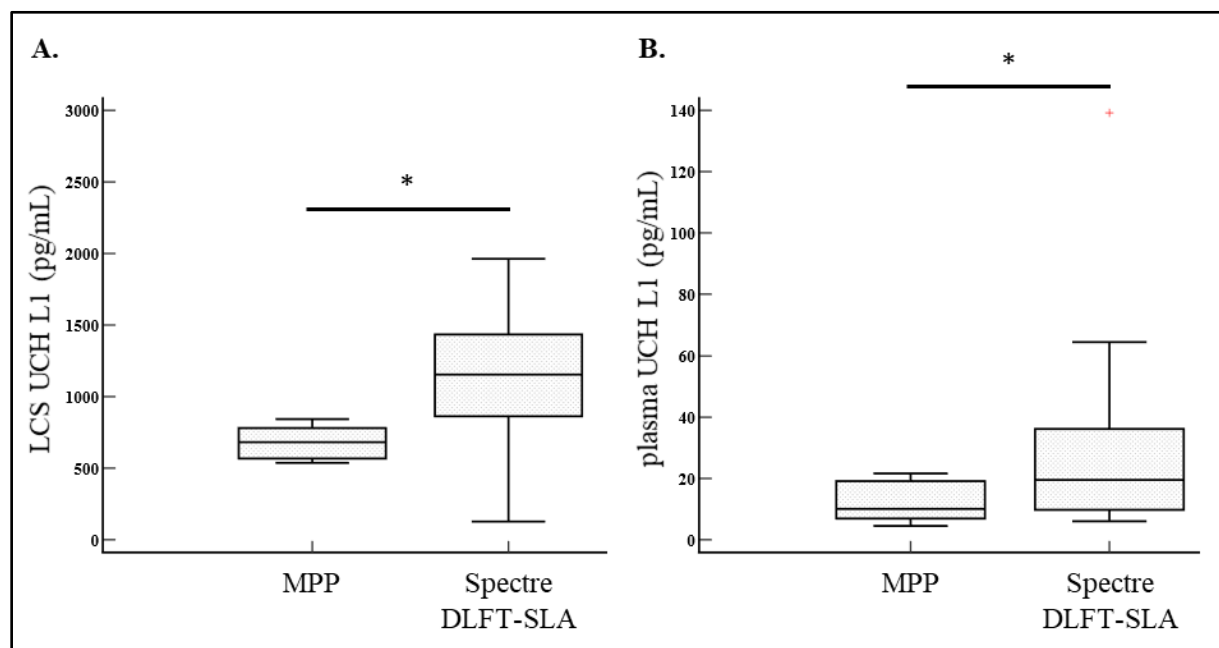
**Figure 74 :** Concentrations des pNfH dans le LCS (A) de tous les patients et (B) au sein du spectre DLFT-SLA. Les croix rouges symbolisent les valeurs aberrantes. **Abréviation :** MPP : maladies psychiatriques primaires.

- **Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1**

Le tableau XXXIV résume les mesures de la concentration d'UCH L1 dans la cohorte des échantillons de LCS/plasma couplés. Dans les deux matrices biologiques, ces concentrations étaient statistiquement plus élevées chez les patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA que chez ceux souffrant de MPP (tableau XXXIV ; figure 75).

UCH L1	Spectre DLFT-SLA (n = 29)	MPP (n = 10)	p-value
<b>Valeur médiane dans le LCS (pg/mL)</b>	<b>1154</b>	<b>681,4</b>	<b>0,000513</b>
Interquartiles (pg/mL)	862,4-1434	567,2-780	
<b>Valeur médiane dans le plasma (pg/mL)</b>	<b>19,5</b>	<b>10,05</b>	<b>0,035281</b>
Interquartiles (pg/mL)	9,74-36,11	6,9-19,1	

**Tableau XXXIV :** Concentrations d'UCH L1 dans le LCS et le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP. **Abréviation :** MPP : maladies psychiatriques primaires.



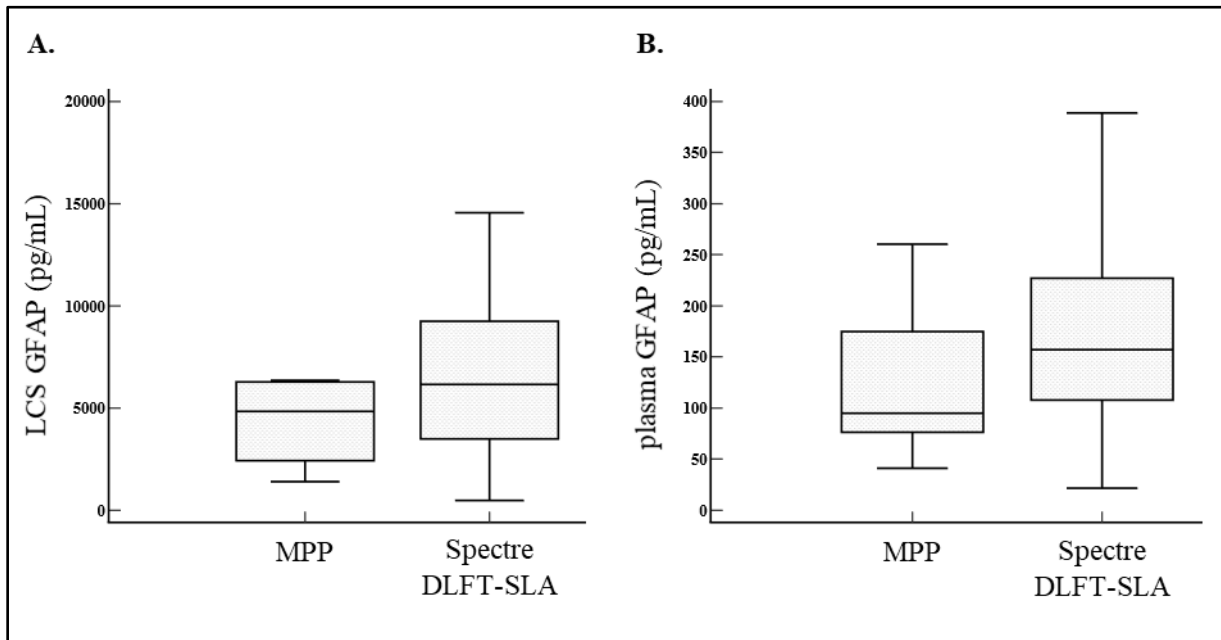
**Figure 75 :** Concentrations d'UCH L1 dans le LCS et le plasma des patients. Les croix rouges symbolisent les valeurs aberrantes.\* p values < 0,05. **Abréviation :** MPP : maladies psychiatriques primaires.

- **Protéine acide fibrillaire gliale**

Le tableau XXXV résume la mesure des concentrations de la GFAP dans la cohorte des échantillons de LCS/plasma couplés. Ces concentrations ne présentaient pas de différence statistique entre les patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA et ceux souffrant de MPP, que ce soit dans le LCS ou dans le plasma (tableau XXXV ; figure 76).

GFAP	Spectre DLFT-SLA (n = 29)	MPP (n = 10)	p-value
<b>Valeur médiane dans le LCS (pg/mL)</b>	<b>6160</b>	<b>4840</b>	<b>0,31868</b>
Interquartiles (pg/mL)	3494-9250	2432-6280	
<b>Valeur médiane dans le plasma (pg/mL)</b>	<b>157,2</b>	<b>95</b>	<b>0,367815</b>
Interquartiles (pg/mL)	107,9-227,1	76,4-174,9	

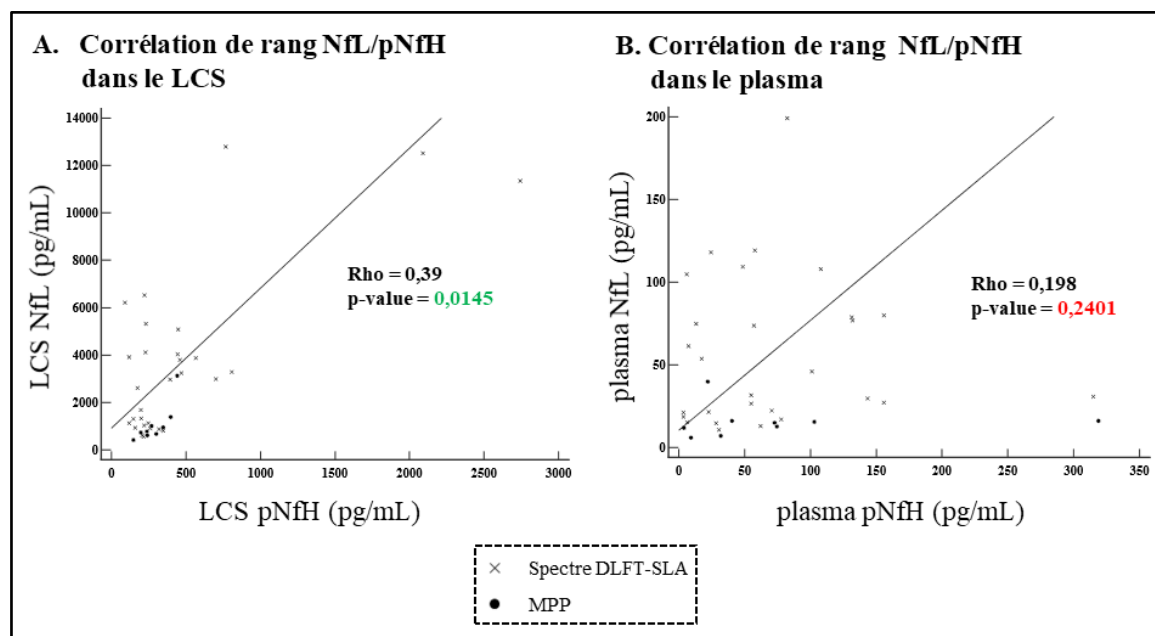
**Tableau XXXV :** Concentrations de la GFAP dans le LCS et le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP. **Abréviation :** MPP : maladies psychiatriques primaires.



**Figure 76 :** Concentrations de la GFAP dans le LCS et le plasma des patients. **Abréviation :** MPP : maladies psychiatriques primaires.

### 2.1.3 Étude de corrélation entre les concentrations des NfL et des pNfH

Indépendamment du diagnostic clinique, une corrélation a été mise en évidence entre les valeurs des NfL et des pNfH dans le LCS. Cette corrélation n'a pas été retrouvée dans le plasma (figure 77).



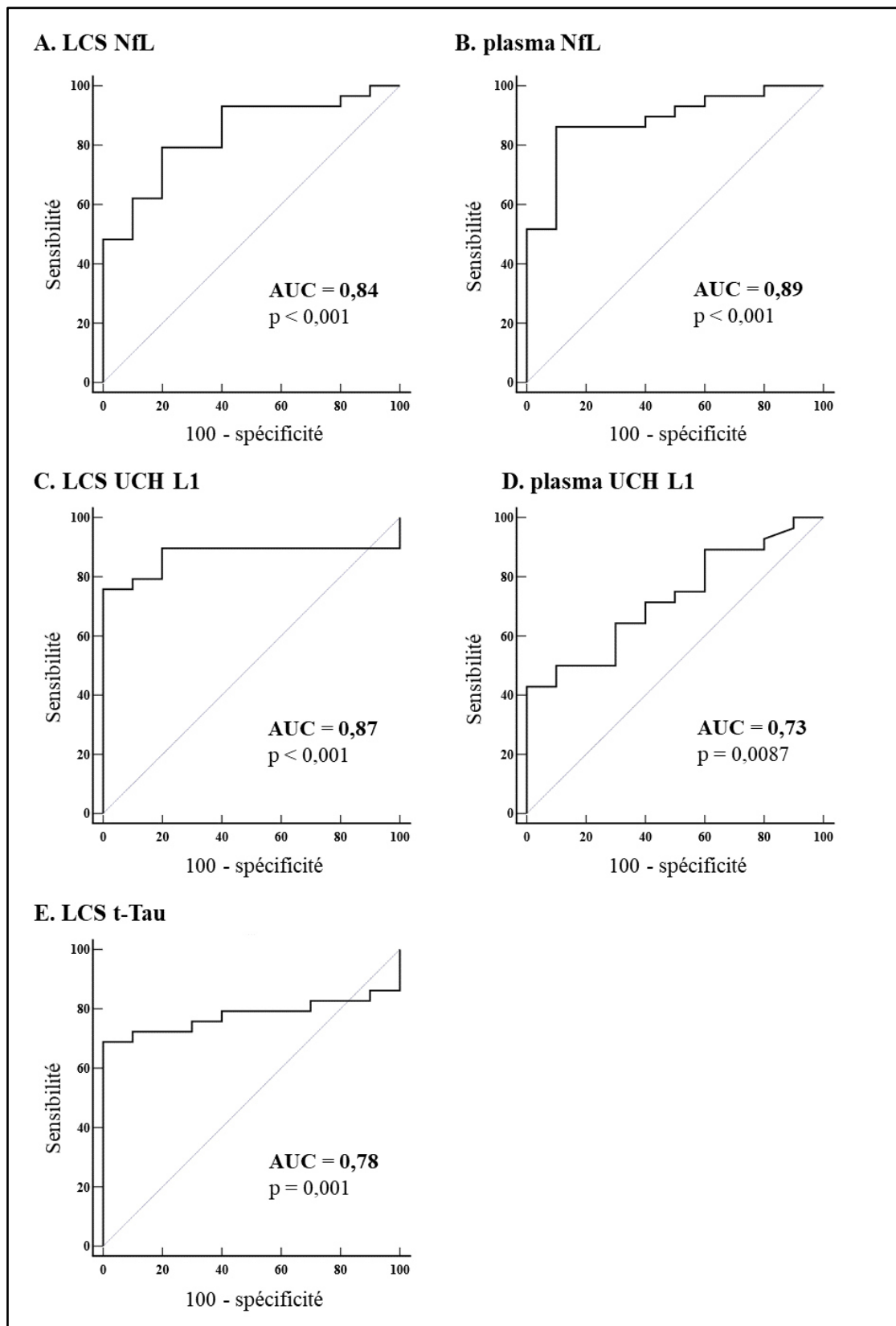
**Figure 77 :** Corrélation de rang entre les NfL et les pNfH (A) dans le LCS et (B) dans le plasma. **Abbréviation :** Rho : coefficient de corrélation de rang de Spearman.

### 2.1.4 Évaluation des seuils de concentration optimaux pour distinguer les maladies du spectre DLFT-SLA des MPP

Considérant le faible nombre de patients dans chacun des groupes de la cohorte de LCS/plasma couplés, les évaluations réalisées ici avaient pour but d'estimer un ordre de grandeur pour les concentrations permettant de distinguer les pathologies du spectre DLFT-SLA des MPP (tableau XXXVI, figure 78).

	NfL		UCH L1		t-tau
	LCS	plasma	LCS	plasma	LCS
<b>Concentration (pg/ml)</b>	<b>1000</b>	<b>16</b>	<b>842,6</b>	<b>21,6</b>	<b>75,2</b>
Sensibilité	79 %	86 %	76 %	43 %	69 %
Spécificité	80 %	90 %	100 %	100 %	100 %

**Tableau XXXVI :** Valeurs de concentration de chaque analyte offrant le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité pour la différenciation des maladies du spectre DLFT-SLA et des maladies psychiatriques primaires.



**Figure 78** : Courbes ROC pour les concentrations des NfL (A) dans le LCS et (B) dans le plasma, UCH L1 (C) dans le LCS et (D) dans le plasma et (E) t-Tau dans le LCS. pour la différenciation des maladies du spectre DLFT-SLA et des maladies psychiatriques primaires. **Abréviation** : AUC : aire sous la courbe.

## 2.2. Cohorte enrichie en échantillons plasmatiques

### 2.2.1 Différence d'âge au prélèvement sanguin entre les sujets

Dans cette cohorte, les patients présentaient des âges significativement différents lors de la réalisation du prélèvement sanguin ( $p = 0,0042$ ) (tableau XXVII). Plus en détail, les patients pré-S et CTS étaient statistiquement du même âge ( $p = 0,70$ ), mais ces sujets asymptomatiques étaient significativement plus jeunes que les sujets symptomatiques ( $p = 0,000071$ ). Ces derniers n'ont pas montré de différence entre eux concernant l'âge au prélèvement ( $p = 0,76$ ).

### 2.2.2 Comparaison de l'utilité des NfL et des pNfH suivant les contextes cliniques

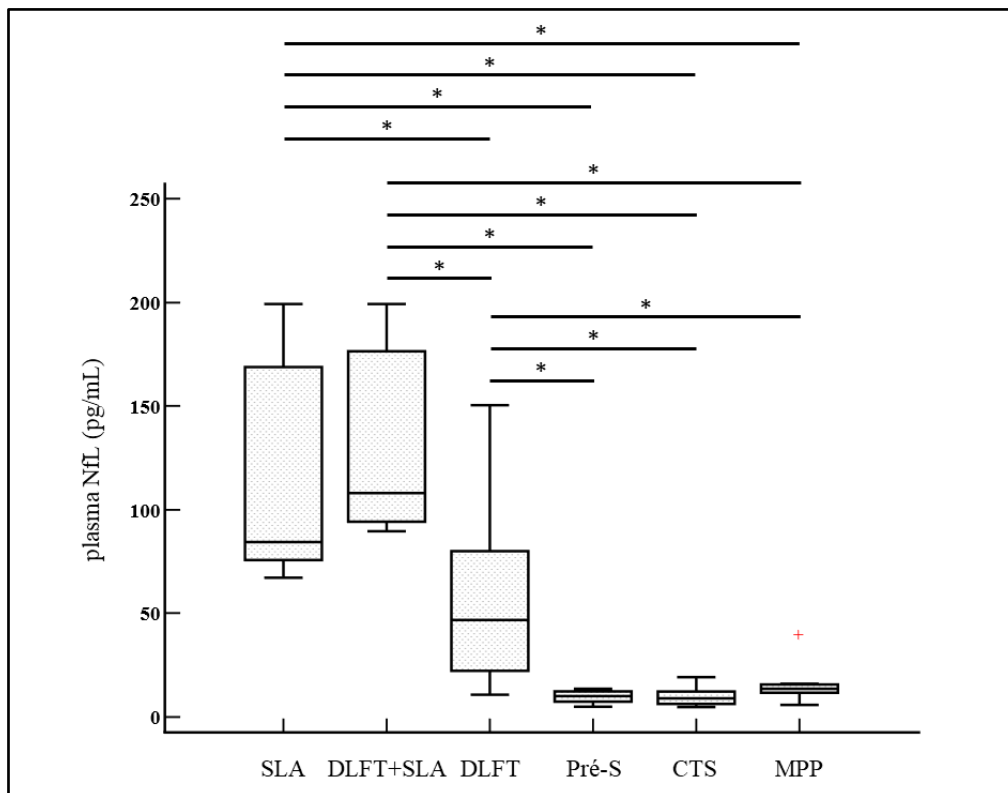
L'intérêt diagnostique des NfL et des pNfH, dans les différentes situations cliniques rencontrées au sein du spectre DLFT-SLA, a pu être précisé et comparé à des contrôles sains grâce à un enrichissement de la cohorte en échantillons plasmatiques (tableau XXXVII).

	Spectre DLFT-SLA (n = 52)			Pré-S (n = 8)	CTS (n = 9)	MPP (n = 12)	p-value
	SLA (n = 7)	DLFT+SLA (n = 3)	DLFT (n = 42)				
<b>NfL</b> Valeur médiane (pg/mL)	<b>84,4</b>	<b>108</b>	<b>46,8</b>	<b>10,1</b>	<b>9</b>	<b>13,6</b>	<b>&lt; 0,00001</b>
IQ (pg/mL)	75,7-168,8	94,2-176,4	22,3-80	7,4-12,4	6,3-12,3	11,7-15,7	
<b>pNfH</b> Valeur médiane (pg/mL)	<b>579</b>	<b>82,2</b>	<b>30,5</b>	<b>9,8</b>	<b>5,5</b>	<b>31,9</b>	<b>0,0011</b>
IQ (pg/mL)	188-790,8	29,6-101,6	11,6-87,4	1,9-58,9	2,4-39,6	7,2-74,1	

**Tableau XXXVII :** Concentrations des NfL et des pNfH dans le plasma des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP et des sujets Pré-S et CTS. **Abréviations :** CTS : contrôles sains non mutés ; IQ : interquartiles ; MPP : maladies psychiatriques primaires ; Pré-S : sujets présymptomatiques porteurs de mutations impliquées dans les DLFT.

- **Neurofilaments à chaîne légère**

Comme dans la première étape de cette étude, les patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ont présenté des concentrations plasmatiques en NfL statistiquement supérieures aux sujets atteints de MPP. Le seuil de 16 pg/mL, permettant de distinguer au mieux ces groupes de maladies, a également été retrouvé (AUC = 0,88 ; p-value < 0,0001), associé à des valeurs de sensibilité (92 %) et de spécificité (92 %) comparables. Au sein des maladies du spectre DLFT-SLA, les cas de SLA et de DLFT+SLA présentaient des concentrations plasmatiques en NfL plus élevées que les patients atteints de DLFT pure. Chez ces derniers, les valeurs de NfL plasmatiques étaient augmentées en comparaison des sujets pré-S, CTS ou atteints de MPP (figure 79). Au sein des DLFT pures, les valeurs des NfL étaient statistiquement plus hautes dans le plasma des patients présentant une mutation dans le gène *GRN*, comparé aux sujets présentant une mutation dans le gène *C9ORF72* (p = 0,013) ou aux cas sporadiques (p = 0,022). Aucune différence de concentration n'a été mise en évidence entre ces deux derniers groupes (p = 0,17).



**Figure 79 :** Concentrations des NfL dans le plasma des patients atteints de SLA, de DLFT+SLA, de DLFT ou de MPP et des sujets pré-S ou CTS. Les croix rouges symbolisent les valeurs aberrantes. \* p value < 0,05. **Abbréviations :** CTS : contrôles sains non mutés ; MPP : maladies psychiatriques primaires ; Pré-S : sujets présymptomatiques porteurs de mutations impliquées dans les DLFT.

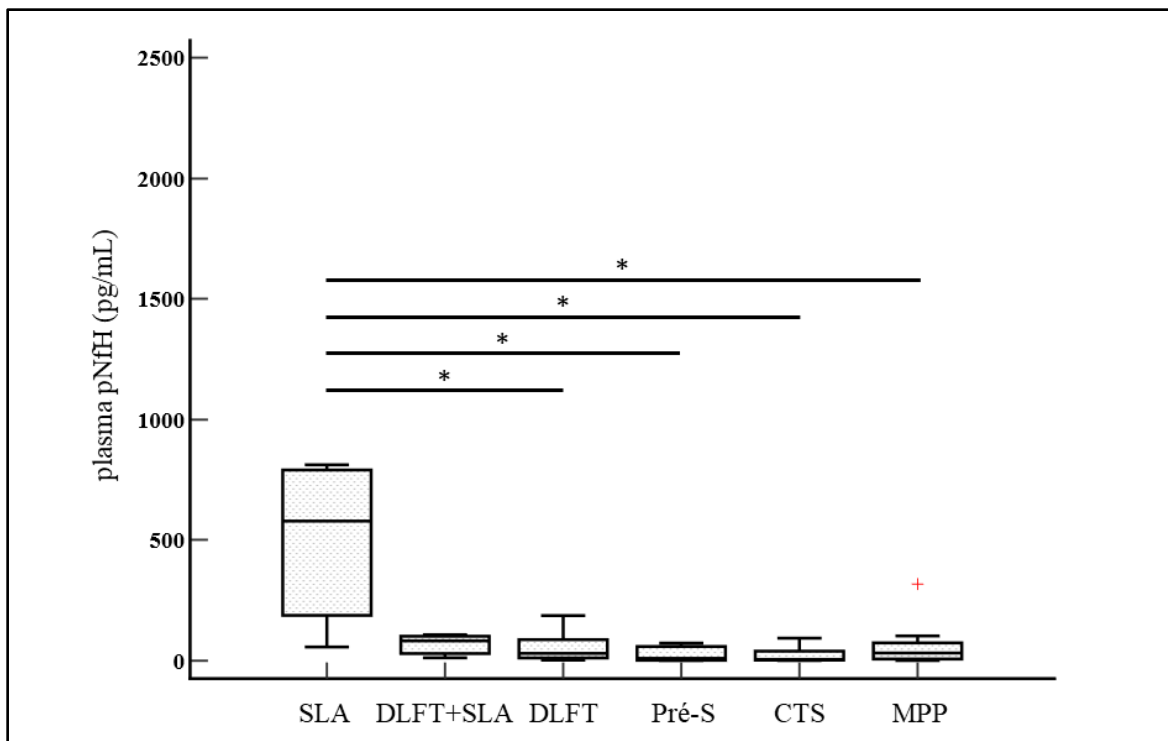


- **Neurofilaments à chaîne lourde phosphorylés**

L'étude des pNfH dans la cohorte élargie en échantillons plasmatiques a montré qu'augmenter le nombre de patients ne permettait pas de faire apparaître de différence significative entre la cohorte globale des patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA et ceux souffrant de MPP ( $p = 0,29$ ).

Cependant, Au sein des maladies du spectre DLFT-SLA, les valeurs des pNfH les plus élevées ont été mesurées chez les patients atteints d'une SLA. Ces concentrations chez les patients affichant des symptômes moteurs (SLA et DLFT+SLA regroupées) étaient par ailleurs plus élevées que chez les patients atteints de DLFT pure ( $p = 0,0019$ ). Ces derniers n'ont pas présenté de différence statistique dans leurs concentrations en pNfH comparé aux patients atteints de MPP, et aux sujets CTS et pré-S (figure 80).

Au sein des DLFT pure, aucune différence de concentration des pNfH n'a été mise en évidence en fonction du statut génétique des patients ( $p = 0,39$ ).



**Figure 80** : Concentrations des NfL dans le plasma des patients atteints de SLA, de DLFT+SLA, de DLFT pure ou de MPP et des sujets pré-S ou CTS. \*  $p$  value < 0,05. **Abréviations** : CTS : contrôles sains non mutés ; MPP : maladies psychiatriques primaires ; Pré-S : sujets présymptomatiques porteurs de mutations impliquées dans les DLFT.

### 3. Discussion

Dans cette étude rétrospective, cinq protéines (t-Tau, NfL, pNfH, UCH-L1 et GFAP) ont été mesurées dans des échantillons de LCS et/ou de plasma provenant de patients atteints de maladies du spectre DLFT-SLA ou de MPP, mais aussi de sujets présymptomatiques porteurs de mutations impliquées dans les DLFT et de contrôles sains.

Les concentrations dans les deux matrices ont été mesurées par une technologie ultrasensible, permettant de détecter des analytes à des concentrations mille fois plus faibles qu'un test ELISA classique. Le fait d'avoir obtenu des valeurs supérieures aux LDQ dans les échantillons plasmatiques valide le potentiel du SiMoA dans le dosage de marqueurs sanguins. En effet, les concentrations en protéines cérébrales dans ce fluide biologique sont généralement moins élevées que dans le LCS (369). Notre étude a permis d'observer qu'une fraction suffisamment importante de chaque protéine a néanmoins pu franchir la BHE et/ou la BHM pour être mesurée. Pour corroborer cette observation, il a été vérifié pour chaque analyte la corrélation entre les valeurs mesurées dans le LCS et le plasma, chez des patients pour lesquels des échantillons couplés de ces deux fluides étaient accessibles. Ainsi, une forte corrélation a été mise en évidence pour les NfL. Celle-ci était intermédiaire pour les pNfH et UCH L1, et faible pour la GFAP et la t-Tau.

Pour les NfL, cette observation est concordante avec la littérature au sein du spectre DLFT-SLA (457,506). Par ailleurs, dans une étude portant sur la maladie de Huntington, une corrélation de même intensité a été mise en évidence avec des effectifs comparables (434). Des résultats similaires ont également été rapportés chez des patients atteints de MA, démontrant que les concentrations en NfL plasmatiques ne sont pas le reflet d'évènements cérébraux uniquement dans les DLFT (507).

Une telle corrélation a aussi été décrite pour les pNfH, notamment chez des sujets souffrant de DLFT, de SLA ou des individus contrôles (457,458). Dans notre étude, elle apparaît cependant moins forte pour ce marqueur que pour les NfL. Si tous les mécanismes de libération et de dégradation des neurofilaments ne sont pas intégralement connus, cette différence pourrait néanmoins s'expliquer en partie par le fait que les pNfH puissent être recrutés dans des agrégats hétérogènes sanguins (508).

Il a également été avancé l'hypothèse par certains auteurs que les NfL, de plus petit poids moléculaire, pourraient diffuser plus facilement que les pNfH du tissu cérébral aux fluides biologiques (455). Cependant, les concentrations plasmatiques des deux neurofilaments étaient du même ordre de grandeur, permettant d'émettre des réserves concernant l'influence de la taille de ces protéines sur leur diffusion. La différence observée entre les NfL et les pNfH dans le LCS pourrait alors plutôt être expliquée par le ratio de production des sous-unités des neurofilaments, de 1 pour 5 en faveur des NfL (455).

Observer une corrélation des concentrations entre le LCS et le plasma est également concordant avec la littérature pour UCH L1. Cette protéine a notamment été très étudiée dans les contextes de traumatisme crânien et de SLA. La corrélation pour la GFAP est beaucoup plus faible, et concordante avec ce qui a pu être observé dans le contexte de DFLT-SLA (509–511).

Une faible corrélation a pu être mise en évidence pour la t-Tau dans cette étude, venant confirmer des résultats rapportés par ailleurs (424). Cependant, pour cette protéine, la concordance entre les valeurs mesurées dans le LCS et le plasma a été décrite comme faible, tandis que dans notre étude le seuil de significativité statistique a presque été atteint. Malgré de nombreuses études très récentes, le dosage de la t-Tau plasmatique ne semble pas être un marqueur très pertinent dans le cadre du diagnostic de la MA, alors qu'elle est un biomarqueur de première intention de cette pathologie lorsqu'elle est mesurée dans le LCS. Ceci démontre que la relation entre la t-Tau quantifiée dans ces deux fluides biologiques reste difficile à établir (423).

En parallèle des études de corrélation, le potentiel intérêt diagnostique des cinq protéines a été évalué dans le cadre du diagnostic différentiel des maladies du spectre DLFT-SLA et des MPP. Les NfL ont présenté les performances diagnostiques les plus intéressantes du panel, en permettant de distinguer les deux groupes de pathologies à la fois dans le LCS et dans le plasma. Ces résultats, concordants avec la littérature, pourraient s'expliquer par le fait que les NfL sont des marqueurs de lésion axonale, qui semble quasi-absente dans les MPP contrairement aux maladies neurodégénératives (370,444–446). Pour ces protéines, les concentrations de 1000 pg/mL dans le LCS et de 16 pg/mL dans le plasma ont offert le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité pour distinguer les deux groupes d'intérêt.

Le seuil de 16 pg/mL pour les NfL plasmatiques, déterminé dans de relativement petites cohortes, est néanmoins proche de celui obtenu dans une étude incluant de grands échantillons de patients, dans laquelle les dosages ont été effectués par la même technologie que nous (SiMoA) (444).

Nos résultats, confortés par la littérature, suggèrent que les NfL pourraient servir de marqueur de différenciation entre les DLFT et les MPP, répondant alors à un réel besoin des cliniciens (255,512). Leur validation dans ce contexte nécessitera néanmoins une harmonisation des conditions préanalytiques et analytiques, comme pour les biomarqueurs de la MA (513). Des valeurs normales de référence devront aussi être établies. Il a été suggéré que celles-ci soient définies en fonction de l'âge des sujets (370). En effet, chez l'adulte, une augmentation de 2 % par an des NfL a été décrite (514). Dans notre étude, cette augmentation physiologique semble cependant largement masquée par l'augmentation liée aux pathologies du spectre DLF-SLA, puisque les patients étaient statistiquement du même âge que les sujets souffrant de MPP et présentaient pourtant des taux très supérieurs de NfL. De plus, le fait que les concentrations de ce marqueur soient apparues comme statistiquement similaires entre les patients atteints de MPP et les sujets sains, pourtant plus jeunes, permet de relativiser l'effet de l'âge sur les valeurs de ce marqueur dans la population générale. Ainsi, en cas de ponction lombaire dans le cadre du soin courant pour le bilan diagnostique des troubles cognitifs comportementaux, le dosage des NFL pourrait être proposé en analyse complémentaire. En outre, la très bonne corrélation observée entre le LCS et le sang rend ces matrices interchangeable. Le recours à un prélèvement sanguin plutôt qu'à une ponction lombaire est alors envisageable, notamment chez des patients présentant des troubles du comportement importants rendant délicate la réalisation de cette dernière. Ce type de prélèvement offrirait en outre la possibilité d'assurer le suivi de l'évolution de la maladie (402,450,452,453). Ce suivi pourrait aussi être réalisé chez les sujets présymptomatiques. En effet, certaines études ont décrit une augmentation des NfL plasmatiques un à deux ans avant l'apparition des premiers signes cliniques, bien que cette augmentation ne semble pas systématique (449,451). Dans notre étude, les concentrations de ces protéines n'étaient pas significativement différentes entre les contrôles sains et les sujets présymptomatiques, peut-être parce que ces derniers étaient loin de la phénoconversion. En effet, lors de l'entretien avec des neurologues experts dans le cadre de l'examen diagnostique génétique des DLFT, aucun trouble cognitif, même mineur, n'a été observé chez ces sujets. L'influence du type de variant pathogène sur la concentration des NfL a également été confirmée dans cette étude, en accord avec la littérature (420).

En effet, au sein des DLFT, les concentrations les plus élevées en NfL ont été mesurées chez les patients présentant une mutation du gène *GRN* en comparaison des autres sujets. Chez ces individus, l'atteinte de la substance blanche est également souvent importante et l'atrophie corticale se développe rapidement (314,321). Ces observations permettent de supposer que les processus physiopathologiques impliqués dans les différents types de DLFT ne sont pas forcément identiques, et que les NfL pourraient constituer un argument supplémentaire pour orienter vers l'une ou l'autre des anomalies génétiques.

Une corrélation entre les valeurs des NfL et des pNfH dans le LCS a été observée, là encore en accord avec la littérature (455). Elle pourrait s'expliquer par le fait que les pNfH, comme les NfL, sont des marqueurs de la lyse axonale (427). Cependant notre étude a aussi montré des différences entre eux. En effet, la mesure des pNfH n'a pas permis de distinguer les maladies du spectre DLFT-SLA des MPP, que ce soit dans le LCS ou le plasma. De façon intéressante, aucune différence significative n'a été observée entre les patients atteints de DLFT isolée et de MPP. Peu de données sont disponibles concernant l'intérêt des pNfH pour le diagnostic différentiel de ces pathologies. Des études comparatives des concentrations de ce marqueur dans le LCS et le plasma de patients atteints de DLFT et de sujets contrôles ont cependant été menées (457–461,515). Leurs résultats sont contradictoires, puisque chez les patients atteints de DLFT, les pNfH semblent pouvoir être augmentés ou normaux. L'augmentation parfois observée pourrait cependant être médiée par des patients présentant des troubles moteurs associés. Cette hypothèse est concordante avec nos résultats dans le LCS, puisque des valeurs de pNfH augmentées ont été mises en évidence chez les patients présentant des troubles moteurs (SLA et DLFT+SLA regroupées) en comparaison des patients atteints de DLFT pure. Dans la cohorte enrichie en échantillons plasmatiques, des résultats similaires ont été observés. Les sujets SLA ont par ailleurs présentés une valeur médiane de pNfH plasmatiques 100 fois plus élevée que les sujets sains. Cette augmentation est 10 fois supérieure à celle observée avec les NfL chez ces patients. De plus, il a été rapporté dans la littérature que dans le cadre du diagnostic de la SLA, le dosage des pNfH présenterait de meilleures performances que celui des NfL en termes de sensibilité et de spécificité. La concentration des premiers refléterait également mieux le degré de l'atteinte neurologique au cours du temps (456,516). Ainsi, les résultats de notre étude, associés aux données de la littérature, suggèrent que les pNfH plus que les NfL pourraient être d'excellents marqueurs de diagnostic et de suivi des SLA symptomatiques.

Leur cinétique chez les sujets présymptomatiques est source de débat. En effet, une augmentation de leur valeurs chez certains de ces individus a été rapportée, mais ne semble pas systématique (517,518). Dans notre étude, les concentrations des pNfH n'étaient pas différentes entre les sujets contrôles et les sujets présymptomatiques. Cependant, comme pour les NfL, peut-être que ces derniers étaient loin de la phénoconversion. Lorsque l'augmentation des pNfH chez les sujets présymptomatiques sera mieux caractérisée, la corrélation des valeurs entre le LCS et le plasma, mise en évidence ici et confirmé dans la littérature, permettra d'envisager ces protéines comme un marqueur de dépistage précoce de la SLA (519).

La t-Tau, était le troisième et dernier marqueur de dégénérescence axonale analysé dans cette étude (354). Bien que peu spécifique des DLFT, cette protéine quantifiée dans le LCS a permis de réaliser un diagnostic différentiel entre ces pathologies et les MPP. Ce résultat est en accord avec la littérature (493). En considérant les individus atteints de MPP comme des sujets contrôles, nous retrouvons les mêmes résultats que Bourbouli *et al* (364). Les performances analytiques de la t-Tau étaient néanmoins légèrement inférieures à celles des NfL et d'UCH L1 dans cette matrice. De plus, dans la littérature, une absence de différence de concentration entre des sujets atteints de DLFT et des individus contrôles a aussi été rapportée (420–422). Si les travaux portant sur la mesure de la t-Tau dans le LCS de patients atteints de DLFT ont présenté des résultats contradictoires, ils ont néanmoins tous révélé de larges amplitudes dans les valeurs mesurées et un recouvrement important entre les groupes de patients. Ces observations ont été retrouvées dans notre étude. Celle-ci a par ailleurs mis en lumière une absence de résultat tangible dans le plasma, également décrite par certains auteurs notamment dans un contexte de MA (423).

En parallèle des marqueurs de lyse axonale, UCH L1 a également été étudiée. Il s'agit d'une protéine liée au SUP, très exprimée au sein du SNC (496). Mesurer ses concentrations dans les fluides biologiques de patients atteints de DLFT et/ou de SLA semblait pertinent, car des mutations génétiques impliquées dans ces pathologies ont été associées à un défaut du SUP. De plus, la présence au niveau cérébral de protéines anormalement ubiquitinylées et non dégradées est une caractéristique importante des DLFT (75,76,520). Enfin, un site d'ubiquitination pathologique a été mis en évidence chez des patients atteints de SLA (163). UCH L1 s'est révélé être un marqueur très intéressant dans un contexte de diagnostic étiologique de troubles du comportement. Dans notre travail, son dosage a permis de distinguer les deux groupes DFLT-SLA et MPP avec de bonnes performances diagnostiques, quelle que soit la matrice.

A notre connaissance, il s'agit d'un résultat qui n'a jamais fait l'objet de publication dans ce contexte clinique. En effet, une étude comparative des valeurs d'UCH L1 dans le LCS de sujets contrôles et de patients atteints de DLFT n'avait révélée aucune variation particulière chez ces derniers. Des concentrations augmentées de cette protéine ont néanmoins été mesurées chez les patients souffrant de DLFT associées à des atteintes motrices (521). De plus, des analyses récentes en spectrométrie de masse ont montré que les taux de cette protéine mesurés dans le LCS pouvaient être très augmentés dans un contexte de SLA (510,522). Enfin, UCH L1 a également été décrite comme diminuée dans certaines MPP (523). Ces données sont globalement plutôt en accord avec les résultats encourageants de notre étude, qui devront maintenant être confirmés par des travaux sur de plus grandes cohortes.

La GFAP était le dernier marqueur du panel. Cette protéine est impliquée dans le fonctionnement des astrocytes. Etudier différents types de cellules nerveuses peut être une approche intéressante pour maximiser les chances de trouver un marqueur performant. De plus, l'activation des astrocytes engendre une augmentation de concentration de la GFAP, qui a par exemple pu être mesurée dans le LCS de patients atteints de MA et de maladie de Creutzfeldt Jakob (503). Si un phénomène d'astrogliose cérébrale a également été observé dans les MPP, celle-ci semble moins intense dans ces maladies que dans les DLFT (504,505). Pourtant, dans notre étude, le dosage de la GFAP n'a pas permis de distinguer ces deux groupes de pathologies, que ce soit dans le LCS ou le plasma. Les données de la littérature concernant les concentrations de GFAP dans un contexte de DLFT ont abouti à des conclusions contradictoires. En effet, elles semblent parfois être augmentées dans le LCS ou dans des matrices issues du sang des patients, mais ce phénomène ne semble pas systématique (510,524–527). Les niveaux de GFAP pourraient en fait être autant influencés par l'intensité de la neurodégénération que par le statut génétique des patients (527). En outre, l'élévation des valeurs de la GFAP chez les patients atteints de DLFT ne semble survenir qu'au stade symptomatique de la maladie pour ensuite augmenter régulièrement (510,526). Les concentrations de GFAP pourraient donc également dépendre du temps écoulé entre l'apparition des premiers symptômes et la réalisation de la ponction lombaire et/ou du prélèvement sanguin. Enfin, si les concentrations plasmatiques de GFAP semblent pouvoir être diminuées chez les individus souffrant de schizophrénie, les patients atteints de dépression sévère ou de troubles bipolaires ne semblent pas affectés (528).

Enfin, malgré de petites cohortes, ce travail apporte des arguments supplémentaires de l'utilité de marqueurs non spécifiques pour renforcer le diagnostic des maladies du spectre DLFT-SLA. Nous avons également pu préciser, au sein de ce spectre, les différents contextes cliniques dans lesquels il pourrait être recommandé d'utiliser plus particulièrement les NfL et les pNfH. Les très bonnes performances de certains de ces marqueurs incitent à continuer les évaluations. À cette fin, la collaboration avec le centre hospitalier spécialisé Le Vinatier va se poursuivre par une étude prospective d'une plus large cohorte de patients souffrant de MPP bien caractérisés.



## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Les DLFT, qui représentent la deuxième cause de troubles neurocognitifs dégénératifs chez l'adulte de moins de 65 ans, sont hétérogènes d'un point de vue clinique et peuvent présenter des recouvrements symptomatologiques avec d'autres maladies neurodégénératives mais aussi avec des pathologies psychiatriques primaires.

Ces maladies se caractérisent par la présence d'agrégats protéiques cérébraux composés majoritairement de TDP-43. L'accumulation de cette protéine dans des inclusions cytoplasmiques, sous formes hyperphosphorylées, tronquées et agrégées dans le cortex des lobes frontaux et/ou temporaux des patients est ainsi un marqueur pathognomonique des DLFT-TDP, permettant d'obtenir un diagnostic de certitude (25,26,75). De telles analyses ne peuvent cependant être effectuées qu'en post mortem. En 2015, un essai comparatif de prélèvement de tissu cérébral par craniotomie ou à l'aide d'une aiguille a été effectué sur des patients autopsiés, pour évaluer leur intérêt dans le diagnostic de différentes maladies neurodégénératives, dont les DLFT-TDP. Des résultats jugés intéressants, associés à des risques de complications et de mortalité estimés plus faibles pour le prélèvement par aiguille, a permis aux auteurs de conclure que la faisabilité de cette méthode méritait d'être testée sur des patients vivants (529). A ce jour, aucun essai de ce type n'a cependant été initié et il n'existe aucun marqueur étiologique des DLFT accessible du vivant des patients, à l'exception des examens de biologie moléculaire.

Un des objectifs principaux de ce travail était alors de déterminer si la TDP-43 présente dans les inclusions cérébrales pouvait être mise en évidence dans les fluides biologiques. Les études plutôt pessimistes sur l'intérêt du dosage quantitatif de la TDP-43 nous ont conduit à nous interroger sur la qualité des outils disponibles pour cette détection. Pour répondre à cette problématique, nous avons décidé de produire de nouveaux anticorps dirigés contre cette protéine et plus particulièrement les isoformes décrites comme liées à la pathologie. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un partenariat avec la société de biotechnologie allemande Roboscreen à partir de peptides de synthèse. Plusieurs nouveaux anticorps ont pu être produits, dont certains dirigés contre les isoformes phosphorylées de la protéine. Nous avons pu démontrer au cours de ce travail que leurs qualités analytiques, testées par Western Blot, sont équivalentes aux anticorps commerciaux disponibles. Il est maintenant nécessaire de vérifier leur performance sur des coupes tissulaires en immunohistochimie pour compléter leur caractérisation.

L'étude de la TDP-43 par ces nouveaux anticorps dans différentes matrices a permis de développer et valider une méthode nouvelle de détection par technologie Simple Western. Ce développement est important car cette technologie automatisée et miniaturisée, développée sur l'automate Peggy Sue, est particulièrement adaptée au screening à haut-débit des anticorps et des matrices. De plus l'interprétation des signaux mesurés dans les capillaires par méthode semi-quantitative semble présenter un niveau de variabilité acceptable sur des échantillons purifiés, de l'ordre de celle obtenues par technique ELISA. Cette technique offre ainsi des perspectives encourageantes pour la poursuite des travaux.

L'étude qualitative de la TDP-43 dans le LCS et le plasma a permis de montrer, que les protéines circulantes sont sources d'interférences importantes sur sa détection. Ces données soulignent la difficulté de mettre en évidence une isoforme d'une protéine spécifique d'origine cérébrale, probablement en quantité très faible, dans un environnement complexe. En revanche, la détection de la TDP-43 totale et phosphorylée dans des lysats plaquettaires semble plus pertinente car plus spécifique et moins soumise à ces interférences. Les premiers résultats que nous avons obtenus en comparant, sous forme d'un rapport, l'isoforme totale et les isoformes phosphorylées sont encourageants et devront être confirmés sur des cohortes de patients plus importantes.

Devant ces difficultés de détection de la TDP-43 et compte tenu de l'hétérogénéité de la physiopathologie de ces maladies, l'évaluation de marqueur indirects est également un axe pertinent à explorer. Parmi différents marqueurs proposés dans la littérature, de nombreuses études ont démontré l'intérêt de la mesure des neurofilaments, plus particulièrement les NfL et les pNfH. Cependant, ces marqueurs ne sont pas spécifiques et se révèlent être augmentés dans le LCS et le plasma de très nombreuses maladies neurologiques responsables d'atteintes centrales ou périphériques. A l'image des résultats de la littérature, nous avons confirmé cet intérêt dans nos travaux. Nous avons également et surtout pu apporter des arguments pour envisager un cadre de prescription qui nous semble plus pertinent pour ces marqueurs. En effet, les NfL apparaissent comme de très bons marqueurs permettant de différencier les maladies psychiatriques primaires des DLFT-SLA, alors que les pNfH semblent particulièrement bien adaptés aux maladies associées à des symptômes moteurs.

Les très bonnes performances des NfL et l'intérêt qu'ils suscitent auprès d'un grand nombre de professionnels laissent entrevoir leur potentiel comme biomarqueurs des DLFT, mais également de très nombreuses autres maladies neurologiques. Cependant, avant d'envisager leur usage en routine clinique, d'autres étapes de validation sont nécessaires pour garantir leur fiabilité analytique et diagnostique et pour pouvoir correctement les positionner dans le parcours de soin des patients (530,531).

Ce travail de thèse a finalement également permis de mettre en lumière l'intérêt de la protéine UCH L1 dans ce contexte de diagnostic différentiel des DLFT et des maladies psychiatriques. Ce résultat n'ayant été que peu décrit dans la littérature, il sera alors intéressant de prolonger les recherches sur de plus grandes cohortes de patients.

## Annexes

**Annexe 1 :** Article portant sur le développement de la méthode de détection de la TDP-43 en Simple western.

Fourier A, **Escal J**, Bernard E, Lachman I, Perret-Liaudet A, Leblanc P, Quadrio I. *Development of an automated capillary nano-immunoassay - Simple Western assay - to quantify total TDP43 protein in human platelet samples*. Analytical and Bioanalytical Chemistry (2019). doi: 10.1007/s00216-018-1437-4.

**Annexe 2 :** Article portant sur l'intérêt comparé des NfL et des pNfH dans un contexte de maladie du spectre DLFT-SLA.

**Escal J**, Fourier A, Formaglio M, Zimmer L, Bernard E, Mollion H, Bost M, Herrmann M, Ollagnon-Roman E, Quadrio I, Dorey JM. *Comparative diagnosis interest of NfL and pNfH in CSF and plasma in a context of FTD-ALS spectrum*. Journal of Neurology (2021). doi: 10.1007/s00415-021-10714-3.



# Development of an automated capillary nano-immunoassay—Simple Western assay—to quantify total TDP43 protein in human platelet samples

Anthony Fourier<sup>1,2</sup> · Jean Escal<sup>1,2</sup> · Emilien Bernard<sup>3</sup> · Ingolf Lachman<sup>4</sup> · Armand Perret-Liaudet<sup>1,2,5</sup> · Pascal Leblanc<sup>6</sup> · Isabelle Quadrio<sup>1,2,5</sup>

Received: 13 August 2018 / Revised: 11 October 2018 / Accepted: 18 October 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

## Abstract

Frontotemporal lobar degeneration syndrome is the second cause of young-onset dementia. Unfortunately, reliable biomarkers are currently lacking for the diagnosis of this disease. As TDP43 protein is one of the proteins pathologically involved in frontotemporal lobar degeneration, many studies have been performed to assess TDP43 protein diagnostic performances. Mixed results were obtained using cerebrospinal fluid and plasma samples so far. The aim of the study was to develop an automated capillary nano-immunoassay—Simple Western assay—to detect and quantify TDP43 protein simultaneously in human blood-based samples. Simple Western assay was developed with two different cell lysates used as positive controls and was compared to Western blot. TDP43 protein profiles in plasma samples were disappointing, as they were discordant to our positive controls. On the contrary, similar TDP43 patterns were obtained between platelet samples and cell lysates using both assays. Simple Western assay provided good quantitative performances in platelet samples: a linearity of signals could be observed ( $r^2 = 0.994$ ), associated to a within-run variability at 5.7%. Preliminary results based on a cohort of patients suffering from frontotemporal lobar degeneration showed large inter-individual variations superior to Simple Western's analytical variability. Simple Western assay seems to be suitable for detecting and quantifying TDP43 protein in platelet samples, providing a potential candidate biomarker in this disease. Further confirmation studies should now be performed on larger cohorts of patients to assess diagnostic performances of TDP43 protein in platelet samples.

**Keywords** Dementia · TDP43 proteinopathies · Capillary electrophoresis/electrophoresis · High-throughput screening assays · Biomarkers

✉ Anthony Fourier  
anthony.fourier@chu-lyon.fr

- <sup>1</sup> Neurochemistry Laboratory, Biochemistry Department, Centre de Biologie et Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, 59 Bd Pinel, 69677 Bron, France
- <sup>2</sup> BIORAN Team, Lyon Neuroscience Research Center, CNRS UMR 5292 – INSERM U1028, Université de Lyon – Université Claude Bernard, 95 Bd Pinel, 69675 Bron, France
- <sup>3</sup> Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, 59 Bd Pinel, 69677 Bron, France
- <sup>4</sup> AJ Roboscreen GmbH, Hohmannstraße 7, 04129 Leipzig, Germany
- <sup>5</sup> Center for Memory Resources and Research, Hospices Civils de Lyon, Charpennes Hospital, Lyon 1 University, 69100 Villeurbanne, France
- <sup>6</sup> Institut NeuroMyoGène (INMG), CNRS UMR5310 - INSERM U1217, Université de Lyon - Université Claude Bernard, 69008 Lyon, France

## Introduction

Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) is a clinically and pathologically heterogeneous syndrome, characterized by progressive atrophy of frontal and/or anterior temporal lobes [1]. FTLD spectrum is the second cause of young-onset dementia [2]. Different clinical syndromes exist, defined on the basis of leading features at presentation. They include behavioral frontotemporal dementia (bvFTD) and other cognitive syndromes impairing language capabilities primarily [3, 4]. In addition, both syndromes can overlap with motor neuron diseases [5]. The diagnosis of FTLD with definite pathology relies on the association of a clinical diagnosis with different core features depending on the syndrome and either presence of histopathologic evidence of specific protein aggregates or a known pathogenic mutation [6, 7].

In 2006, Neumann et al. discovered TDP43 protein as the major component of ubiquitin-positive, tau- and alpha-

synuclein negative inclusions in FTLD [8]. TDP43 cerebral inclusions contain an accumulation of native protein, but also hyperphosphorylated and truncated forms of TDP43 protein [9]. Numerous studies have been performed so far to elucidate TDP43 protein's functions, metabolism and misprocessing [10]. Otherwise, a lot of research has been done to detect TDP43 protein in patients' biofluids, potentially providing a diagnostic, prognostic and/or therapeutic evaluation biomarker [11]. Cerebrospinal fluid (CSF) markers are commonly evaluated in neurodegenerative diseases [12]. Plasma samples are less invasive, but neurodegenerative markers may exhibit lower concentrations than in CSF. Developing blood-based biomarkers could then become challenging in the absence of sensitive enough technologies [13]. Currently, no CSF or plasma biomarker can positively identify living FTLD patients [14]. Some studies showed differences in TDP43 protein between FTLD patients and other neurodegenerative diseases or controls in both matrices [15, 16]. However, quantification of TDP43 protein in CSF and plasma gave contradictory results so far. Potential reasons to these discrepancies could be the very low concentration of this protein or the low-binding affinity of the antibodies in the presence of abundant immunoglobulins and albumin, underscoring the necessity to identify disease-specific patterns [17]. Interestingly, different high-throughput Western blot platforms exhibit qualitative patterns associated to quantitative results and offer simplified workflows compared to traditional Western Blot [18–20]. Moreover, some studies highlighted an important role of platelets in neurodegenerative diseases, thus providing a new potential matrix for biomarkers' discovery [21].

The main objective of this study was to evaluate Simple Western technology developed on Peggy Sue analyzer (Protein Simple®) to detect TDP43 protein in platelet samples, in the context of lacking validated markers for FTLD. This automated technology coupled both electrophoresis and a chemiluminescent detection, providing qualitative and semi-quantitative measurements for tested samples. After initial development using cell culture lysates, Simple Western assays were performed to detect TDP43 protein in plasma and platelets samples. This first step was followed by an evaluation of automated quantification of TDP43 protein. Finally, the suitability and analytical performances of Simple Western assay were assessed on platelet samples from FTLD patients.

## Material and methods

### Samples

#### Endogenous TDP43 protein in cell culture lysates

The human embryonic kidney cell line HEK293T was obtained from the Généthon (Evry, France). Cells were cultured

in DMEM-Glutamax medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and penicillin/streptomycin (Invitrogen). The human neuroblastoma cell line SH SY5Y was obtained from Sigma-Aldrich® (Saint-Louis, USA) and was cultured in DMEM-F12 (1/1) Glutamax supplemented with 10% FBS, non-essential amino acids and penicillin/streptomycin (Invitrogen®, Carlsbad, USA). SH SY5Y and HEK293T cells were recovered in 1× PBS and pelleted by centrifugation at 4 °C. Cell pellets were suspended and lysed in Laemmli lysis sample buffer (6% Tris HCl pH 6.8, 10% β-mercaptoethanol, 4% SDS, glycerol and bromophenol blue) and sonicated at 4 °C. Cell lysates were frozen at –20 °C until further analyses.

#### Study population and *C9ORF72* genetic testing

The cohort included 2 male and 7 female patients aged between 59 and 76 years old. All the patients met the diagnosis of probable behavioral variant of frontotemporal dementia (bvFTD) according to Rascovsky criteria [6] and exhibited a family history of neurodegenerative diseases including FTD and/or ALS [22]. Following genetic counseling in the framework of their medical follow-up, the patients included in this study or their legal next of kin gave two informed written consents: the first one for FTLD genetic testing and the second one authorizing a change of biological purpose for remaining parts of samples. Blood sampling (EDTA tubes) was collected. After DNA extraction, the screening for GGGGCC repeat expansions in *C9ORF72* (the genetic variant with the highest prevalence in FTLD) was performed using a repeat-primed PCR (RP-PCR), adapted from the international study from Akimoto et al. [23]. RP-PCR products were separated by capillary electrophoresis using an ABI 3130xL (Life Technologies®, Carlsbad, USA) with Genescan™ 500 ROX size standard (Life Technologies®). Data were analyzed using GeneMapper® software 5 (Applied Biosystems®, Foster City, USA). RP-PCR gave negative results for *C9ORF72* expansion screening in all patients.

#### Blood fractionation of samples

In parallel to classical genetic testing, a part of whole-blood samples was centrifuged at 200g during 15 min (without acceleration and deceleration) to obtain platelet-rich plasmas (PRP). PRP were then centrifuged at 2000g during 15 min. Platelet-poor plasmas (PPP) were then saved, aliquoted, and stored at –80 °C. Pellets were suspended in 4 mL of washing buffer (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2.7 mM in water, pH 7.35). A second centrifugation at 2000g during 15 min was performed, supernatant was discarded and pellets were suspended again in 4 mL of washing buffer. Platelet counts were performed on Sysmex® (Kobe, Japan) XN-2000 analyzer. Another centrifugation was performed at 2000g during

15 min and supernatant was discarded. Pellets were suspended in a variable volume of buffer (Tris 50 mM, NaCl 150 mM in water, pH 7.35/Triton X-100 20%, ratio 40:1) to obtain a similar final platelet concentration in all samples (200 G/L). Platelet samples were heated at 37 °C during 15 min, aliquoted and stored at -80 °C until further analysis. Diluted solutions of albumin (Vialebex®, LFB Biomedicaments®, France, 40 g/L) and immunoglobulins (Privigen®, CSL Behring®, USA, 100 g/L) were analyzed in parallel to plasma samples (final dilution for both solutions: 0.5 g/L).

### Recombinant TDP43 protein

Recombinant human TDP43 protein (Ag1231) was purchased from Proteintech® (Rosemont, USA). This truncated recombinant protein includes TDP43 1-260 amino acids, with N-terminal GST tag and its approximated molecular weight is 56 kDa. Serial dilutions from a stock solution (0.5 mg/mL) were performed to assess semi-quantitative performances of Simple Western assay.

### Antibodies

Rabbit polyclonal 10782-2-AP antibody (ProteinTech®, Rosemont, USA) was chosen to detect total TDP43 protein in the different tested matrices. This antibody is one of the most popular anti-TDP43 antibodies and detects TDP43 aminoacids 203–209 and aminoacids near N-terminus [24]. Rabbit polyclonal 12892-1-AP antibody (ProteinTech®, Rosemont, USA) and mouse monoclonal 2G10 antibody (AJ Roboscreen GmbH®, Leipzig, Germany) were used to confirm the specificity of TDP43 protein profiles. These antibodies are directed against TDP43 aminoacids 288–414 and aminoacids 201–220 respectively.

### Simple Western assays

Simple Western 12–230 kDa size-assays were carried out using Peggy Sue® analyzer (Protein Simple, San Jose, CA, USA). First, we prepared a 384-microwell plate containing samples mixed with fluorescent standards and denatured at 95 °C during 5 min, a ladder including 6 size markers, primary antibodies (dilution 1/50 in our study), secondary antibodies, the detection solution (equivalent volumes of luminol and peroxide), stacking and separation matrices, according to the manufacturer's preparation template [25]. After centrifugation at 1000g during 5 min, the 384-microwell plate was loaded into Peggy Sue® platform. Then, the complete automated workflow, ranging from samples' uptake on the plate to the chemiluminescent detection and quantification of proteins, was launched. The first step consisted in samples' loading into 12 individual single-use capillaries per cycle (1 cycle comprising 11 samples and 1 ladder), followed by a size-based separation (45 min in our

study). A detection of fluorescence of standards, mixed with every sample, ensured a control of electrophoresis. Sample proteins were captured onto capillary beds after illumination with UV light. Incubations of primary and secondary antibodies lasted 1 h and 30 min respectively in our protocol. Finally, a chemiluminescent detection of target proteins was automatically performed with different exposure times, ranging from 4 to 512 s [20]. Target proteins' sizes were determined for each sample in comparison to the migration of the size markers of the ladder. Heights and areas of all detected peaks were systematically calculated on Compass for Simple Western® software, version 3.1.7, using the 4-s exposure time.

### Western blot assays

According to their nature, samples could be preliminary diluted in sodium chloride. Then Laemmli lysis sample buffer (6% Tris-HCl pH 6.8, 10% β-mercaptoethanol, 4% SDS, glycerol and bromophenol blue) was added to samples (ratio 1:1). Samples were denatured at 95 °C for 5 min and 10 μL of samples were separated on NuPAGE 4–12% Bis-Tris protein gels, 1.0 mm (Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA) with MOPS SDS running buffer (Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA) according to manufacturer's instructions. Proteins were then transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane and blocked during 2 h with 5% nonfat-dried milk in Phosphate Buffered Saline (PBS). Membranes were incubated overnight at 4 °C with rabbit polyclonal 10782-2-AP antibody (dilution 1/2000). Three washes were then performed in PBS-0.1% Tween. Membranes were incubated 30 min with secondary HRP anti-rabbit antibody (Agilent Dako®, Santa Clara, USA, dilution 1/2000), washed four more times with PBS-0.1% Tween and then three times with PBS. Finally, membranes were incubated with SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA) and exposed on Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare®, Buckinghamshire, UK). Apparent sizes of proteins were determined using MagicMark XP Western Protein Standard (Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA).

### Analytical performances of Simple Western assay

The determination of the limit of detection (LOD) and the lowest limit of quantification (LLOQ) was performed using 6 samples containing only Sample Buffer, the reagent used to perform dilutions with Simple Western assay. These "blank" samples were incubated in 6 different capillaries with both primary and secondary antibodies. Heights' and areas' peaks were determined for each of these 6 "blank" samples. LOD and LLOQ were then calculated as: LOD = average signal (height or area) + 3\* (standard deviation); LLOQ = average signal (height or area) + 10\* (standard deviation). In platelet



samples, capillary-to-capillary variability was evaluated using 6 determinations of the same sample in the same cycle. The correlation between calculated heights and areas of TDP43 protein signals was determined with the Pearson correlation coefficient  $r$ . The linearity observed for TDP43 protein signals was assessed performing a linear regression.

## Results

### Development of a Simple Western assay to detect TDP43 protein

Identical 1/50 dilutions of SH SY5Y and HEK293T cell lysates were compared using both Simple Western and Western Blot assays. First assays were performed using rabbit polyclonal 10782-2-AP antibody (Fig. 1a).

Identical TDP43 protein profiles were observed in SH SY5Y and HEK293T cell lysates using Western Blot assay, with a band of strong intensity between 40 and 50 kDa and faint bands between 30 and 40 kDa. The same patterns were obtained with Simple Western assay, but bands were around 10 kDa higher than those observed with the manual technique (54 kDa and 44 kDa respectively). In both assays, the intensity of signals was stronger in HEK293T cell lysate. The shift of TDP43 protein sizes was confirmed using two other anti-TDP43 antibodies presenting a different epitope (rabbit polyclonal 12892-1-AP antibody) or coming from a different species (mouse monoclonal 2G10 antibody) compared to rabbit polyclonal 10782-2-AP antibody (Fig. 1b).

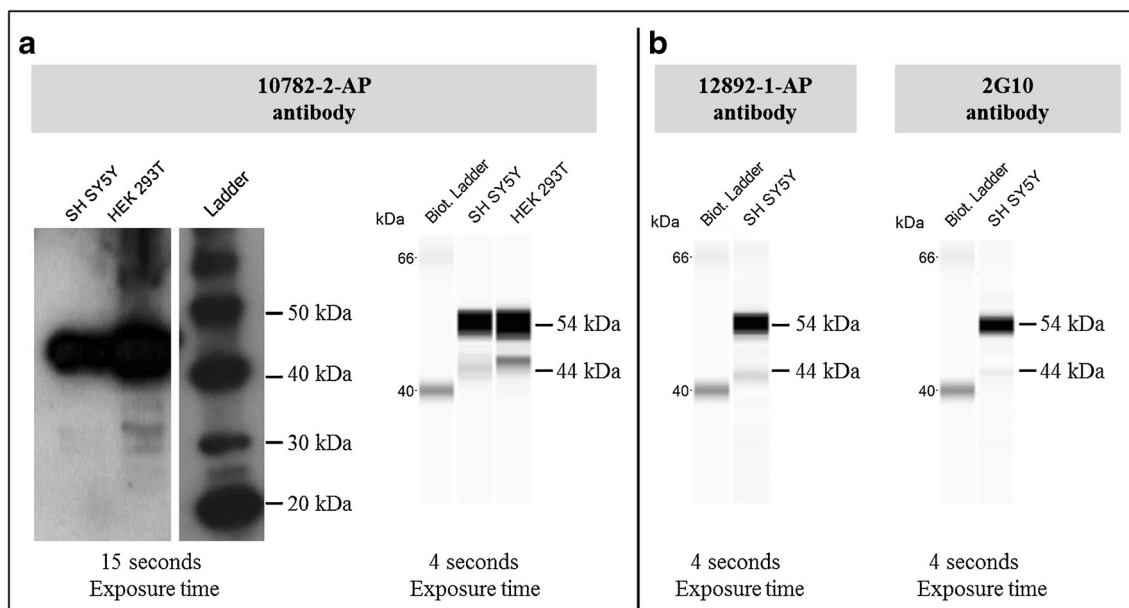
Blood-based samples obtained from one patient were then compared to SH SY5Y cell lysate using both Western Blot and Simple Western assays (Fig. 2a).

Western Blot and Simple Western TDP43 protein profiles were once again concordant, except for the shift of apparent sizes previously described (Fig. 2a). Both assays exhibited similar patterns in platelet samples and SH SY5Y cell lysate (lanes 3 and 4). On the contrary, protein profiles were different between plasma samples and SH SY5Y cell lysate: the bands that were previously described in platelet samples and SH SY5Y cell lysate were not detected in plasma samples (lanes 1, 2, and 4). However, plasma samples harbored other bands of different molecular weight. The electrophoretic profile of diluted PPP was compared to diluted solutions of immunoglobulins (IgG) and albumin (Alb.), as these two compounds are abundant in plasma and therefore could serve as migration controls (Fig. 2b). A similar pattern could be observed between diluted PPP and immunoglobulins. No reactivity was detected with diluted albumin.

### Quantitation of TDP43 protein using Simple Western assay

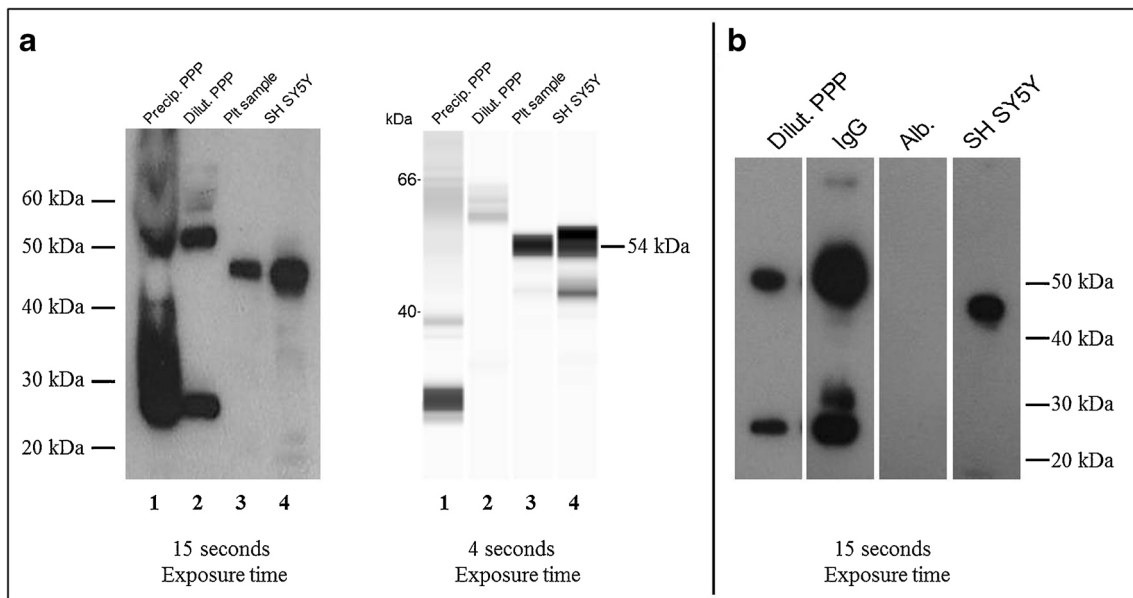
Quantitation performances of Simple Western assay were first performed using a stock solution of recombinant GST-tagged TDP43 protein (0.5 mg/mL according to manufacturer's instructions). Serial dilutions were performed, ranging from 0 to 20  $\mu\text{g/L}$  (Fig. 3).

A band of 57 kDa apparent mass was observed in all the dilutions of recombinant GST-tagged TDP43 protein. No



**Fig. 1** Comparison of Western Blot and Simple Western TDP43 protein profiles in HEK293T and SH SY5Y cell lysates. **a** Comparison of Western Blot and Simple Western protein profiles of SH SY5Y and HEK293T cell lysates (dilution 1/50) using rabbit polyclonal 10782-2-AP antibody. **b**

Identical Simple Western profiles were obtained in SH SY5Y cell lysate using both rabbit polyclonal 12892-1-AP and mouse monoclonal 2G10 antibodies

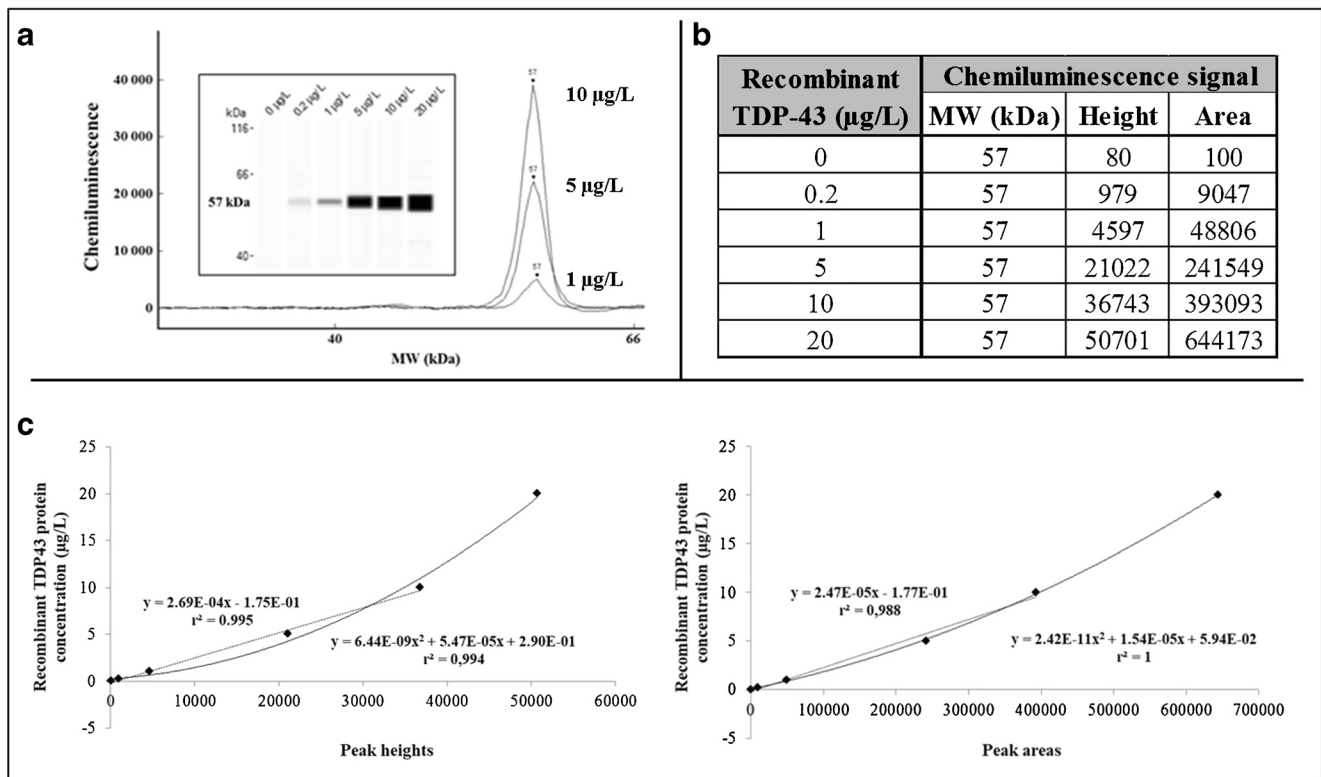


**Fig. 2** TDP43 protein profiles in blood-derived samples using rabbit polyclonal 10782-2-AP antibody. **a** Comparison of Western Blot (left) and Simple Western (right) assays representing blood fractionation of one patient: platelet-poor plasma (PPP) sample precipitated with ice-cold acetone (lane 1), PPP sample - dilution 1/100 - (lane 2) and

platelet sample (lane 3) are compared to SH SY5Y cell lysate (lane 4). **b** Western Blot assays of diluted immunoglobulins (IgG) and albumin (Alb) solutions with anti-TDP43 antibody compared to a diluted PPP sample and SH SY5Y cell lysate

signal was visible when no recombinant TDP43 protein was added and increased signals were observed for increased

recombinant protein concentrations (Fig. 3a). The intensity of signals was automatically calculated by Compass for



**Fig. 3** Serial dilutions of recombinant GST-tagged TDP43 protein using Simple Western assay. **a** Graph view and lane view (Compass for Simple Western® software) of serial dilutions of recombinant TDP43 protein (4-s exposure time). **b** Molecular weights, heights, and areas for all the

dilutions of recombinant protein (from 0 to 20 µg/L) automatically calculated by Compass for Simple Western® software. **c** Representation of calibration curves obtained for heights and areas signals

Simple Western® software (heights and areas are provided in Fig. 3b). The analysis of 6 “blank” samples, containing Sample Buffer only, gave a limit of detection (LOD) of 371 for peak heights and 1595 for peak areas. Using the same raw data, the lower limit of quantification (LLOQ) was 930 and 4322 for peak heights and areas respectively. Next, calibration curves were generated: a linear calibration curve ( $r^2 = 0.995$  for heights and  $r^2 = 0.988$  for areas) was obtained for concentrations below 10  $\mu\text{g/L}$  (Fig. 3c), as a saturation of signals was observed for the highest concentration (20  $\mu\text{g/L}$ ). Interestingly, a quadratic model fitted correctly to all concentrations ( $r^2 = 0.994$  for heights and  $r^2 = 1$  for areas). Using this last fitting model, the corresponding LLOQ of recombinant TDP43 protein were then 0.35  $\mu\text{g/L}$  and 0.13  $\mu\text{g/L}$  for heights and areas respectively. The lowest standard included in the calibration curve (0.2  $\mu\text{g/L}$ ) gave peak heights and peak areas close to these calculated values (Fig. 3b).

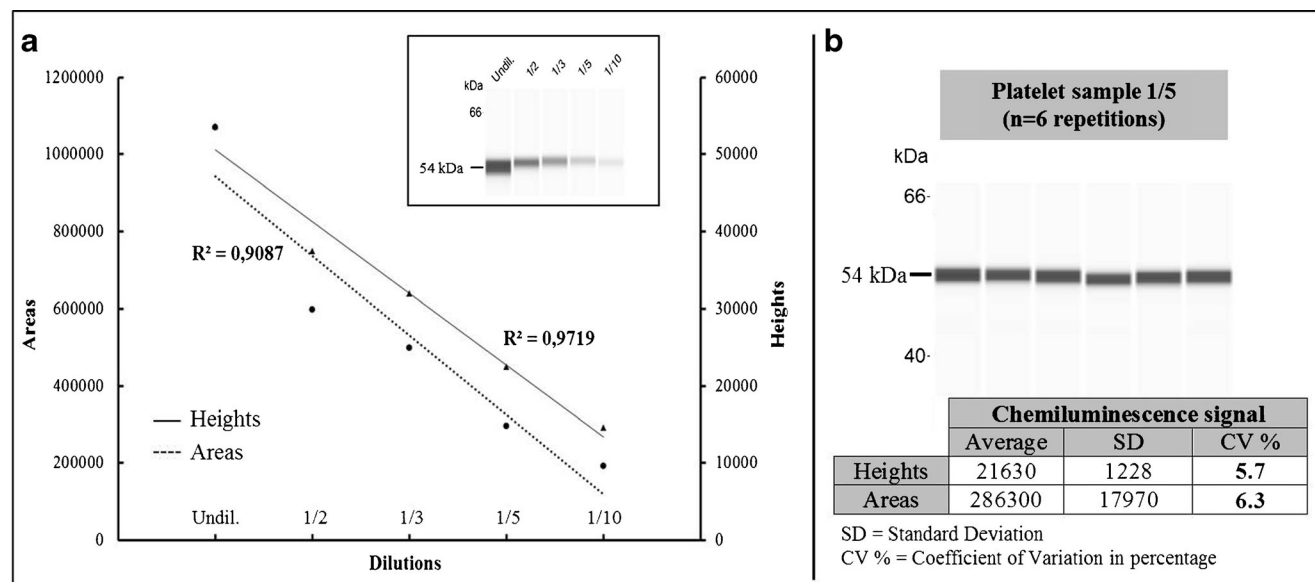
Further assays were performed to assess Simple Western assay's suitability to detect and quantify TDP43 signals in platelet samples (Fig. 4). Signals were detectable until a ten-fold dilution, which was the strongest dilution performed in this assay (Fig. 4a). A linearity of signals was observed ( $r^2 = 0.9719$ ) for peak heights. Concordant results ( $r^2 = 0.9087$ ) were obtained with peak areas. The variability of Simple Western assay was also assessed with repeated measurements of the same sample 6 times within one cycle: Simple Western assay exhibited an interesting 5.7% coefficient of variation for heights' determination (Fig. 4b). The coefficient of variation for areas' determination was 6.3%.

Finally, platelet samples were tested in duplicates in the cohort of nine patients suspected of familial FTLD (Table 1).

Calculated parameters by Compass for Simple Western® software gave concordant results for signals detection and calculation. Indeed, average heights and areas measured for a same patient were well-correlated (Pearson correlation coefficient  $r = 0.986$ ). Duplicates variation was correct for both calculations, the highest duplicate variability for average heights and areas being 13.1% and 13.6% respectively. Average heights exhibited a lower variability than average areas, with an average coefficient of variation at 4.9% versus 6.2%. In this cohort of 9 samples with normalized platelet concentration (200 G/L), a 38-fold difference was observed between the lowest and the highest TDP43 protein concentrations. Indeed, these two concentrations were 0.39  $\mu\text{g/L}$  and 14.76  $\mu\text{g/L}$  respectively using the quadratic calibration curve obtained for height signals. This variation was significantly above the analytical variation of Simple Western assay (the coefficient of variation was 5.7%), meaning that samples exhibited TDP43 protein signals in platelet samples which were quantitatively different between patients.

## Discussion

In this study, platelets appeared as a suitable sample matrix to study TDP43 protein in frontotemporal dementia patients. Indeed, platelet samples and SH SY5Y cell lysate, considered as a positive control for our target protein, gave identical TDP43 protein patterns using two different qualitative immunodetection assays: Western Blot and Simple Western assays. Western Blot assay is a commonly used tool to identify a specific protein in a complex mixture, and was therefore



**Fig. 4** Suitability of Simple Western assay to quantify TDP43 signals in platelet samples. **a** Serial dilution of one platelet sample gives linear signals using Simple Western assay (4-s exposure time). **b** Capillary-to-

capillary precision ( $n = 6$ ) of TDP43 protein chemiluminescent signals (heights and areas) using Simple Western assay

**Table 1** Calculated TDP43 signals in normalized platelet samples (200 G/L). Calculated parameters include average heights and areas of samples duplicates, their relative standard deviation (SD) and their coefficient of variation in percentage (% CV)

Sample	Calculated parameters (Compass for Simple Western® software)					
	Average height	SD	% CV	Average area	SD	% CV
Patient 1	19,750	25	0.1%	363,476	2580	0.7%
Patient 2	43,363	79	0.2%	974,709	15,054	1.5%
Patient 3	19,675	2569	13.1%	379,628	50,736	13.4%
Patient 4	28,583	2742	9.6%	601,856	37,526	6.2%
Patient 5	28,717	3176	11.1%	523,724	71,382	13.6%
Patient 6	41,743	1015	2.4%	827,149	12,269	1.5%
Patient 7	37,042	1829	4.9%	693,959	36,997	5.3%
Patient 8	25,686	158	0.6%	479,711	18,352	3.8%
Patient 9	1496	28	1.9%	28,569	2883	10.1%

considered as the reference method in our study [26]. Simple Western assay, a new automated capillary nano-immunoassay, provided qualitative protein patterns like Western Blot. First steps of Simple Western assays' development included the assessment of different dilutions of SH SY5Y and HEK293T cell lysates, ranging from 1/200 to 1/20 using rabbit polyclonal 10782-2-AP anti-TDP43 antibody. A band of strong intensity at 54 kDa and a fainter band at 44 kDa were visible. The comparison of Simple Western and Western Blot assays gave similar TDP43 protein patterns, at the exception of apparent molecular weight (Fig. 1a). Many factors can affect proteins' motility including the type of gel or matrix used for electrophoresis, running buffers and even the intrinsic characteristics of target protein [27]. TDP43 protein profiles obtained with Simple Western technology were confirmed using two other anti-TDP43 antibodies presenting a different epitope—rabbit polyclonal 12892-1-AP antibody—or coming from a different species—mouse monoclonal 2G10 antibody—(Fig. 1b). Our results were concordant with those of an industrial company providing another mouse monoclonal anti-TDP43 antibody (clone 671834), which was tested on A431 human epithelial carcinoma and NR8383 rat alveolar macrophage cell lines ([https://www.novusbio.com/products/tdp-43-tardbp-antibody-671834\\_mab7778](https://www.novusbio.com/products/tdp-43-tardbp-antibody-671834_mab7778)) [28]. Despite the shift of protein sizes observed between both assays, Simple Western was successful in providing qualitative TDP43 protein patterns. Differences were observed between plasma samples and SH SY5Y cell lysate. Indeed, the 54 kDa band observed in our positive control was not detected in plasma samples. On the other hand, additional bands were detectable in plasma samples, corresponding to immunoglobulin light and heavy chains (Fig. 2b). This cross-reaction with immunoglobulins was already described by Steinacker et al. assessing TDP43 protein in CSF samples [29]. Interestingly, contrary to plasma samples, platelet samples and SH SY5Y cell lysate exhibited similar TDP43 protein profiles.

In addition to protein profiles assessment, Simple Western assay allowed an automated semi-quantification of all the

peaks obtained in each capillary. An evaluation of the analytical performances of the protocol previously developed was then performed. When performing serial dilutions from a TDP43 recombinant protein solution, linear signals were observed for concentrations below 10 µg/L (Fig. 3c). With increased concentrations, a loss of linearity was observed, leading to a potential underestimation of signals [30]. Moreover, a burn-out phenomenon was visible, leading to the presence of split peaks or to a complete disappearance of signals for the most concentrated samples (data not shown). This phenomenon was already described for Simple Western assays [25] and is known as ghost or hollow bands in traditional Western Blot assays, occurring when too much target protein is applied, leading to a total depletion of substrate [26].

The linearity of chemiluminescent signals was observed for one platelet sample (Fig. 4a). In parallel, Simple Western assay provided a low capillary-to-capillary variability below 6.3% for both TDP43 heights and areas (Fig. 4b). These performances were similar to other variability assays performed using Simple Western assay or enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for CSF markers [31, 32]. Thus, Simple Western protocol seems suitable to detect and quantify total TDP43 protein in platelet samples.

In our cohort of nine platelet samples obtained from FTD patients, the lowest and the highest height values were 1496 and 43,363 respectively, despite a normalized platelets' concentration of 200 G/L per sample. The associated TDP43 protein concentrations were then 0.39 µg/L and 14.76 µg/L respectively. These values were above the LOD and LLOQ of this assay, validating the suitability of Simple Western assay to quantify TDP43 protein in platelet samples. Furthermore, this preliminary exploratory study indicates that TDP43 protein presents an important inter-individual variability in platelet samples superior to its analytical variability. This observation strengthens the fact that TDP43 protein's detection and quantification in platelet samples could become a potential candidate biomarker for diagnosis' purposes, reflecting pathological mechanisms in FTLD and ALS patients [33]. However,

this variability could also be due to physiological variations such as age and/or sex. To address these questions, a prospective study based on our newly validated Simple Western assay, combining coupled qualitative and quantitative measurements, should be performed to assess TDP43 protein diagnostic performances in larger cohorts of patients with neurodegenerative definite pathology.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** Ingolf Lachmann provided 2G10 antibody and reports that he is employee of AJ Roboscreen GmbH®, Leipzig, Germany. No other conflict of interest is reported.

**Ethical approval** This study was based on biological samples collected for routine diagnosis in the framework of a medical follow-up recommended for FTLT patients. The samples associated to written consents were stored in a bio bank with the authorization from the French Ministry of Health (Declaration Number DC-2008-304). Authorization for handling personal data was granted by the French data protection commission [Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL)].

The patients included in this study or their legal next of kin gave two informed written consents: the first one for FTLT genetic testing and the second one authorizing a change of biological purpose for remaining parts of samples.


## References

- Rabinovici GD, Miller BL. Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs*. 2010;24(5):375–98. <https://doi.org/10.2165/11533100-000000000-00000>.
- Warren JD, Rohrer JD, Rossor MN. Clinical review. Frontotemporal dementia. *BMJ*. 2013;347:f4827. <https://doi.org/10.1136/bmj.f4827>.
- Neary D, Snowden J, Mann D. Frontotemporal dementia. *Lancet Neurol*. 2005;4(11):771–80. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70223-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70223-4).
- Grossman M. Primary progressive aphasia: clinicopathological correlations. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(2):88–97. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.216>.
- Irwin DJ, Cairns NJ, Grossman M, McMillan CT, Lee EB, Van Deerlin VM, et al. Frontotemporal lobar degeneration: defining phenotypic diversity through personalized medicine. *Acta Neuropathol*. 2015;129(4):469–91. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1380-1>.
- Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain*. 2011;134(Pt 9):2456–77. <https://doi.org/10.1093/brain/awr179>.
- Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*. 2011;76(11):1006–14. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31821103e6>.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006;314(5796):130–3. <https://doi.org/10.1126/science.1134108>.
- Gao J, Wang L, Huntley ML, Perry G, Wang X. Pathomechanisms of TDP-43 in neurodegeneration. *J Neurochem*. 2018. <https://doi.org/10.1111/jnc.14327>.
- Buratti E. TDP-43 post-translational modifications in health and disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(3):279–93. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1439923>.
- Geser F, Prvulovic D, O'Dwyer L, Hardiman O, Bede P, Bokde AL, et al. On the development of markers for pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. *Prog Neurobiol*. 2011;95(4):649–62. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.08.011>.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):263–9. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>.
- Snyder HM, Carrillo MC, Grodzstein F, Henriksen K, Jeromin A, Lovestone S, et al. Developing novel blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014;10(1):109–14. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.10.007>.
- Riedl L, Mackenzie IR, Forstl H, Kurz A, Diehl-Schmid J. Frontotemporal lobar degeneration: current perspectives. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014;10:297–310. <https://doi.org/10.2147/NDT.S38706>.
- Kasai T, Tokuda T, Ishigami N, Sasayama H, Foulds P, Mitchell DJ, et al. Increased TDP-43 protein in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2009;117(1):55–62. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0456-1>.
- Foulds PG, Davidson Y, Mishra M, Hobson DJ, Humphreys KM, Taylor M, et al. Plasma phosphorylated-TDP-43 protein levels correlate with brain pathology in frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol*. 2009;118(5):647–58. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0594-0>.
- Feneberg E, Gray E, Ansoorge O, Talbot K, Turner MR. Towards a TDP-43-based biomarker for ALS and FTLT. *Mol Neurobiol*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0947-6>.
- Anderson GJ, C MC, Kennedy RT. Western blotting using capillary electrophoresis. *Anal Chem*. 2011;83(4):1350–5. <https://doi.org/10.1021/ac102671n>.
- Hughes AJ, Herr AE. Microfluidic Western blotting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(52):21450–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207754110>.
- Chen JQ, Wakefield LM, Goldstein DJ. Capillary nano-immunoassays: advancing quantitative proteomics analysis, biomarker assessment, and molecular diagnostics. *J Transl Med*. 2015;13:182. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0537-6>.
- Behari M, Shrivastava M. Role of platelets in neurodegenerative diseases: a universal pathophysiology. *Int J Neurosci*. 2013;123(5):287–99. <https://doi.org/10.3109/00207454.2012.751534>.
- Wood EM, Falcone D, Suh E, Irwin DJ, Chen-Plotkin AS, Lee EB, et al. Development and validation of pedigree classification criteria for frontotemporal lobar degeneration. *JAMA Neurol*. 2013;70(11):1411–7. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.3956>.
- Akimoto C, Volk AE, van Blitterswijk M, Van den Broeck M, Leblond CS, Lumbroso S, et al. A blinded international study on the reliability of genetic testing for GGGGCC-repeat expansions in C9orf72 reveals marked differences in results among 14 laboratories. *J Med Genet*. 2014;51(6):419–24. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102360>.
- Goossens J, Vanmechelen E, Trojanowski JQ, Lee VM, Van Broeckhoven C, van der Zee J, et al. TDP-43 as a possible biomarker for frontotemporal lobar degeneration: a systematic review of existing antibodies. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3:15. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0195-1>.
- Nelson GM, Guynn JM, Chorley BN. Procedure and key optimization strategies for an automated capillary electrophoretic-based immunoassay method. *J Vis Exp*. 2017;(127). <https://doi.org/10.3791/55911>.

26. Alegria-Schaffer A, Lodge A, Vattem K. Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods Enzymol.* 2009;463:573–99. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63033-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63033-0).
27. Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(6):1760–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>.
28. R&D systems a biotechne brand. Human/Mouse/Rat TDP-43/TARDBP Antibody - Monoclonal Mouse IgG2A Clone # 671834 - Catalog Number: MAB7778 - <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/mab7778.pdf>. Rev. 2/7/2018.
29. Steinacker P, Hendrich C, Sperfeld AD, Jesse S, von Arnim CA, Lehnert S, et al. TDP-43 in cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 2008;65(11):1481–7. <https://doi.org/10.1001/archneur.65.11.1481>.
30. Charette SJ, Lambert H, Nadeau PJ, Landry J. Protein quantification by chemiluminescent Western blotting: elimination of the antibody factor by dilution series and calibration curve. *J Immunol Methods.* 2010;353(1–2):148–50. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.12.007>.
31. Fourier A, Dorey A, Perret-Liaudet A, Quadrio I. Detection of CSF 14-3-3 protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients using a new automated capillary Western assay. *Mol Neurobiol.* 2017. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0607-2>.
32. Mattsson N, Andreasson U, Persson S, Carrillo MC, Collins S, Chalbot S, et al. CSF biomarker variability in the Alzheimer's Association quality control program. *Alzheimers Dement.* 2013;9(3):251–61. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.01.010>.
33. Bennion Callister J, Pickering-Brown SM. Pathogenesis/genetics of frontotemporal dementia and how it relates to ALS. *Exp Neurol.* 2014;262(Pt B):84–90. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.001>.



# Comparative diagnosis interest of NfL and pNfH in CSF and plasma in a context of FTD–ALS spectrum

Jean Escal<sup>1,2</sup> · Anthony Fourier<sup>1,2</sup>  · Maité Formaglio<sup>3,4</sup> · Luc Zimmer<sup>2</sup> · Emilien Bernard<sup>5,6</sup> · Hélène Mollion<sup>3,4</sup> · Muriel Bost<sup>1</sup> · Mathieu Herrmann<sup>7</sup> · Elisabeth Ollagnon-Roman<sup>8</sup> · Isabelle Quadrio<sup>1,2,4</sup> · Jean-Michel Dorey<sup>7,9</sup>

Received: 15 April 2021 / Revised: 9 July 2021 / Accepted: 11 July 2021  
  Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

## Abstract

**Objective** The ‘Frontotemporal dementia–Amyotrophic lateral sclerosis Spectrum’ (FAS) encompasses different phenotypes, including cognitive disorders (frontotemporal dementia, FTD) and/or motor impairments (amyotrophic lateral sclerosis, ALS). The aim of this study was to apprehend the specific uses of neurofilaments light chain (NfL) and phosphorylated neurofilaments heavy chain (pNfH) in a context of FAS.

**Methods** First, NfL and pNfH were measured in 39 paired cerebrospinal fluid (CSF) and plasma samples of FAS and primary psychiatric disorders (PPD) patients, considered as controls. Secondly, additional plasma samples were included to examine a larger cohort of 81 samples composed of symptomatic FAS and PPD patients, presymptomatic and non-carrier relatives individuals. The measures were performed using Simoa technology.

**Results** There was a positive correlation between CSF and plasma values for NfL ( $p < 0.0001$ ) and for pNfH ( $p = 0.0036$ ). NfL values were higher for all phenotypes of symptomatic FAS patients compared to PPD patients ( $p = 0.0016$  in CSF;  $p = 0.0003$  in plasma). On the contrary, pNfH values were solely increased in FAS patients exhibiting motor impairment. Unlike symptomatic FAS patients, presymptomatic cases had comparable concentrations with non-carrier individuals.

**Conclusion** NfL, but not pNfH, appeared to be useful in a context of differential diagnosis between FTD and psychiatric patients. Nevertheless, pNfH seem more specific for the diagnosis and follow-up of motor impairments. In each specific indication, measures in CSF and plasma will provide identical interpretations.

**Keywords** Frontotemporal lobar degeneration · Amyotrophic lateral sclerosis · NfL · pNfH · Blood biomarker

## Introduction

Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) is an umbrella term encompassing various neurodegenerative diseases involving frontal and/or temporal lobes of the brain. The

Isabelle Quadrio and Jean-Michel Dorey contributed equally.

✉ Anthony Fourier  
anthony.fourier@chu-lyon.fr

- 1 Laboratory of Neurobiology and Neurogenetics, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Lyon University Hospital, Bron, France
- 2 BIORAN Team, Lyon Neuroscience Research Center, CNRS UMR 5292, INSERM U1028, Lyon 1 University, Bron, France
- 3 Neurocognition and Neuro-Ophthalmology Department, Lyon University Hospital, Bron, France
- 4 Center for Memory Resources and Research, Lyon University Hospital, Lyon 1 University, Villeurbanne, France

- 5 Reference Center of ALS of Lyon, Lyon University Hospital, Lyon 1 University, Bron, France
- 6 NeuroMyoGène Institute, CNRS UMR 5310, INSERM U1217, Lyon 1 University, Lyon, France
- 7 Department of Aging Psychiatry, Hospital Le Vinatier, Bron, France
- 8 Department of Predictive Medicine of Neurological and Neurodegenerative Diseases, Lyon University Hospital, Lyon, France
- 9 Brain Dynamics and Cognition Team, Lyon Neuroscience Research Center, CNRS UMR 5292, INSERM U1028, Lyon, France

most common phenotype of FTLD, called behavioral variant of frontotemporal dementia (FTD) is characterized by progressive behavioral changes and executive dysfunctions [1]. A subset of patients additionally shows concomitant motor symptoms due to amyotrophic lateral sclerosis (ALS) that co-occurs, affecting motor neurons in the motor cortex and/or spinal cord [2]. Besides, since ALS and FTD share pathomechanisms, including common protein aggregates (e.g., TDP-43 and FUS) and genetic pathogenic mutations (e.g., *C9ORF72*, *TARDBP*, and *FUS*), these diseases can be considered as a continuum. In that respect, the ‘FTD–ALS spectrum’ (FAS) groups phenotypes of FTD and/or ALS [3]. The detection of known genetic pathogenic variants permits to classify FTD patients in the group of individuals with definite FTLD pathology [4]. Concerning ALS, when a family history of pathogenic mutation is observed, the diagnosis may be upgraded to clinically definite familial ALS [5]. Genetic analysis also provides a means of defining asymptomatic FAS relatives carrying pathogenic mutations as presymptomatic FAS (pre-FAS) and consequently offers a window to study the earliest FAS phases [6, 7]. Though, only approximately 30% of FTD patients have an autosomal dominant pattern of inheritance and 90–95% of ALS cases occur in people with no prior family history [8, 9]. Combined with a lack of specificity of clinical symptoms, it results in a challenging *ante mortem* diagnosis of FAS. Indeed, studies report that FTD is half of the time misdiagnosed as a primary psychiatric disorder (PPD) [10]. Conversely, PPD can be confused with FAS [11]. Moreover, about 10% of ALS ultimately turn out to be other diseases like multifocal motor neuropathy [12].

In this context, complementary markers to genetics are dramatically needed to facilitate the diagnosis and monitor the progression of FAS diseases. Among several promising candidates, neurofilaments seem particularly interesting. These intermediate filaments are selectively expressed by neurons and are localized in axons, where they may undergo post-translational modifications, including phosphorylation that is important for the interaction with each other and with other cytoskeletal proteins [13]. Neurofilaments are an essential component of neuronal cytoarchitecture in addition to participating in vital cellular functions like axonal transport or myelination [14]. Neuroaxonal damages result in the release of neurofilaments into cerebrospinal fluid (CSF) and then into blood, where they can be measured [15].

Within this family of proteins, neurofilaments light chain (NfL) and phosphorylated neurofilaments heavy chain (pNfH) are the two most studied markers in FAS. According to the literature, NfL are consistently elevated in CSF and blood of FAS patients relative to controls [16, 17]. Results are more ambiguous for pNfH, especially when individuals do not present motor impairment [18, 19]. It also appears that NfL and pNfH could increase just before the

phenoconversion of pre-FAS both in CSF and blood [20, 21].

Despite numerous publications available, further research is required to clarify practical indications for NfL and pNfH. Therefore, comparing both NfL and pNfH in CSF and blood in a single study, this work aimed at suggesting specific uses of these promising biomarkers in a context of FTD–ALS spectrum.

## Materials and methods

### Study participants

This retrospective study included symptomatic patients and asymptomatic cases. Symptomatic patients with cognitive disorders in the foreground were diagnosed with FTD or PPD at the Center for Memory Resources and Research of Lyon. They were assessed using a neurological clinical examination and a neuropsychological testing battery. Patients also underwent medical imaging and biological analyses. Thus, lumbar puncture and/or blood collection were performed as part of the diagnosis. Consensus diagnoses were made in multidisciplinary consultations according to the current international diagnostic criteria [4, 22, 23]. Patients with motor symptoms were diagnosed at the Reference Center of ALS of the Hospital of Lyon, where they were provided with clinical examination, medical imaging and biological tests, according to the revised El Escorial criteria [5].

Asymptomatic relatives to mutation carriers followed a multi-step protocol for genetic counseling, based on international recommendations established for the predictive genetic test for Huntington’s disease [24]. Finally, some were themselves carriers of a pathogenic mutation (pre-FAS) and others were not carriers (nc-FASR).

All subjects included in this study gave a written consent to save and use their biological fluids samples for research purposes. This study followed the Helsinki Declaration act of 1975 and was approved by the Lyon University Hospital ethics committee (No 19-42).

### Samples collection and neurofilaments’ analysis

Blood samples were collected in tubes with EDTA, rapidly centrifuged at 2000g for 15 min. CSF samples were obtained by lumbar puncture via standard procedures, collected in low binding polypropylene tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and rapidly centrifuged at 2000g for 10 min. After centrifugation, CSF and plasma samples were divided into aliquots and stored until analyses in deep freeze (–80 °C) in a biobank with authorization from the French Ministry of Health (Declaration number DC-2008-304).



Plasma and CSF values of NfL and pNfH were determined using the Simoa HD-1 analyzer (Quanterix, Lexington, USA) in a same batch, according to the manufacturer's protocols. The Simoa Neurology 4-plex and the PNF-HEAVY kits were used to measure NfL and pNfH, respectively.

## Study design

The study was structured in two steps. In a first step, only patients with paired plasma/CSF samples were included, to evaluate the correlation between the two biological fluids. Thus, NfL and pNfH values were measured in 39 symptomatic patients as follow: 29 FAS (12 familial FTD, 14 sporadic FTD, 1 ALS and 2 FTD-ALS) and 10 PPD patients (5 depressions and 5 bipolar disorders) considered

as controls (Table 1). The selection of 12 familial FTD patients included 9 *C9ORF72* expansions, 2 *GRN* variants and 1 *MAPT* variant.

In a second step, blood samples from patients who did not have lumbar puncture were added to the first cohort, to evaluate the diagnostic performances of both markers in plasma. In total, 42 additional plasma samples were added, leading to a second set of 81 samples as follow: 52 FAS (26 familial FTD, 16 sporadic FTD, 7 ALS and 3 FTD-ALS), 8 pre-FAS, 9 nc-FASR and 12 PPD patients (6 depressions, 5 bipolar disorders and 1 schizophrenia) (Table 2). Among the 26 familial FTD patients, there were 18 *C9ORF72* expansions, 6 *GRN* variants, 1 *MAPT* variant and 1 *TARDBP* variant. The selection of pre-FAS individuals included 6 *C9ORF72* expansions and 2 *GRN* variants.

**Table 1** Demographic characteristics of the paired CSF/plasma samples cohort, NfL and pNfH concentrations in CSF and plasma

	FTD-ALS spectrum ( <i>n</i> =29)	PPD ( <i>n</i> =10)	<i>p</i> value
Gender (male/female)	11/18	5/5	<i>p</i> =0.7311
Median age (years)	66.0	66.5	<i>p</i> =0.5208
CSF NfL (pg/mL)	2990.0 (1101.0–4360.0)	756.0 (606.0–1000.0)	<i>p</i> =0.0016
Plasma NfL (pg/mL)	46.0 (21.5–86.2)	14.1 (11.8–16.0)	<i>p</i> =0.0003
CSF pNfH (pg/mL)	246.5 (200.5–463.3)	270.0 <sup>a</sup> (227.8–360.0)	<i>p</i> =0.8908
Plasma pNfH (pg/mL)	56.0 <sup>a</sup> (20.1–104.5)	40.4 <sup>a</sup> (18.8–81.6)	<i>p</i> =0.8595

Concentrations are presented as median and interquartile range

ALS amyotrophic lateral sclerosis; CSF cerebrospinal fluid; FTD frontotemporal dementia; NfL neurofilaments light chain; pNfH phosphorylated neurofilaments heavy chain; PPD primary psychiatric disorders

<sup>a</sup>Data obtained with one fewer patient

**Table 2** Demographic characteristics of the complete cohort of patients, NfL and pNfH concentrations in plasma

	FTD-ALS spectrum ( <i>n</i> =52)			Pre-FAS ( <i>n</i> =8)	nc-FASR ( <i>n</i> =9)	PPD ( <i>n</i> =12)	<i>p</i> value
	ALS ( <i>n</i> =7)	FTD-ALS ( <i>n</i> =3)	FTD ( <i>n</i> =42)				
Gender (male/female)	1/6	1/2	19/23	3/5	4/5	6/6	0.7178
Median age (years)	59	72	62	40.5	52	66	0.0042
Median symptom duration at sampling (years)	0.5 (0.5–2.6)	1 (n/a)	3 (2–3.8)	–	–	4 (2–8.5)	0.0052
Plasma NfL (pg/mL)	84.4 (75.7–168.8)	108 (94.2–176.4)	46.8 (22.3–80)	10.1 (7.4–12.4)	9 (6.3–12.3)	13.6 (11.7–15.7)	<0.000001
Plasma pNfH (pg/mL)	579 (188–790.8)	82.2 (29.6–101.6)	30.5 <sup>a</sup> (11.6–87.4)	9.8 <sup>b</sup> (1.9–58.9)	5.5 <sup>b</sup> (2.4–39.6)	31.9 <sup>b</sup> (7.2–74.1)	0.0011

Concentrations are presented as median and interquartile range

<sup>a</sup>Data obtained with three fewer patients

<sup>b</sup>Data obtained with one fewer patient

ALS amyotrophic lateral sclerosis; FTD-ALS FTD coupled to ALS; CSF cerebrospinal fluid; FTD frontotemporal dementia; nc-FASR non-carrier FTD-ALS spectrum relatives; NfL neurofilaments light chain; pNfH phosphorylated neurofilaments heavy chain; pre-FAS presymptomatic FTD-ALS spectrum; PPD primary psychiatric disorders

## Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Medcalc software (v 15.11.4). Gender repartition was studied using the Chi-square test. Correlations between CSF and plasma values of NfL and pNfH were studied calculating the Spearman's correlation coefficient.

The non-parametric Mann–Whitney test was applied to test differences between two groups, while the Kruskal–Wallis test was applied for multiple group comparisons. ROC analyses were performed to establish the diagnostic performances of each marker. The optimal cutoff values of NfL in CSF and plasma in terms of sensitivity and specificity were determined by the Youden index.

## Results

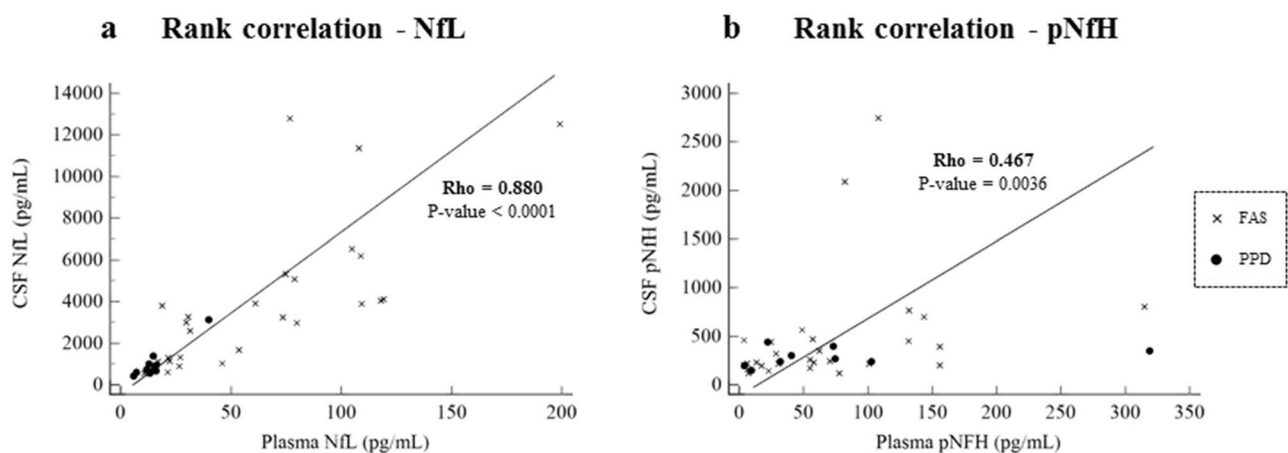
In the first step, analyzing the paired CSF/plasma samples, patients showed no significant difference regarding gender and age at biological fluids collection time (Table 1). NfL and pNfH values were found in higher concentrations in CSF than in plasma. There was a positive correlation between CSF and plasma values for the two analytes. Though, the correlation was stronger for NfL ( $Rho = 0.880$ ;  $p < 0.0001$ ) than for pNfH ( $Rho = 0.467$ ;  $p = 0.0036$ ) (Fig. 1). For both markers, correlations were stronger in patients exhibiting high NfL or pNfH values (mostly FAS patients) and were maintained when excluding outliers (data not shown).

NfL values were significantly higher in the 29 FAS patients compared with the 10 PPD patients in CSF ( $p = 0.0016$ ) and in plasma ( $p = 0.0003$ ) (Table 1). This increase was found regardless of the phenotype and the genetic status of the FAS patients in both matrices. To discriminate FAS from PPD patients, the optimal cutoff values

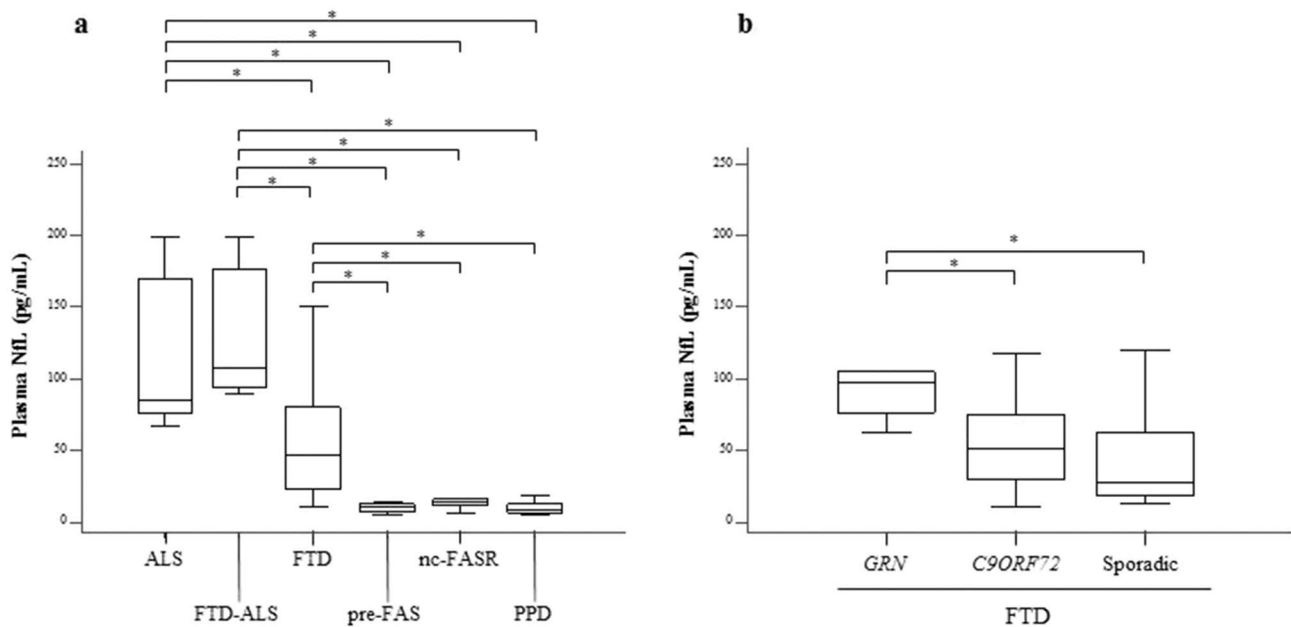
determined by the Youden index, were 1000 pg/mL in CSF (sensitivity = 79%; specificity = 80%) and 16 pg/mL in plasma (sensitivity = 86%; specificity = 90%) (Supplemental Fig. 1). In this sample set, NfL were not statistically different between sporadic and familial FTD patients, neither in CSF ( $p = 0.41$ ) nor in plasma ( $p = 0.78$ ). Conversely to NfL, pNfH values were not significantly different in the cohort of FAS patients compared with the PPD patients both in CSF ( $p = 0.8908$ ) and plasma ( $p = 0.8595$ ) (Table 1). However, pNfH values in CSF were higher in patients with motor impairment (ALS and FTD–ALS) in comparison to FTD patients ( $p = 0.0122$ ). In plasma, this difference was not retrieved ( $p = 0.3160$ ). In this sample set, pNfH values were not statistically different between sporadic and genetic FTD cases, neither in CSF ( $p = 0.57$ ) nor in plasma ( $p = 0.41$ ).

In the second step, analyzing the extended plasma samples cohort, subjects showed no significant difference regarding gender (Table 2). Symptomatic FAS and PPD patients did not show a significant difference regarding age at biological fluids collection time.

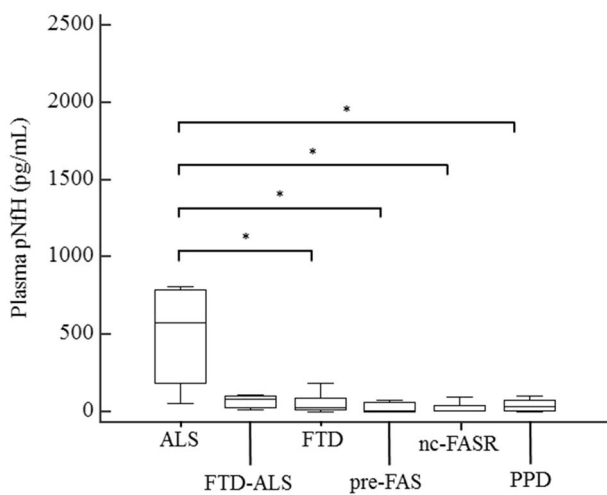
Neither did the asymptomatic pre-FAS nor nc-FAS cases, but both were significantly younger than the symptomatic subjects ( $p = 0.0042$ ). The 52 FAS patients had significantly higher plasma NfL values than the 12 PPD patients ( $p < 0.0001$ ). As previously described in the first step, this increase was found regardless of the phenotype and the genetic status of the FAS patients. In addition, the optimal cutoff value of 16 pg/mL in plasma, determined by the Youden index, was retrieved, with a sensitivity of 92% and a specificity of 92% for this larger cohort (Supplemental Fig. 2). More in detail, the highest values were observed for FAS patients with motor impairment. FTD patients exhibited increased values compared to pre-FAS, nc-FAS and PPD patients. These last three groups did not show significant difference of NfL values (Fig. 2A). In FTD patients, NfL



**Fig. 1** Rank correlations between CSF and plasma concentrations for **a** NfL and **b** pNfH in the paired CSF/plasma samples' cohort



**Fig. 2** Box-whisker plots for plasma NfL concentrations **a** in ALS, FTD-ALS, FTD, pre-FAS, nc-FASR and PPD and **b** among the FTD subgroup. \*  $p$  values < 0.05



**Fig. 3** Box-whisker plots for plasma pNfH concentrations in ALS, FTD-ALS, FTD, pre-FAS, nc-FASR and PPD. \*  $p$  values < 0.05

plasma values were significantly higher for patients with *GRN* variants compared to patients with *C9ORF72* and sporadic cases (Fig. 2B). Concerning pNfH, there was no significant difference concerning plasma pNfH values of FAS and PPD patients ( $p = 0.2978$ ). In the FAS group, only ALS patients had increased plasma pNfH values. Indeed, FTD patients exhibited identical values than pre-FAS, nc-FASR and PPD patients (Fig. 3). In this extended cohort, pNfH values in patients with motor impairment (ALS and FTD-ALS) were increased in comparison to FTD patients ( $p = 0.0019$ ).

Among FTD group, there was no difference of plasma pNfH values between patients with *GRN* and *C9ORF72* mutations, or between familial and sporadic patients.

## Discussion

In this retrospective study, NfL and pNfH were measured in CSF and/or plasma of FAS and PPD patients, pre-FAS and nc-FASR individuals with a highly sensitive single-molecule array technology.

NfL were increased for all FAS in CSF and plasma, regardless of their clinical manifestations, compared with PPD patients. This observed increase for all FAS phenotypes could be explained by the fact that NfL are non-specific markers of neuronal damages. Despite a relatively modest cohort of psychiatric patients, our optimal plasma NfL cutoff value of 16 pg/mL determined by the Youden index was consistent with the literature [25]. Indeed, Al-Shweiki et al. found close plasma NfL cutoff values comparing a larger psychiatric cohort to FTD patients with the same SIMOA technology. This allow us to consider that NfL can be helpful to perform a differential diagnosis between FTD and PPD patients, responding to a need of neurologists and psychiatrists in current medical practice [10, 11]. Within FTD patients, those with *GRN* variants had higher plasma NfL values than others, which was again in agreement with the literature [26]. Combined with the fact that FTD patients with *GRN* mutation have also more white matter lesions and

a faster rate of neurodegeneration, it suggests that different processes, dependent in part on genetics, are involved in the FTLD pathophysiology [27, 28].

No significant difference was observed for pNfH values in CSF and plasma between all FAS patients and PPD patients. In particular, FTD and PPD patients exhibited comparable pNfH values. Thus, contrary to NfL, pNfH could not discriminate between FTD and PPD patients, in accordance with other studies [29, 30]. Nevertheless, increased pNfH values were found in CSF of FAS with motor impairment compared to FTD. In plasma, the first sample set showed no difference between these two groups, contrary to the extended sample set. This discrepancy is probably due to the small size of the cohort of ALS patients in our first sample set, which was specifically designed for paired CSF and plasma samples. The results observed in the larger sample set are in line with other studies [31, 32]. On another note, it was also reported in the literature that the dosage of pNfH presents a better sensitivity and specificity for ALS than the dosage of NfL, and that there are greater changes in pNfH values than in NfL values throughout the ALS course [33, 34]. These observations combined with our results suggest that pNfH more than NfL might reliably support the diagnosis of ALS.

There was a strong correlation between CSF and plasma values for both NfL and pNfH markers. This finding suggests that plasma and not only CSF values are the reflection of pathological changes in the brain for NfL and pNfH, even if only a small fraction of brain proteins that cross the blood–brain barrier is finally measured in blood [15]. Such a correlation has already been reported in FTD–ALS spectrum, but was less described for PPD patients [29, 35]. The correlation between pNfH values in plasma and CSF was not as strong as that of NfL. One reason could be the sequestration of pNfH in hetero-aggregates in blood, but all the mechanisms responsible for the release and the degradation of neurofilaments are not yet fully understood [36, 37]. The correlations were probably strengthened by the use of a same assay kit, containing identical capture and detection antibodies, to assess CSF and plasma samples. Indeed, single-molecule array technology, offering the possibility to measure a wide range of concentrations, is suitable for both CSF and plasma.

Consequently, CSF and plasma can be considered as interchangeable matrices, their use depending on specific clinical indications. On the one hand, in a context of cognitive disorders, NfL could be measured in CSF if core Alzheimer's disease biomarkers are negative, to support the differential diagnosis between FTD and PPD. On the other hand, when patients exhibit strong behavioral disturbances rendering the lumbar puncture difficult to perform, measuring NfL from blood seems to be an interesting alternative. Moreover, plasma samples fit well with

longitudinal iterative studies of symptomatic patients, but also with the follow-up of presymptomatic individuals.

In our study, asymptomatic (pre-FAS and nc-FASR) individuals had lower NfL plasma values than FAS patients. Despite the higher median age of the latter, this difference in concentrations is only partly explained by the 2% per year increase in neurofilaments described in the general population [38]. Indeed, this slight physiological progression is largely surpassed by the disease effect. Moreover, NfL and pNfH plasma values were comparable between pre-FAS individuals and nc-FASR, considered as negative controls. In the literature, studies describing the kinetics of neurofilaments in CSF and/or plasma for presymptomatic FTD and/or ALS cases remain contradictory. Indeed, some authors reported no difference between presymptomatic carriers and controls for NfL in FTD [20] and for pNfH in ALS [39]. Nevertheless, Benatar et al. showed an increase of CSF and serum pNfH for converters compared to at-risk and control cases [21]. A possible reason for these different observations could be linked to the time of blood collection, in relation to the onset of symptomatology. At blood collection time, the neurological examination of the pre-FAS individuals included in our study did not show any clinical symptom. Pending more detailed international guidelines, it seems relevant to monitor disease onset in presymptomatic cases measuring both plasma NfL and pNfH [40].

To conclude, CSF and plasma appear to be interchangeable matrices for NfL and pNfH measurements. The use of one and other biological fluid would depend on specific clinical indications. Concerning neurofilaments' analysis, NfL appeared particularly useful for the differential diagnosis between FTD and behavioral impairment linked to psychiatric diseases. For their part, pNfH showed a weak sensitivity for cognitive symptoms but could be specifically used for the diagnosis and the follow-up of FAS patients with motor impairment. Thus, NfL and pNfH are non-commutable markers but both very promising for the diagnosis and the monitoring of the FTD–ALS spectrum.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00415-021-10714-3>.

**Funding** This work was supported by the hospital Le Vinatier (Bron, FRANCE) under Grant CSRL09 (NFL-COG study).

**Availability of data and material** Data related to this study, intended for reasonable use, are available from the corresponding author.

**Code availability** Not applicable.

## Declarations

**Conflicts of interest** The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

**Ethics approval** This study followed the Helsinki Declaration act of 1975, and was approved by the Lyon University Hospital ethics committee (No 19-42).

**Consent to participate** All the individuals included in this study gave a written consent to participate.

**Consent for publication** All the individuals included in this study signed informed consent regarding publishing their data.

## References

- Sivasathiseelan H, Marshall CR, Agustus JL, Benhamou E, Bond RL, Rohrer JD et al (2019) Frontotemporal dementia: a clinical review. *Semin Neurol* 39:251–263. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1683379>
- Brown RH, Al-Chalabi A (2017) Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 377:162–172. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1603471>
- De Silva D, Hsieh S, Caga J, Leslie FVC, Kiernan MC, Hodges JR et al (2016) Motor function and behaviour across the ALS-FTD spectrum. *Acta Neurol Scand* 133:367–372. <https://doi.org/10.1111/ane.12471>
- Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J et al (2011) Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain* 134:2456–2477. <https://doi.org/10.1093/brain/awr179>
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL (2000) El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuromuscul Disord* 1:293–299. <https://doi.org/10.1080/146608200300079536>
- Benatar M, Turner MR, Wu J (2019) Defining pre-symptomatic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener* 20:303–309. <https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1587634>
- Chen Q, Kantarci K (2020) Imaging biomarkers for neurodegeneration in presymptomatic familial frontotemporal lobar degeneration. *Front Neurol*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00080>
- Heuer HW, Wang P, Rascovsky K, Wolf A, Appleby B, Bove J et al (2020) Comparison of sporadic and familial behavioral variant frontotemporal dementia (FTD) in a North American cohort. *Alzheimer's Dement* 16:60–70. <https://doi.org/10.1002/alz.12046>
- Mejzini R, Flynn LL, Pitout IL, Fletcher S, Wilton SD, Akkari A (2019) ALS genetics, mechanisms, and therapeutics: where are we now? *Front Neurosci* 13:1310. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01310>
- Woolley JD, Khan BK, Murthy NK, Miller BL, Rankin KP (2011) The diagnostic challenge of psychiatric symptoms in neurodegenerative disease: rates of and risk factors for prior psychiatric diagnosis in patients with early neurodegenerative disease. *J Clin Psychiatry* 72:126–133. <https://doi.org/10.4088/JCP.10m06382oli>
- Shinagawa S, Catindig JA, Block NR, Miller BL, Rankin KP (2016) When a little knowledge can be dangerous: false-positive diagnosis of behavioral variant frontotemporal dementia among community clinicians. *Dement Geriatr Cogn Disord* 41:99–108. <https://doi.org/10.1159/000438454>
- Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O (2000) Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes: a population-based study. *Arch Neurol* 57:109–113. <https://doi.org/10.1001/archneur.57.1.109>
- Shea TB, Chan WK-H (2008) Regulation of neurofilament dynamics by phosphorylation. *Eur J Neurosci* 27:1893–1901. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06165.x>
- Yuan A, Rao MV, Nixon RA (2017) Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018309>
- Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gatteringer T et al (2018) Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol* 14:577–589. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0058-z>
- Rosengren LE, Karlsson JE, Karlsson JO, Persson LI, Wikkelsø C (1996) Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. *J Neurochem* 67:2013–2018. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67052013.x>
- Palermo G, Mazzucchi S, Della Vecchia A, Siciliano G, Bonucelli U, Azuar C et al (2020) Different clinical contexts of use of blood neurofilament light chain protein in the spectrum of neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 57:4667–4691. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02035-9>
- Ganesalingam J, An J, Shaw CE, Shaw G, Lacomis D, Bowser R (2011) Combination of neurofilament heavy chain and complement C3 as CSF biomarkers for ALS. *J Neurochem* 117:528–537. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07224.x>
- Gordon BA (2020) Neurofilaments in disease: what do we know? *Curr Opin Neurobiol* 61:105–115. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.02.001>
- Meeter LH, Dopfer EG, Jiskoot LC, Sanchez-Valle R, Graff C, Benussi L et al (2016) Neurofilament light chain: a biomarker for genetic frontotemporal dementia. *Ann Clin Transl Neurol* 3:623–636. <https://doi.org/10.1002/acn3.325>
- Benatar M, Wu J, Lombardi V, Jeromin A, Bowser R, Andersen PM et al (2019) Neurofilaments in pre-symptomatic ALS and the impact of genotype. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener* 20:538–548. <https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1646769>
- Strong MJ, Abrahams S, Goldstein LH, Woolley S, McLaughlin P, Snowden J et al (2017) Amyotrophic lateral sclerosis–frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD): revised diagnostic criteria. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener* 18:153–174. <https://doi.org/10.1080/21678421.2016.1267768>
- American Psychiatric Association (2015) Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th edn. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- MacLeod R, Tibben A, Frontali M, Evers-Kiebooms G, Jones A, Martinez-Descales A et al (2013) Recommendations for the predictive genetic test in Huntington's disease. *Clin Genet* 83:221–231. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2012.01900.x>
- Al Shweiki MR, Steinacker P, Oeckl P, Hengerer B, Danek A, Fassbender K et al (2019) Neurofilament light chain as a blood biomarker to differentiate psychiatric disorders from behavioural variant frontotemporal dementia. *J Psychiatr Res* 113:137–140. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.03.019>
- Goossens J, Bjerke M, Van Mossevelde S, Van den Bossche T, Goeman J, De Vil B et al (2018) Diagnostic value of cerebrospinal fluid tau, neurofilament, and progranulin in definite frontotemporal lobar degeneration. *Alzheimer's Res Therapy* 10:31. <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0364-0>
- Caroppo P, Le Ber I, Camuzat A, Clot F, Naccache L, Lamari F et al (2014) Extensive white matter involvement in patients with frontotemporal lobar degeneration: think progranulin. *JAMA Neurol* 71:1562–1566. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.1316>
- Whitwell JL, Boeve BF, Weigand SD, Senjem ML, Gunter JL, Baker MC et al (2015) Brain atrophy over time in genetic and sporadic frontotemporal dementia: a study of 198 serial magnetic resonance images. *Eur J Neurol* 22:745–752. <https://doi.org/10.1111/ene.12675>
- Wilke C, Pujol-Calderón F, Barro C, Stransky E, Blennow K, Michalak Z et al (2019) Correlations between serum and CSF pNfH levels in ALS, FTD and controls: a comparison of three

- analytical approaches. *Clin Chem Lab Med* 57:1556–1564. <https://doi.org/10.1515/ccclm-2019-0015>
30. Pijnenburg YA, Janssen JC, Schoonenboom NS, Petzold A, Mulder C, Stigbrand T et al (2007) CSF neurofilaments in frontotemporal dementia compared with early onset Alzheimer's disease and controls. *Dement Geriatr Cogn Disord* 23:225–230. <https://doi.org/10.1159/000099473>
  31. Gendron TF, Daugherty LM, Heckman MG, Diehl NN, Wu J, Miller TM et al (2017) Phosphorylated neurofilament heavy chain: a biomarker of survival for C9ORF 72-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 82:139–146. <https://doi.org/10.1002/ana.24980>
  32. De Schaepdryver M, Jeromin A, Gille B, Claeys KG, Herbst V, Brix B et al (2018) Comparison of elevated phosphorylated neurofilament heavy chains in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 89:367–373. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-316605>
  33. Li D, Shen D, Tai H, Cui L (2016) Neurofilaments in CSF as diagnostic biomarkers in motor neuron disease: a meta-analysis. *Front Aging Neurosci* 8:290. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00290>
  34. Poesen K, Van Damme P (2019) Diagnostic and prognostic performance of neurofilaments in ALS. *Front Neurol* 9:1167. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.01167>
  35. Wilke C, Preische O, Deuschle C, Roeben B, Apel A, Barro C et al (2016) Neurofilament light chain in FTD is elevated not only in cerebrospinal fluid, but also in serum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87:1270–1272. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2015-312972>
  36. Adiutori R, Aarum J, Zubiri I, Bremang M, Jung S, Sheer D et al (2018) The proteome of neurofilament-containing protein aggregates in blood. *Biochem Biophys Rep* 14:168–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.04.010>
  37. Gafson AR, Durham HD, Julien JP, Kuhle J, Leppert D, Nixon RA et al (2020) Neurofilaments: neurobiological foundations for biomarker applications. *Brain* 143:1975–1998. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa098>
  38. Barro C, Benkert P, Disanto G, Tsagkas C, Amann M, Naegelin Y et al (2018) Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain* 141:2382–2391. <https://doi.org/10.1093/brain/awy154>
  39. Weydt P, Oeckl P, Huss A, Müller K, Volk AE, Kuhle J et al (2016) Neurofilament levels as biomarkers in asymptomatic and symptomatic familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 79:152–158. <https://doi.org/10.1002/ana.24552>
  40. Zucchi E, Bonetto V, Sorarù G, Martinelli I, Parchi P, Liguori R et al (2020) Neurofilaments in motor neuron disorders: towards promising diagnostic and prognostic biomarkers. *Mol Neurodegeneration* 15:58. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00406-3>

## Bibliographie

1. Andrianopoulos V, Gloeckl R, Vogiatzis I, Kenn K. Cognitive impairment in COPD: should cognitive evaluation be part of respiratory assessment? *Breathe*. 2017;13(1):e1–9.
2. American psychiatric association. DSM-5. Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux. Issy-les Moulineaux:Elsevier Masson;2015.1176 pages.
3. Ganguli M, Blacker D, Blazer DG, Grant I, Jeste DV, Paulsen JS, et al. Classification of Neurocognitive Disorders in DSM-5: A Work in Progress. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2011;19(3):205–10.
4. Bang J, Spina S, Miller BL. Frontotemporal dementia. *Lancet*. 2015;24;386(10004):1672-82.
5. Kvello-Alme M, Bra G. The Prevalence and Subtypes of Young Onset Dementia in Central Norway: A Population-Based Study. *J Alzheimer's Dis*. 2019;69:479–87.
6. Merrilees J. The Impact of Dementia on Family Caregivers: What Is Research Teaching Us? *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2016;16(10).
7. Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina M. World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. Alzheimer's Disease International. 2015. 92 pages.
8. Patterson C. World Alzheimer Report 2018, The state of the art of dementia research: New frontiers. Alzheimer's Disease International. 2018. 48 pages.
9. Rizzi L, Rosset I, Roriz-Cruz M. Global Epidemiology of Dementia: Alzheimer's and Vascular Types. *BioMed Res Int*. 2014;2014:1- 8.
10. Ferri CP, West R, Moriyama TS, Acosta D, Guerra M, Huang Y, et al. Tobacco use and dementia: evidence from the 1066 dementia population-based surveys in Latin America, China and India. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2011; 26: 1177–85.
11. Prince MJ, Ebrahim S, Acosta D, Ferri CP, Guerra M, Huang Y, et al. Hypertension prevalence, awareness, treatment and control among older people in Latin America, India and China: a 10/66 cross-sectional population-based survey. *J Hypertens*.2012;30(1):177-87.
12. Salas A, Acosta D, Ferri CP, Guerra M, Huang Y, Jacob KS, et al. The Prevalence, Correlates, Detection and Control of Diabetes among Older People in Low and Middle Income Countries. A 10/66 Dementia Research Group Population-Based Survey. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149616.
13. Langa KM. Is the risk of Alzheimer's disease and dementia declining? *Alzheimers Res Ther*. 2015;7(1):34.

14. Wu Y-T, Beiser AS, Breteler MMB, Fratiglioni L, Helmer C, Hendrie HC, et al. The changing prevalence and incidence of dementia over time — current evidence. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(6):327–39.
15. Schoeni RF, Freedman VA, Langa KM. Introduction to a Supplement on Population Level Trends in Dementia: Causes, Disparities, and Projections. *J Gerontol Ser B*. 2018;73(suppl\_1):S1–9.
16. Zissimopoulos JM, Tysinger BC, Clair PAS, Crimmins EM. The Impact of Changes in Population Health and Mortality on Future Prevalence of Alzheimer’s Disease and Other Dementias in the United States. *J Gerontol*. 2018;73:10.
17. Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, Schoonderwaldt HC, Riemenschneider M, Deyn PPD, et al. Improved discrimination of AD patients using -amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology*. 1999;52(8):1555.
18. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer’s disease: revising the NINCDS–ADRDA criteria. *Lancet Neurol*. 2007;6(8):734–46.
19. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc*. 2011;7(3):263–9.
20. Mattsson N. CSF Biomarkers and Incipient Alzheimer Disease in Patients With Mild Cognitive Impairment. *JAMA*. 2009;302(4):385.
21. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement*. 2018;14(4):535–62.
22. Rabinovici GD, Miller BL. Frontotemporal Lobar Degeneration: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis and Management. *CNS Drugs*. 2010; 24(5): 375–98.
23. Luukkainen L, Bloigu R, Moilanen V, Remes AM. Epidemiology of Frontotemporal Lobar Degeneration in Northern Finland. *Dement Geriatr Cogn Disord Extra*. 2015;5(3):435–41.
24. Onyike CU, Diehl-Schmid J. The Epidemiology of Frontotemporal Dementia. *Int Rev Psychiatry*. 2013;25(2): 130–7.
25. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain*. 2011;134(9):2456–77.
26. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*. 2011;76(11):1006–14.
27. Piguet O, Hodges JR. Behavioural-variant frontotemporal dementia: An update. *Dement Neuropsychol*. 2013;7(1):10–8.



28. Boutoleau-Brettonniere C, Lebouvier T, Verdelletto M. Frontal variant of frontotemporal dementia. *Gériatrie Psychol Neuropsychiatr Viellissement*. 2014;12(1):63–73.
29. Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges JR. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology*. 2002 ;58 :1615–21
30. Park HK, Park KH, Yoon B, Lee J-H, Choi SH, Joung JH, et al. Clinical characteristics of parkinsonism in frontotemporal dementia according to subtypes. *J Neurol Sci*. 2017;372:51–6.
31. Carnemolla SE, Hsieh JW, Sipione R, Landis BN, Kumfor F, Piguet O, et al. Olfactory dysfunction in frontotemporal dementia and psychiatric disorders: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2020;118:588–611.
32. Johnen A, Bertoux M. Psychological and Cognitive Markers of Behavioral Variant Frontotemporal Dementia—A Clinical Neuropsychologist’s View on Diagnostic Criteria and Beyond. *Front Neurol*. 2019;10:594.
33. Ruksenaite J, Volkmer A, Jiang J, Johnson JC, Marshall CR, Warren JD, et al. Primary Progressive Aphasia: Toward a Pathophysiological Synthesis. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2021;21(3):7.
34. Mesulam MM. Slowly progressive aphasia without generalized dementia. *Ann Neurol*. 1982;11(6):592–8.
35. Mesulam MM. Primary progressive aphasia. *Ann Neurol*. 2001;49(4):425–32.
36. Hodges JR, Patterson K, Oxbury S, Funnell E. SEMANTIC DEMENTIA: PROGRESSIVE FLUENT APHASIA WITH TEMPORAL LOBE ATROPHY. *Brain*. 1992;115(6):1783–806.
37. Gorno-Tempini ML, Dronkers NF, Rankin KP, Ogar JM, Phengrasamy L, Rosen HJ, et al. Cognition and Anatomy in Three Variants of Primary Progressive Aphasia. *Ann Neurol*. 2004;55(3):335–46.
38. Bonakdarpour B. Neuroimaging in Primary Progressive Aphasia. *Perspect Neurophysiol Neurogenic Speech Lang Disord*. 2014;24(4):145–56.
39. Rabinovici GD, Jagust WJ, Furst AJ, Ogar JM, Racine CA, Mormino EC, et al. A $\beta$  amyloid and glucose metabolism in three variants of primary progressive aphasia. *Ann Neurol*. 2008;64(4):388–401.
40. Mesulam M, Wicklund A, Johnson N, Rogalski E, Léger GC, Rademaker A, et al. Alzheimer and Frontotemporal Pathology in Subsets of Primary Progressive Aphasia. *Ann Neurol*. 2008;63(6):709–19.
41. Woollacott IOC, Rohrer JD. The clinical spectrum of sporadic and familial forms of frontotemporal dementia. *J Neurochem*. 2016;138(S1):6–31.
42. Murley AG, Coyle-Gilchrist I, Rouse MA, Jones PS, Li W, Wiggins J, et al. Redefining the multidimensional clinical phenotypes of frontotemporal lobar degeneration syndromes. *Brain*. 2020;143(5):1555–71.

43. Irwin DJ, Cairns NJ, Grossman M, McMillan CT, Lee EB, Deerlin VMV. Frontotemporal Lobar Degeneration: Defining Phenotypic Diversity Through Personalized Medicine. *Acta Neuropathol.* 2015;129(4): 469–491.
44. Gowland A, Opie-Martin S, Scott KM, Jones AR, Mehta PR, Batts CJ, et al. Predicting the future of ALS: the impact of demographic change and potential new treatments on the prevalence of ALS in the United Kingdom, 2020–2116. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener.* 2019;20(3–4):264–74.
45. Talbott EO, Malek AM, Lacomis D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. Elsevier; 2016.138:225–38.
46. Aksoy YA, Deng W, Stoddart J, Chung R, Guillemin G, Cole NJ, et al. “STRESSED OUT”: The role of FUS and TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2020;126:105821.
47. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2000;1(5):293–9.
48. Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;377(2):162–72.
49. Takeda T. Possible concurrence of TDP-43, tau and other proteins in amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration: TDP-43 and coexistent proteins in ALS/FTLD. *Neuropathology.* 2018;38(1):72–81.
50. De Silva D, Hsieh S, Caga J, Leslie FVC, Kiernan MC, Hodges JR, et al. Motor function and behaviour across the ALS-FTD spectrum. *Acta Neurol Scand.* 2016;133(5):367–72.
51. Levin J, Kurz A, Arzberger T, Giese A, Höglinger GU. The Differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism. *Dtsch Aertzblatt.* 2016;113: 61–9
52. Rebeiz JJ, Kolodny EH, Richardson EP Jr. Corticodentatonigral degeneration with neuronal achromasia. *Arch Neurol.* 1968;18(1):20–33
53. Riley DE, Lange AE, Lewis A, et al. Cortico-basal ganglionic degeneration. *Neurology* 1990;40:1203–12
54. Rinne JO, Lee MS, Thompson PD, Marsden CD. Corticobasal degeneration. A clinical study of 36 cases. *Brain.* 1994;117(5):1183–96
55. Bak TH, Hodges JR. Corticobasal degeneration: clinical aspects. *Handb Clin Neurol.* 2008;89:509-21.
56. Brion S, Jedynak CP. Disorders of interhemispheric transfer (callosal disconnection). 3 cases of tumor of the corpus callosum. The strange hand sign. *Rev Neurol.* 1972;126:257–66
57. Felician O, Koric L, Rochefort N. La dégénérescence corticobasale : aspects cliniques et neuropsychologiques. *Psychol NeuroPsychiatr Vieil.* 2016;7(2):10.

58. Litvan I, Agid Y, Calne D, Campbell G, Dubois B, Duvoisin RC, et al. Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): Report of the NINDS-SPSP International Workshop. *Neurology*. 1996 Jul;47(1):1–9.
59. Levy R. Progressive supranuclear palsy: what's new? *Gériatrie Psychol Neuropsychiatr Viellissement*. 2011 May;9(2):191–201.
60. Respondek G, Stamelou M, Kurz C, Ferguson LW, Rajput A, Chiu WZ, et al. The phenotypic spectrum of progressive supranuclear palsy: A retrospective multicenter study of 100 definite cases: PSP Diagnostic Criteria. *Mov Disord*. 2014 Dec;29(14):1758–66.
61. Tsuboi Y, Josephs KA, Boeve BF, Litvan I, Caselli RJ, Caviness JN, et al. Increased tau burden in the cortices of progressive supranuclear palsy presenting with corticobasal syndrome. *Mov Disord*. 2005 Aug;20(8):982–8.
62. Kaat LD, Boon AJW, Kamphorst W, Ravid R, Duivenvoorden HJ, van Swieten JC. Frontal presentation in progressive supranuclear palsy. *Neurology*. 2007 Aug 21;69(8):723–9.
63. Josephs KA. Clinicopathological and imaging correlates of progressive aphasia and apraxia of speech. *Brain*. 2006 Apr 13;129(6):1385–98.
64. Armstrong MJ, Litvan I, Lang AE, Bak TH, Bhatia KP, Borroni B, et al. Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration. *Neurology*. 2013 Jan 29;80(5):496–503.
65. Kovacs G. Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *Int J Mol Sci*. 2016 Feb 2;17(2):189.
66. Bayer TA. Proteinopathies, a core concept for understanding and ultimately treating degenerative disorders? *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015 May;25(5):713–24.
67. Guo JL, Lee VMY. Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat Med*. 2014 Feb;20(2):130–8.
68. Van Mossevelde S, van der Zee J, Gijssels I, Engelborghs S, Sieben A, Van Langenhove T, et al. Clinical features of *TBKI* carriers compared with *C9orf72*, *GRN* and non-mutation carriers in a Belgian cohort. *Brain*. 2016 Feb;139(2):452–67.
69. Pollock NJ, Mirra Suzanne, Kretschmer V, Kaffarnik H. ACQUIFILAMENTOUS AGGREGATES IN PICK'S DISEASE, PROGRESSIVE SUPRANUCLEAR PALSY, AND ALZHEIMER'S DISEASE SHARE ANTIGENIC DETERMINANTS WITH MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN, TAU. *The Lancet*. 1986 Nov;328(8517):1211–2.
70. Ratti A, Buratti E. Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *J Neurochem*. 2016 Aug;138:95–111.
71. Prasad A, Bharathi V, Sivalingam V, Girdhar A, Patel BK. Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:25.

72. Foulds PG, Davidson Y, Mishra M, Hobson DJ, Humphreys KM, Taylor M, et al. Plasma phosphorylated-TDP-43 protein levels correlate with brain pathology in frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2009 Nov;118(5):647–58.
73. Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Velde CV, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2008 May;40(5):572–4.
74. Buratti E. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front Biosci*. 2008;13(13):867.
75. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*. 2006 Oct 6;314(5796):130–3.
76. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Dec;351(3):602–11.
77. Mackenzie IRA, Neumann M, Baborie A, Sampathu DM, Du Plessis D, Jaros E, et al. A harmonized classification system for FTLTDP pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2011 Jul;122(1):111–3.
78. Mackenzie IRA, Baborie A, Pickering-Brown S, Plessis DD, Jaros E, Perry RH, et al. Heterogeneity of ubiquitin pathology in frontotemporal lobar degeneration: classification and relation to clinical phenotype. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2006 Nov;112(5):539–49.
79. Sampathu DM, Neumann M, Kwong LK, Chou TT, Micsenyi M, Truax A, et al. Pathological Heterogeneity of Frontotemporal Lobar Degeneration with Ubiquitin-Positive Inclusions Delineated by Ubiquitin Immunohistochemistry and Novel Monoclonal Antibodies. *Am J Pathol*. 2006 Oct;169(4):1343–52.
80. Mackenzie IR, Neumann M. Reappraisal of TDP-43 pathology in FTLTDP subtypes. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2017 Jul;134(1):79–96.
81. Josephs KA, Hodges JR, Snowden JS, Mackenzie IR, Neumann M, Mann DM, et al. Neuropathological background of phenotypical variability in frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2011 Aug;122(2):137–53.
82. Perry DC, Brown JA, Possin KL, Datta S, Trujillo A, Radke A, et al. Clinicopathological correlations in behavioural variant frontotemporal dementia. *Brain*. 2017 Dec 1;140(12):3329–45.
83. Mackenzie IR, Neumann M. Subcortical TDP-43 pathology patterns validate cortical FTLTDP subtypes and demonstrate unique aspects of C9orf72 mutation cases. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2020 Jan;139(1):83–98.
84. Alafuzoff I, Pikkarainen M, Neumann M, Arzberger T, Al-Sarraj S, Bodi I, et al. Neuropathological assessments of the pathology in frontotemporal lobar degeneration with TDP43-positive inclusions: an inter-laboratory study by the BrainNet Europe consortium. *J Neural Transm*. 2015 Jul;122(7):957–72.

85. Lee EB, Porta S, Michael Baer G, Xu Y, Suh E, Kwong LK, et al. Expansion of the classification of FTL-D-TDP: distinct pathology associated with rapidly progressive frontotemporal degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2017 Jul;134(1):65–78.
86. Tan RH, Guennewig B, Dobson-Stone C, Kwok JBJ, Kril JJ, Kiernan MC, et al. The underacknowledged PPA-ALS: A unique clinicopathologic subtype with strong heritability. *Neurology*. 2019 Mar 19;92(12):e1354–66.
87. Clark CN, Quaegebeur A, Nirmalananthan N, MacKinnon AD, Revesz T, Holton JL, et al. Foix–Chavany–Marie syndrome due to type E TDP43 pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2020 Apr;46(3):292–5.
88. Al-Obeidi E, Al-Tahan S, Surampalli A, Goyal N, Wang AK, Hermann A, et al. Genotype-phenotype study in patients with valosin-containing protein mutations associated with multisystem proteinopathy: AL-OBEIDI ET AL. *Clin Genet*. 2018 Jan;93(1):119–25.
89. Furukawa Y, Suzuki Y, Fukuoka M, Nagasawa K, Nakagome K, Shimizu H, et al. A molecular mechanism realizing sequence-specific recognition of nucleic acids by TDP-43. *Sci Rep*. 2016 Aug;6:20576.
90. Lukavsky PJ, Daujotyte D, Tollervey JR, Ule J, Stuani C, Buratti E, et al. Molecular basis of UG-rich RNA recognition by the human splicing factor TDP-43. *Nat Struct Mol Biol*. 2013 Dec;20(12):1443–9.
91. Zacco E, Martin SR, Thorogate R, Pastore A. The RNA-Recognition Motifs of TAR DNA-Binding Protein 43 May Play a Role in the Aberrant Self-Assembly of the Protein. *Front Mol Neurosci*. 2018 Oct 9;11:372.
92. Buratti E, Baralle FE. TDP-43: gumming up neurons through protein–protein and protein–RNA interactions. *Trends Biochem Sci*. 2012 Jun;37(6):237–47.
93. Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, Liang TY, et al. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci*. 2011 Apr;14(4):459–68.
94. Xiao S, Sanelli T, Dib S, Sheps D, Findlater J, Bilbao J, et al. RNA targets of TDP-43 identified by UV-CLIP are deregulated in ALS. *Mol Cell Neurosci*. 2011 Jul;47(3):167–80.
95. Pinarbasi ES, Cağatay T, Fung HYJ, Li YC, Chook YM, Thomas PJ. Active nuclear import and passive nuclear export are the primary determinants of TDP-43 localization. *Sci Rep*. 2018 Dec;8(1):7083.
96. Cushman M, Johnson BS, King OD, Gitler AD, Shorter J. Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity. *J Cell Sci*. 2010 Apr 15;123(8):1191–201.
97. Tziortzouda P, Van Den Bosch L, Hirth F. Triad of TDP43 control in neurodegeneration: autoregulation, localization and aggregation. *Nat Rev Neurosci*. 2021 Apr;22(4):197–208.
98. Jiang L-L, Zhao J, Yin X-F, He W-T, Yang H, Che M-X, et al. Two mutations G335D and Q343R within the amyloidogenic core region of TDP-43 influence its aggregation and inclusion formation. *Sci Rep*. 2016 Jul;6(1):23928.

99. Schmidt HB, Barreau A, Rohatgi R. Phase separation-deficient TDP43 remains functional in splicing. *Nat Commun.* 2019 Dec;10(1):4890.
100. Babu MM. The contribution of intrinsically disordered regions to protein function, cellular complexity, and human disease. *Biochem Soc Trans.* 2016 Oct 15;44(5):1185–200.
101. Lee EB, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2012 Jan;13(1):38–50.
102. Ou SH, Wu F, Harrich D, García-Martínez LF, Gaynor RB. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J Virol.* 1995 Jun;69(6):3584–96.
103. Afroz T, Hock E-M, Ernst P, Foglieni C, Jambeau M, Gilhespy LAB, et al. Functional and dynamic polymerization of the ALS-linked protein TDP-43 antagonizes its pathologic aggregation. *Nat Commun.* 2017 Dec;8(1):45.
104. La Cognata V, Gentile G, Aronica E, Cavallaro S. Splicing Players Are Differently Expressed in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Molecular Clusters and Brain Regions. *Cells.* 2020 Jan 8;9(1):159.
105. Buratti E. Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J.* 2001 Apr 2;20(7):1774–84.
106. Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, et al. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci.* 2011 Apr;14(4):452–8.
107. Prudencio M, Jansen-West KR, Lee WC, Gendron TF, Zhang Y-J, Xu Y-F, et al. Misregulation of human sortilin splicing leads to the generation of a nonfunctional progranulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Dec 26;109(52):21510–5.
108. Van Damme P, Van Hoecke A, Lambrechts D, Vanacker P, Bogaert E, van Swieten J, et al. Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *J Cell Biol.* 2008 Apr 7;181(1):37–41.
109. Ayala YM, De Conti L, Avendaño-Vázquez SE, Dhir A, Romano M, D’Ambrogio A, et al. TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J.* 2011 Jan 19;30(2):277–88.
110. Koyama A, Sugai A, Kato T, Ishihara T, Shiga A, Toyoshima Y, et al. Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jul 8;44(12):5820–36.
111. Avendano-Vazquez SE, Dhir A, Bembich S, Buratti E, Proudfoot N, Baralle FE. Autoregulation of TDP-43 mRNA levels involves interplay between transcription, splicing, and alternative polyA site selection. *Genes Dev.* 2012 Aug 1;26(15):1679–84.
112. Volkening K, Leystra-Lantz C, Yang W, Jaffee H, Strong MJ. Tar DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43), 14-3-3 proteins and copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) interact to modulate NFL mRNA stability. Implications for altered RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Brain Res.* 2009 Dec;1305:168–82.

113. Ederle H, Dormann D. TDP-43 and FUS *en route* from the nucleus to the cytoplasm. *FEBS Lett.* 2017 Jun;591(11):1489–507.
114. Carmody SR, Wentz SR. mRNA nuclear export at a glance. *J Cell Sci.* 2009 Jun 15;122(12):1933–7.
115. Berson A, Goodman LD, Sartoris AN, Otte CG, Aykit JA, Lee VM-Y, et al. *Drosophila* Ref1/ALYREF regulates transcription and toxicity associated with ALS/FTD disease etiologies. *Acta Neuropathol Commun.* 2019 Apr 29;7:65.
116. Ederle H, Funk C, Abou-Ajram C, Hutten S, Funk EBE, Kehlenbach RH, et al. Nuclear egress of TDP-43 and FUS occurs independently of Exportin-1/CRM1. *Sci Rep.* 2018 Dec;8(1):7084.
117. Prpar Mihevc S, Darovic S, Kovanda A, Bajc Česnik A, Župunski V, Rogelj B. Nuclear trafficking in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Brain.* 2017 Jan;140(1):13–26.
118. Archbold HC, Jackson KL, Arora A, Weskamp K, Tank EM-H, Li X, et al. TDP43 nuclear export and neurodegeneration in models of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Sci Rep.* 2018 Dec;8(1):4606.
119. Marfori M, Mynott A, Ellis JJ, Mehdi AM, Neil F, Saunders W et al. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization *Molecular Cell Research.* 2011;1813(9):1562–77
120. Nishimura AL, Župunski V, Troakes C, Kathe C, Fratta P, Howell M, et al. Nuclear import impairment causes cytoplasmic trans-activation response DNA-binding protein accumulation and is associated with frontotemporal lobar degeneration. *Brain.* 2010 Jun;133(6):1763–71.
121. Freibaum BD, Chitta RK, High AA, Taylor JP. Global Analysis of TDP-43 Interacting Proteins Reveals Strong Association with RNA Splicing and Translation Machinery. *J Proteome Res.* 2010 Feb 5;9(2):1104–20.
122. Coyne AN, Siddegowda BB, Estes PS, Johannesmeyer J, Kovalik T, Daniel SG, et al. Futsch/MAP1B mRNA Is a Translational Target of TDP-43 and Is Neuroprotective in a *Drosophila* Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurosci.* 2014 Nov 26;34(48):15962–74.
123. Majumder P, Chen Y-T, Bose JK, Wu C-C, Cheng W-C, Cheng S-J, et al. TDP-43 regulates the mammalian spinogenesis through translational repression of Rac1. *Acta Neuropathol (Berl).* 2012 Aug;124(2):231–45.
124. Fallini C, Bassell GJ, Rossoll W. The ALS disease protein TDP-43 is actively transported in motor neuron axons and regulates axon outgrowth. *Hum Mol Genet.* 2012 Aug 15;21(16):3703–18.
125. Alami NH, Smith RB, Carrasco MA, Williams LA, Winborn CS, Han SSW, et al. Axonal Transport of TDP-43 mRNA Granules Is Impaired by ALS-Causing Mutations. *Neuron.* 2014 Feb;81(3):536–43.

126. Narayanan RK, Mangelsdorf M, Panwar A, Butler TJ, Noakes PG, Wallace RH. Identification of RNA bound to the TDP-43 ribonucleoprotein complex in the adult mouse brain. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2013 May;14(4):252–60.
127. Livneh I, Cohen-Kaplan V, Cohen-Rosenzweig C, Avni N, Ciechanover A. The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res*. 2016 Aug;26(8):869–85.
128. de Boer EMJ, Orié VK, Williams T, Baker MR, De Oliveira HM, Polvikoski T, et al. TDP-43 proteinopathies: a new wave of neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2021 Jan;92(1):86–95.
129. Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Apr;14(4):248–64.
130. Solomon DA, Stepto A, Au WH, Adachi Y, Diaper DC, Hall R, et al. A feedback loop between dipeptide-repeat protein, TDP-43 and karyopherin- $\alpha$  mediates C9orf72-related neurodegeneration. *Brain*. 2018 Oct;141(10):2908–24.
131. Kawakami I, Arai T, Hasegawa M. The basis of clinicopathological heterogeneity in TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2019;138(5):751–70.
132. Schmid B, Hruscha A, Höggl S, Banzhaf-Strathmann J, Strecker K, van der Zee J, et al. Loss of ALS-associated TDP-43 in zebrafish causes muscle degeneration, vascular dysfunction, and reduced motor neuron axon outgrowth. *Proc Natl Acad Sci*. 2013 Mar 26;110(13):4986–91.
133. Dayton RD, Gitcho MA, Orchard EA, Wilson JD, Wang DB, Cain CD, et al. Selective Forelimb Impairment in Rats Expressing a Pathological TDP-43 25 kDa C-terminal Fragment to Mimic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Ther*. 2013 Jul;21(7):1324–34.
134. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Tajiri M, Ohkubo T, Ono F, et al. Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain*. 2012 Mar;135(3):833–46.
135. Barmada SJ, Serio A, Arjun A, Bilican B, Daub A, Ando DM, et al. Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models. *Nat Chem Biol*. 2014 Aug;10(8):677–85.
136. Cicardi ME, Cristofani R, Rusmini P, Meroni M, Ferrari V, Vezzoli G, et al. Tdp-25 Routing to Autophagy and Proteasome Ameliorates its Aggregation in Amyotrophic Lateral Sclerosis Target Cells. *Sci Rep*. 2018 Dec;8(1):12390.
137. Zhang K, Donnelly CJ, Haeusler AR, Grima JC, Machamer JB, Steinwald P, et al. The C9ORF72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature*. 2015 Sep 3;525(7567):56–61.
138. Freibaum BD, Lu Y, Lopez-Gonzalez R, Kim NC, Almeida S, Lee K-H, et al. GGGGCC repeat expansion in C9ORF72 compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature*. 2015 Sep 3;525(7567):129–33.



139. Boeynaems S, Bogaert E, Michiels E, Gijssels I, Sieben A, Jovičić A, et al. *Drosophila* screen connects nuclear transport genes to DPR pathology in c9ALS/FTD. *Sci Rep*. 2016 Aug;6(1):20877.
140. Barmada SJ, Skibinski G, Korb E, Rao EJ, Wu JY, Finkbeiner S. Cytoplasmic Mislocalization of TDP-43 Is Toxic to Neurons and Enhanced by a Mutation Associated with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurosci*. 2010 Jan 13;30(2):639–49.
141. Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Disturbance of Nuclear and Cytoplasmic TAR DNA-binding Protein (TDP-43) Induces Disease-like Redistribution, Sequestration, and Aggregate Formation. *J Biol Chem*. 2008 May 9;283(19):13302–9.
142. Walker AK, Spiller KJ, Ge G, Zheng A, Xu Y, Zhou M, et al. Functional recovery in new mouse models of ALS/FTLD after clearance of pathological cytoplasmic TDP-43. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2015 Nov;130(5):643–60.
143. Watanabe S, Oiwa K, Murata Y, Komine O, Sobue A, Endo F, et al. ALS-linked TDP-43M337V knock-in mice exhibit splicing deregulation without neurodegeneration. *Mol Brain*. 2020 Dec;13(1):8.
144. Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Kataoka A, Hatsuta H, Atsuta N, et al. Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. *EMBO Mol Med*. 2013 Feb;5(2):221–34.
145. Kuo P-H, Doudeva LG, Wang Y-T, Shen C-KJ, Yuan HS. Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan 21;37(6):1799–808.
146. Chen H-J, Topp SD, Hui HS, Zacco E, Katarya M, McLoughlin C, et al. RRM adjacent TARDBP mutations disrupt RNA binding and enhance TDP-43 proteinopathy. *Brain*. 2019 Dec 1;142(12):3753–70.
147. Gitcho MA, Bigio EH, Mishra M, Johnson N, Weintraub S, Mesulam M, et al. TARDBP 3'-UTR variant in autopsy-confirmed frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2009 Nov;118(5):633–45.
148. Lee SM, Asress S, Hales CM, Gearing M, Vizcarra JC, Fournier CN, et al. TDP-43 cytoplasmic inclusion formation is disrupted in C9orf72-associated amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration. *Brain Commun*. 2019 Jan 1;1(1):fz014.
149. Dormann D, Haass C. TDP-43 and FUS: a nuclear affair. *Trends Neurosci*. 2011 Jul;34(7):339–48.
150. White MA, Kim E, Duffy A, Adalbert R, Phillips BU, Peters OM, et al. TDP-43 gains function due to perturbed autoregulation in a Tardbp knock-in mouse model of ALS-FTD. *Nat Neurosci*. 2018 Apr;21(4):552–63.
151. Xu Y-F, Gendron TF, Zhang Y-J, Lin W-L, D'Alton S, Sheng H, et al. Wild-Type Human TDP-43 Expression Causes TDP-43 Phosphorylation, Mitochondrial Aggregation, Motor Deficits, and Early Mortality in Transgenic Mice. *J Neurosci*. 2010 Aug 11;30(32):10851–9.

152. Igaz LM, Kwong LK, Lee EB, Chen-Plotkin A, Swanson E, Unger T, et al. Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *J Clin Invest*. 2011 Feb 1;121(2):726–38.
153. Wang W, Wang L, Lu J, Siedlak SL, Fujioka H, Liang J, et al. The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. *Nat Med*. 2016 Aug;22(8):869–78.
154. Russo A, Scardigli R, La Regina F, Murray ME, Romano N, Dickson DW, et al. Increased cytoplasmic TDP-43 reduces global protein synthesis by interacting with RACK1 on polyribosomes. *Hum Mol Genet*. 2017 Apr 15;26(8):1407–18.
155. Buratti E. TDP-43 post-translational modifications in health and disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2018 Mar 4;22(3):279–93.
156. Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. TDP-43: a novel neurodegenerative proteinopathy. *Curr Opin Neurobiol*. 2007 Oct;17(5):548–55.
157. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2008 Jul;64(1):60–70.
158. Goossens J, Vanmechelen E, Trojanowski JQ, Lee VM, Van Broeckhoven C, van der Zee J, et al. TDP-43 as a possible biomarker for frontotemporal lobar degeneration: a systematic review of existing antibodies. *Acta Neuropathol Commun*. 2015 Dec;3(1):15.
159. Inukai Y, Nonaka T, Arai T, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, et al. Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTL-D and ALS. *FEBS Lett*. 2008 Aug 20;582(19):2899–904.
160. Neumann M, Kwong LK, Lee EB, Kremmer E, Flatley A, Xu Y, et al. Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2009 Feb;117(2):137–49.
161. Pelletier S, Gingras S, Howell S, Vogel P, Ihle JN. An Early Onset Progressive Motor Neuron Disorder in Scyl1-Deficient Mice Is Associated with Mislocalization of TDP-43. *J Neurosci*. 2012 Nov 21;32(47):16560–73.
162. Yamashita T, Teramoto S, Kwak S. Phosphorylated TDP-43 becomes resistant to cleavage by calpain: A regulatory role for phosphorylation in TDP-43 pathology of ALS/FTLD. *Neurosci Res*. 2016 Jun;107:63–9.
163. Kametani F, Obi T, Shishido T, Akatsu H, Murayama S, Saito Y, et al. Mass spectrometric analysis of accumulated TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis brains. *Sci Rep*. 2016 Sep;6(1):23281.
164. Li H-Y, Yeh P-A, Chiu H-C, Tang C-Y, Tu BP. Hyperphosphorylation as a Defense Mechanism to Reduce TDP-43 Aggregation. Ginsberg SD, editor. *PLoS ONE*. 2011 Aug 5;6(8):e23075.

165. Brady OA, Meng P, Zheng Y, Mao Y, Hu F. Regulation of TDP-43 aggregation by phosphorylation and p62/SQSTM1: Regulation of TDP-43 aggregation by phosphorylation and p62. *J Neurochem.* 2011 Jan;116(2):248–59.
166. Dammer EB, Fallini C, Gozal YM, Duong DM, Rossoll W, Xu P, et al. Coaggregation of RNA-Binding Proteins in a Model of TDP-43 Proteinopathy with Selective RGG Motif Methylation and a Role for RRM1 Ubiquitination. Iijima KM, editor. *PLoS ONE.* 2012 Jun 21;7(6):e38658.
167. Kim W, Bennett EJ, Huttlin EL, Guo A, Li J, Possemato A, et al. Systematic and Quantitative Assessment of the Ubiquitin-Modified Proteome. *Mol Cell.* 2011 Oct;44(2):325–40.
168. Hans F, Eckert M, von Zweydford F, Gloeckner CJ, Kahle PJ. Identification and characterization of ubiquitylation sites in TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). *J Biol Chem.* 2018 Oct;293(41):16083–99.
169. Cohen TJ, Hwang AW, Restrepo CR, Yuan C-X, Trojanowski JQ, Lee VMY. An acetylation switch controls TDP-43 function and aggregation propensity. *Nat Commun.* 2015 May;6(1):5845.
170. Cohen TJ, Hwang AW, Unger T, Trojanowski JQ, Lee VMY. Redox signalling directly regulates TDP-43 via cysteine oxidation and disulphide cross-linking: Oxidative stress regulates TDP-43. *EMBO J.* 2012 Mar 7;31(5):1241–52.
171. Cairns NJ, Neumann M, Bigio EH, Holm IE, Troost D, Hatanpaa KJ, et al. TDP-43 in Familial and Sporadic Frontotemporal Lobar Degeneration with Ubiquitin Inclusions. *Am J Pathol.* 2007 Jul;171(1):227–40.
172. Igaz LM, Kwong LK, Xu Y, Truax AC, Uryu K, Neumann M, et al. Enrichment of C-Terminal Fragments in TAR DNA-Binding Protein-43 Cytoplasmic Inclusions in Brain but not in Spinal Cord of Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Am J Pathol.* 2008 Jul;173(1):182–94.
173. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Tamaoka A, Yamashita M, Kametani F, et al. Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci.* 2011 Nov;45(3):480–5.
174. Xiao S, Sanelli T, Chiang H, Sun Y, Chakrabartty A, Keith J, et al. Low molecular weight species of TDP-43 generated by abnormal splicing form inclusions in amyotrophic lateral sclerosis and result in motor neuron death. *Acta Neuropathol (Berl).* 2015 Jul;130(1):49–61.
175. Sugai A, Kato T, Koyama A, Koike Y, Konno T, Ishihara T, et al. Non-genetically modified models exhibit TARDBP mRNA increase due to perturbed TDP-43 autoregulation. *Neurobiol Dis.* 2019 Oct;130:104534.
176. Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet.* 2009 Sep 15;18(18):3353–64.

177. Dormann D, Capell A, Carlson AM, Shankaran SS, Rodde R, Neumann M, et al. Proteolytic processing of TAR DNA binding protein-43 by caspases produces C-terminal fragments with disease defining properties independent of progranulin. *J Neurochem*. 2009 Aug;110(3):1082–94.
178. Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Takano J, Iwata N, et al. A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology. *Nat Commun*. 2012 Jan;3(1):1307.
179. Nishimoto Y, Ito D, Yagi T, Nihei Y, Tsunoda Y, Suzuki N. Characterization of Alternative Isoforms and Inclusion Body of the TAR DNA-binding Protein-43. *J Biol Chem*. 2010 Jan;285(1):608–19.
180. Berning BA, Walker AK. The Pathobiology of TDP-43 C-Terminal Fragments in ALS and FTL. *Front Neurosci*. 2019 Apr 11;13:335.
181. Saini A, Chauhan VS. Delineation of the Core Aggregation Sequences of TDP-43 C-Terminal Fragment. *ChemBioChem*. 2011 Nov 4;12(16):2495–501.
182. Budini M, Buratti E, Stuani C, Guarnaccia C, Romano V, De Conti L, et al. Cellular Model of TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) Aggregation Based on Its C-terminal Gln/Asn-rich Region. *J Biol Chem*. 2012 Mar 2;287(10):7512–25.
183. D’Alton S, Altshuler M, Lewis J. Studies of alternative isoforms provide insight into TDP-43 autoregulation and pathogenesis. *RNA*. 2015 Aug;21(8):1419–32.
184. Rudnick ND, Griffey CJ, Guarnieri P, Gerbino V, Wang X, Piersaint JA, et al. Distinct roles for motor neuron autophagy early and late in the SOD1G93A mouse model of ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Sep 26;114(39):E8294–303.
185. van Eersel J, Ke YD, Gladbach A, Bi M, Götz J, Kril JJ, et al. Cytoplasmic Accumulation and Aggregation of TDP-43 upon Proteasome Inhibition in Cultured Neurons. *PLoS ONE*. 2011 Jul 29;6(7):e22850.
186. Johnson BS, McCaffery JM, Lindquist S, Gitler AD. A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 29;105(17):6439–44.
187. Sun C-S, Wang CY-H, Chen BP-W, He R-Y, Liu GC-H, Wang C-H, et al. The Influence of Pathological Mutations and Proline Substitutions in TDP-43 Glycine-Rich Peptides on Its Amyloid Properties and Cellular Toxicity. *PLoS ONE*. 2014 Aug 4;9(8):e103644.
188. Chang Z, Deng J, Zhao W, Yang J. Amyloid-like aggregation and fibril core determination of TDP-43 C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Nov;532(4):655–61.
189. Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, et al. Atomic structures of amyloid cross- $\beta$  spines reveal varied steric zippers. *Nature*. 2007 May;447(7143):453–7.

190. Kim HJ, Kim NC, Wang Y-D, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, et al. Prion-like domain mutations in hnRNPs cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*. 2013 Mar 28;495(7442):467–73.
191. Guenther EL, Cao Q, Trinh H, Lu J, Sawaya MR, Cascio D, et al. Atomic Structures of Segments from TDP-43 LCD and insight into Reversible and Pathogenic Aggregation. *Nat Struct Mol Biol*. 2018 Jun;25(6):463–71.
192. Cao Q, Boyer DR, Sawaya MR, Ge P, Eisenberg DS. Cryo-EM Structures of Four Polymorphic TDP-43 Amyloid Cores. *Nat Struct Mol Biol*. 2019 Jul;26(7):619–27.
193. Conicella AE, Zerze GH, Mittal J, Fawzi NL. ALS mutations disrupt phase separation mediated by  $\alpha$ -helical structure in the TDP-43 low complexity C-terminal domain. *Struct Lond Engl 1993*. 2016 Sep 6;24(9):1537–49.
194. Babinchak WM, Haider R, Dumm BK, Sarkar P, Surewicz K, Choi J-K, et al. The role of liquid–liquid phase separation in aggregation of the TDP-43 low-complexity domain. *J Biol Chem*. 2019 Apr 19;294(16):6306–17.
195. Harrison AF, Shorter J. RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease. *Biochem J*. 2017 Apr 15;474(8):1417–38.
196. French RL, Grese ZR, Aligireddy H, Dhavale DD, Reeb AN, Kedia N, et al. Detection of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) oligomers as initial intermediate species during aggregate formation. *J Biol Chem*. 2019 Apr 26;294(17):6696–709.
197. Wang A, Conicella AE, Schmidt HB, Martin EW, Rhoads SN, Reeb AN, et al. A single N-terminal phosphomimic disrupts TDP-43 polymerization, phase separation, and RNA splicing. *EMBO J*. 2018 Mar 1;37(5):e97452.
198. Conicella AE, Dignon GL, Zerze GH, Schmidt HB, D’Ordine AM, Kim YC, et al. TDP-43  $\alpha$ -helical structure tunes liquid–liquid phase separation and function. *Proc Natl Acad Sci*. 2020 Mar 17;117(11):5883–94.
199. Bolognesi B, Faure AJ, Seuma M, Schmiedel JM, Tartaglia GG, Lehner B. The mutational landscape of a prion-like domain. *Nat Commun*. 2019 Sep 13;10:4162.
200. Mann JR, Gleixner AM, Mauna JC, Gomes E, DeChellis-Marks MR, Needham PG, et al. RNA binding antagonizes neurotoxic phase transitions of TDP-43. *Neuron*. 2019 Apr 17;102(2):321–338.e8.
201. Guo L, Kim HJ, Wang H, Monaghan J, Freyermuth F, Sung JC, et al. Nuclear-import receptors reverse aberrant phase transitions of RNA-binding proteins with prion-like domains. *Cell*. 2018 Apr 19;173(3):677–692.e20.
202. Gasset-Rosa F, Lu S, Yu H, Chen C, Melamed Z, Guo L, et al. Cytoplasmic TDP-43 de-mixing independent of stress granules drives inhibition of nuclear import, loss of nuclear TDP-43, and cell death. *Neuron*. 2019 Apr 17;102(2):339–57.e7.
203. Shodai A, Morimura T, Ido A, Uchida T, Ayaki T, Takahashi R, et al. Aberrant Assembly of RNA Recognition Motif 1 Links to Pathogenic Conversion of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43). *J Biol Chem*. 2013 May 24;288(21):14886–905.

204. McGurk L, Gomes E, Guo L, Mojsilovic-Petrovic J, Tran V, Kalb RG, et al. Poly(ADP-Ribose) Prevents Pathological Phase Separation of TDP-43 by Promoting Liquid Demixing and Stress Granule Localization. *Mol Cell*. 2018 Sep;71(5):703-17
205. Molliex A, Temirov J, Lee J, Coughlin M, Kanagaraj AP, Kim HJ, et al. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell*. 2015 Sep 24;163(1):123-33.
206. Fang Y-S, Tsai K-J, Chang Y-J, Kao P, Woods R, Kuo P-H, et al. Full-length TDP-43 forms toxic amyloid oligomers that are present in frontotemporal lobar dementia-TDP patients. *Nat Commun*. 2014 Dec;5(1):4824.
207. Mutihac R, Alegre-Abarrategui J, Gordon D, Farrimond L, Yamasaki-Mann M, Talbot K, et al. TARDBP pathogenic mutations increase cytoplasmic translocation of TDP-43 and cause reduction of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> signaling in motor neurons. *Neurobiol Dis*. 2015 Mar;75:64-77.
208. Woerner AC, Frotin F, Hornburg D, Feng LR, Meissner F, Patra M, et al. Cytoplasmic protein aggregates interfere with nucleocytoplasmic transport of protein and RNA. *Science*. 2016 Jan 8;351(6269):173-6.
209. Chou C-C, Zhang Y, Umoh ME, Vaughan SW, Lorenzini I, Liu F, et al. TDP-43 pathology disrupts nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic transport in ALS/FTD. *Nat Neurosci*. 2018 Feb;21(2):228-39.
210. Lee K-H, Zhang P, Kim HJ, Mitrea D, Sarkar M, Freibaum B, et al. C9orf72 dipeptide repeats impair the assembly, dynamics and function of membrane-less organelles. *Cell*. 2016 Oct 20;167(3):774-788.e17.
211. Cragnez L, Klima R, Skoko N, Budini M, Feiguin F, Baralle FE. Aggregate formation prevents dTDP-43 neurotoxicity in the *Drosophila melanogaster* eye. *Neurobiol Dis*. 2014 Nov;71:74-80.
212. Bevan-Jones WR, Cope TE, Jones PS, Kaalund SS, Passamonti L, Allinson K, et al. Neuroinflammation and protein aggregation co-localize across the frontotemporal dementia spectrum. *Brain*. 2020 Mar;143(3):1010-26.
213. Aulas A, Vande Velde C. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Front Cell Neurosci*. 2015 Oct 23;9:423.
214. Monahan Z, Shewmaker F, Pandey UB. Stress granules at the intersection of autophagy and ALS. *Brain Res*. 2016 Oct;1649:189-200.
215. Bentmann E, Neumann M, Tahirovic S, Rodde R, Dormann D, Haass C. Requirements for Stress Granule Recruitment of Fused in Sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43). *J Biol Chem*. 2012 Jun;287(27):23079-94.
216. Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang Y-J, Vanderwyde T, Citro A, Mehta T, et al. Tar DNA Binding Protein-43 (TDP-43) Associates with Stress Granules: Analysis of Cultured Cells and Pathological Brain Tissue. *PLoS ONE*. 2010 Oct 11;5(10):e13250.

217. Zhang P, Fan B, Yang P, Temirov J, Messing J, Kim HJ, et al. Chronic optogenetic induction of stress granules is cytotoxic and reveals the evolution of ALS-FTD pathology. *eLife*. 2019 Mar 20;8:e39578.
218. Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, Buratti E, et al. TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J Neurochem*. 2009 Nov;111(4):1051–61.
219. Brettschneider J, Del Tredici K, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci*. 2015 Feb;16(2):109–20.
220. Feneberg E, Gray E, Ansorge O, Talbot K, Turner MR. Towards a TDP-43-Based Biomarker for ALS and FTL. *Mol Neurobiol*. 2018 Oct;55(10):7789–801.
221. Feiler MS, Strobel B, Freischmidt A, Helferich AM, Kappel J, Brewer BM, et al. TDP-43 is intercellularly transmitted across axon terminals. *J Cell Biol*. 2015 Nov 23;211(4):897–911.
222. Iguchi Y, Eid L, Parent M, Soucy G, Bareil C, Riku Y, et al. Exosome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43. *Brain*. 2016 Dec;139(12):3187–201.
223. Ding X, Ma M, Teng J, Teng RKF, Zhou S, Yin J, et al. Exposure to ALS-FTD-CSF generates TDP-43 aggregates in glioblastoma cells through exosomes and TNTs-like structure. *Oncotarget*. 2015 Sep 15;6(27):24178–91.
224. Svahn AJ, Don EK, Badrock AP, Cole NJ, Graeber MB, Yerbury JJ, et al. Nucleocytoplasmic transport of TDP-43 studied in real time: impaired microglia function leads to axonal spreading of TDP-43 in degenerating motor neurons. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2018 Sep;136(3):445–59.
225. Porta S, Xu Y, Restrepo CR, Kwong LK, Zhang B, Brown HJ, et al. Patient-derived frontotemporal lobar degeneration brain extracts induce formation and spreading of TDP-43 pathology in vivo. *Nat Commun*. 2018 Oct 11;9:4220.
226. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, et al. Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. *Cell Rep*. 2013 Jul;4(1):124–34.
227. Aguzzi A, Heikenwalder M, Polymenidou M. Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jul;8(7):552–61.
228. Laferrière F, Maniecka Z, Pérez-Berlanga M, Hruska-Plochan M, Gilhespy L, Hock E-M, et al. TDP-43 extracted from frontotemporal lobar degeneration subject brains displays distinct aggregate assemblies and neurotoxic effects reflecting disease progression rates. *Nat Neurosci*. 2019 Jan;22(1):65–77.
229. Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, et al. Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain*. 2012 Nov;135(11):3380–91.

230. Haass C, Neumann M. Frontotemporal dementia: from molecular mechanisms to therapy. *J Neurochem*. 2016 Aug;138:3–5.
231. Neumann M, Mackenzie IRA. Review: Neuropathology of non-tau frontotemporal lobar degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2019 Feb;45(1):19–40.
232. LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC, Zinkowski RP, Binder LI. Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 1995 Oct 24;92(22):10369–73.
233. Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*. 1992 Oct;3(10):1141–54.
234. Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur ELF. Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau. *Science*. 2008 Feb 22;319(5866):1086–9.
235. Sultan A, Nessler F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, et al. Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *J Biol Chem*. 2011 Feb 11;286(6):4566–75.
236. Kimura T, Whitcomb DJ, Jo J, Regan P, Piers T, Heo S, et al. Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2014 Jan 5;369(1633):20130144.
237. Derouesné C. From Arnold Pick’s original descriptions to frontotemporal dementia: the present enlightened by the past An historical approach. *Gériatrie Psychol Neuropsychiatr Viellissement*. 2014 Mar;12(1):74–84.
238. Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev*. 2000;36.
239. Gu J, Chen F, Iqbal K, Gong C-X, Wang X, Liu F. Transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates alternative splicing of tau exon 10: Implications for the pathogenesis of tauopathies. *J Biol Chem*. 2017 Jun 23;292(25):10600–12.
240. Sergeant N, Delacourte A, Buée L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2005 Jan;1739(2–3):179–97.
241. Morris M, Knudsen GM, Maeda S, Trinidad JC, Ioanoviciu A, Burlingame AL, et al. Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci*. 2015 Aug;18(8):1183–9.
242. Mietelska-Porowska A, Wasik U, Goras M, Filipek A, Niewiadomska G. Tau Protein Modifications and Interactions: Their Role in Function and Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2014 Mar 18;15(3):4671–713.
243. Dar KB, Bhat AH, Amin S, Reshi BA, Zargar MA, Masood A, et al. Elucidating Critical Proteinopathic Mechanisms and Potential Drug Targets in Neurodegeneration. *Cell Mol Neurobiol*. 2020 Apr;40(3):313–45.



244. Chesser AS, Pritchard SM, Johnson GVW. Tau Clearance Mechanisms and Their Possible Role in the Pathogenesis of Alzheimer Disease. *Front Neurol.* 2013 Sep 3;4:122
245. Iqbal K, del C. Alonso A, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong C-X, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2005 Jan;1739(2–3):198–210.
246. Kwiatkowski TJ, Bosco DA, LeClerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science.* 2009 Feb 27;323(5918):1205–8.
247. Neumann M, Bentmann E, Dormann D, Jawaid A, DeJesus-Hernandez M, Ansorge O, et al. FET proteins TAF15 and EWS are selective markers that distinguish FTLD with FUS pathology from amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations. *Brain.* 2011 Sep;134(9):2595–609.
248. Deng H, Gao K, Jankovic J. The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol.* 2014 Jun;10(6):337–48.
249. Dormann D, Madl T, Valori CF, Bentmann E, Tahirovic S, Abou-Ajram C, et al. Arginine methylation next to the PY-NLS modulates Transportin binding and nuclear import of FUS. *EMBO J.* 2012 Nov 14;31(22):4258–75.
250. Rhoads S, Monahan Z, Yee D, Shewmaker F. The Role of Post-Translational Modifications on Prion-Like Aggregation and Liquid-Phase Separation of FUS. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 16;19(3):886.
251. Neumann M, Rademakers R, Roeber S, Baker M, Kretschmar HA, Mackenzie IRA. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain.* 2009 Nov 1;132(11):2922–31.
252. Van Langenhove T, van der Zee J, Slegers K, Engelborghs S, Vandenberghe R, Gijssels I, et al. Genetic contribution of FUS to frontotemporal lobar degeneration. *Neurology.* 2010 Feb 2;74(5):366–71.
253. Broustal O, Camuzat A, Guillot-Noel L, Guy N, Millecamps S, Deffond D, et al. FUS Mutations in Frontotemporal Lobar Degeneration with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Alzheimers Dis.* 2010;22(3):765–9.
254. Ducharme S, Dols A, Laforce R, Devenney E, Kumfor F. Recommendations to distinguish behavioural variant frontotemporal dementia from psychiatric disorders. *Brain.* 2020 Jun 1;143(6):1632–50.
255. Woolley JD, Khan BK, Murthy NK, Miller BL, Rankin KP. The Diagnostic Challenge of Psychiatric Symptoms in Neurodegenerative Disease: Rates of and Risk Factors for Prior Psychiatric Diagnosis in Patients With Early Neurodegenerative Disease. *J Clin Psychiatry.* 2011 Feb 15;72(02):126–33.
256. Wong S, Strudwick J, Devenney E, Hodges JR, Piguet O, Kumfor F. Frontal variant of Alzheimer's disease masquerading as behavioural-variant frontotemporal dementia: a case study comparison. *Neurocase.* 2019 Mar 4;25(1–2):48–58.

257. Noufi P, Khoury R, Jeyakumar S, Grossberg GT. Use of Cholinesterase Inhibitors in Non-Alzheimer's Dementias. *Drugs Aging*. 2019 Aug;36(8):719–31.
258. McShane R, Westby MJ, Roberts E, Minakaran N, Schneider L, Farrimond LE, et al. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Mar 20;3(3):CD003154.
259. Cummings J. Lessons Learned from Alzheimer Disease: Clinical Trials with Negative Outcomes: Lessons Learned from Alzheimer Disease. *Clin Transl Sci*. 2018 Mar;11(2):147–52.
260. Pottier C, Ravenscroft TA, Sanchez-Contreras M, Rademakers R. Genetics of FTL: overview and what else we can expect from genetic studies. *J Neurochem*. 2016 Aug;138:32–53.
261. Le Ber I. Genetics of frontotemporal lobar degeneration: An up-date and diagnosis algorithm. *Rev Neurol (Paris)*. 2013 Oct;169(10):811–9.
262. Lashley T, Rohrer JD, Mead S, Revesz T. Review: An update on clinical, genetic and pathological aspects of frontotemporal lobar degenerations: Frontotemporal lobar degeneration, a review. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015 Dec;41(7):858–81.
263. Ferrari R, Manzoni C, Hardy J. Genetics and molecular mechanisms of frontotemporal lobar degeneration: an update and future avenues. *Neurobiol Aging*. 2019 Jun;78:98–110.
264. Bang J, Spina S, Miller BL. Frontotemporal dementia. *The Lancet*. 2015 Oct;386(10004):1672–82.
265. Beel S, Herdewyn S, Fazal R, De Decker M, Moisse M, Robberecht W, et al. Progranulin reduces insoluble TDP-43 levels, slows down axonal degeneration and prolongs survival in mutant TDP-43 mice. *Mol Neurodegener*. 2018 Dec;13(1):55.
266. Chang MC, Srinivasan K, Friedman BA, Suto E, Modrusan Z, Lee WP, et al. Progranulin deficiency causes impairment of autophagy and TDP-43 accumulation. *J Exp Med*. 2017 Sep 4;214(9):2611–28.
267. Evers BM, Rodriguez-Navas C, Tesla RJ, Prange-Kiel J, Wasser CR, Yoo KS et al. Lipidomic and Transcriptomic Basis of Lysosomal Dysfunction in Progranulin Deficiency. *Cell Rep*. 2017 Sep 12;20(11):2565-74.
268. Gendron TF, Petrucelli L. Disease Mechanisms of C9ORF72 Repeat Expansions. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Apr 2;8(4):a024224.
269. Ciura S, Lattante S, Le Ber I, Latouche M, Tostivint H, Brice A, et al. Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2013 Aug;74(2):180–7.
270. Farg MA, Sundaramoorthy V, Sultana JM, Yang S, Atkinson RAK, Levina V, et al. C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet*. 2014 Jul 1;23(13):3579–95.

271. Proudfoot M, Gutowski NJ, Edbauer D, Hilton DA, Stephens M, Rankin J, et al. Early dipeptide repeat pathology in a frontotemporal dementia kindred with C9ORF72 mutation and intellectual disability. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2014 Mar;127(3):451–8.
272. Rademakers R, Neumann M, Mackenzie IR. Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurol*. 2012 Aug;8(8):423–34.
273. Rossi G, Tagliavini F. Frontotemporal lobar degeneration: old knowledge and new insight into the pathogenetic mechanisms of tau mutations. *Front Aging Neurosci*. 2015;7:192.
274. Gass J, Cannon A, Mackenzie IR, Boeve B, Baker M, Adamson J, et al. Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Hum Mol Genet*. 2006 Oct 15;15(20):2988–3001.
275. Ghetti B, Oblak AL, Boeve BF, Johnson KA, Dickerson BC, Goedert M. Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015 Feb;41(1):24–46.
276. Gijselinck I, Van Broeckhoven C, Cruts M. Granulin mutations associated with frontotemporal lobar degeneration and related disorders: an update. *Hum Mutat*. 2008 Dec;29(12):1373–86.
277. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 1998 Jun 18;393(6686):702–5.
278. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*. 2006 Aug 24;442(7105):916–9.
279. Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, et al. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*. 2006 Aug 24;442(7105):920–4.
280. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):245–56.
281. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):257–68.
282. Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol*. 2010 Oct;9(10):995–1007.
283. Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS, et al. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science*. 2015 Mar 27;347(6229):1436–41.

284. Ju J-S, Weihl CC. Inclusion body myopathy, Paget's disease of the bone and frontotemporal dementia: a disorder of autophagy. *Hum Mol Genet.* 2010 Apr 15;19(R1):R38-45.
285. Hübbers CU, Clemen CS, Kesper K, Böddrich A, Hofmann A, Kämäräinen O, et al. Pathological consequences of VCP mutations on human striated muscle. *Brain J Neurol.* 2007 Feb;130(Pt 2):381-93.
286. van der Zee J, Gijssels I, Pirici D, Kumar-Singh S, Cruts M, Van Broeckhoven C. Frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions: a molecular genetic update. *Neurodegener Dis.* 2007;4(2-3):227-35.
287. Forman MS, Mackenzie IR, Cairns NJ, Swanson E, Boyer PJ, Drachman DA, et al. Novel ubiquitin neuropathology in frontotemporal dementia with valosin-containing protein gene mutations. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006 Jun;65(6):571-81.
288. Meyer H, Weihl CC. The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. *J Cell Sci.* 2014 Sep 15;127(Pt 18):3877-83.
289. Buratti E. Functional Significance of TDP-43 Mutations in Disease. *Adv Genet.* 2015;91:1-53.
290. Watts GDJ, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, et al. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet.* 2004 Apr;36(4):377-81.
291. Freischmidt A, Wieland T, Richter B, Ruf W, Schaeffer V, Müller K, et al. Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci.* 2015 May;18(5):631-6.
292. Gijssels I, Van Mossevelde S, van der Zee J, Sieben A, Philtjens S, Heeman B, et al. Loss of TBK1 is a frequent cause of frontotemporal dementia in a Belgian cohort. *Neurology.* 2015 Dec 15;85(24):2116-25.
293. Le Ber I, De Septenville A, Millecamps S, Camuzat A, Caroppo P, Couratier P, et al. TBK1 mutation frequencies in French frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis cohorts. *Neurobiol Aging.* 2015 Nov;36(11):3116.e5-3116.e8.
294. van der Zee J, Urwin H, Engelborghs S, Bruyland M, Vandenberghe R, Dermaut B, et al. CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. *Hum Mol Genet.* 2008 Jan 15;17(2):313-22.
295. Pottier C, Ravenscroft TA, Sanchez-Contreras M, Rademakers R. Genetics of FTL: overview and what else we can expect from genetic studies. *J Neurochem.* 2016 Aug;138 Suppl 1:32-53.
296. Rohrer JD, Ahsan RL, Isaacs AM, Nielsen JE, Ostergaard L, Scahill R, et al. Presymptomatic generalized brain atrophy in frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutation. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2009;27(2):182-6.

297. Tanji K, Zhang H-X, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. p62/sequestosome 1 binds to TDP-43 in brains with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *J Neurosci Res*. 2012 Oct;90(10):2034–42.
298. Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J*. 2015 Dec;282(24):4672–8.
299. Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, et al. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet*. 2005 Aug;37(8):806–8.
300. Momeni P, Rogaeva E, Van Deerlin V, Yuan W, Grafman J, Tierney M, et al. Genetic variability in CHMP2B and frontotemporal dementia. *Neurodegener Dis*. 2006;3(3):129–33.
301. Rea SL, Majcher V, Searle MS, Layfield R. SQSTM1 mutations – Bridging Paget disease of bone and ALS/FTLD. *Exp Cell Res*. 2014 Jul;325(1):27–37.
302. Pan PL, Song W, Yang J, Huang R, Chen K, Gong QY, et al. Gray Matter Atrophy in Behavioral Variant Frontotemporal Dementia: A Meta-Analysis of Voxel-Based Morphometry Studies. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2012;33(2–3):141–8.
303. Schroeter ML, Laird AR, Chwiesko C, Deuschl C, Schneider E, Bzdok D, et al. Conceptualizing neuropsychiatric diseases with multimodal data-driven meta-analyses – The case of behavioral variant frontotemporal dementia. *Cortex J Devoted Study Nerv Syst Behav*. 2014 Aug;0:22–37.
304. Whitwell JL, Weigand SD, Boeve BF, Senjem ML, Gunter JL, DeJesus-Hernandez M, et al. Neuroimaging signatures of frontotemporal dementia genetics: C9ORF72, tau, progranulin and sporadics. *Brain*. 2012 Mar;135(3):794–806.
305. Meeter LH, Kaat LD, Rohrer JD, van Swieten JC. Imaging and fluid biomarkers in frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurol*. 2017 Jul;13(7):406–19.
306. Gordon E, Rohrer JD, Fox NC. Advances in neuroimaging in frontotemporal dementia. *J Neurochem*. 2016 Aug;138:193–210.
307. Rogalski E, Cobia D, Harrison TM, Wieneke C, Weintraub S, Mesulam M-M. Progression of language decline and cortical atrophy in subtypes of primary progressive aphasia. *Neurology*. 2011 May 24;76(21):1804–10.
308. Chan D, Anderson V, Pijnenburg Y, Whitwell J, Barnes J, Schill R, et al. The clinical profile of right temporal lobe atrophy. *Brain*. 2009 May 1;132(5):1287–98.
309. Landin-Romero R, Tan R, Hodges JR, Kumfor F. An update on semantic dementia: genetics, imaging, and pathology. *Alzheimers Res Ther*. 2016 Dec;8(1):52.
310. Rohrer JD, Warren JD, Modat M, Ridgway GR, Douiri A, Rossor MN, et al. Patterns of cortical thinning in the language variants of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology*. 2009 May 5;72(18):1562–9.

311. Schroeter ML, Raczka K, Neumann J, Yves von Cramon D. Towards a nosology for frontotemporal lobar degenerations—A meta-analysis involving 267 subjects. *NeuroImage*. 2007 Jul;36(3):497–510.
312. Harper L, Fumagalli GG, Barkhof F, Scheltens P, O'Brien JT, Bouwman F, et al. MRI visual rating scales in the diagnosis of dementia: evaluation in 184 post-mortem confirmed cases. *Brain*. 2016 Apr;139(4):1211–25.
313. Kumfor F, Landin-Romero R, Devenney E, Hutchings R, Grasso R, Hodges JR, et al. On the right side? A longitudinal study of left- versus right-lateralized semantic dementia. *Brain*. 2016 Mar;139(3):986–98.
314. Whitwell JL, Boeve BF, Weigand SD, Senjem ML, Gunter JL, Baker MC, et al. Brain atrophy over time in genetic and sporadic frontotemporal dementia: a study of 198 serial magnetic resonance images. *Eur J Neurol*. 2015 May;22(5):745–52.
315. Rohrer JD, Lashley T, Schott JM, Warren JE, Mead S, Isaacs AM, et al. Clinical and neuroanatomical signatures of tissue pathology in frontotemporal lobar degeneration. *Brain*. 2011 Sep;134(9):2565–81.
316. Surampalli A, Gold BT, Smith C, Castellani RJ, Khare M, Yu H, et al. A case report comparing clinical, imaging and neuropsychological assessment findings in twins discordant for the VCP p.R155C mutation. *Neuromuscul Disord NMD*. 2015 Feb;25(2):177–83.
317. Rohrer JD, Nicholas JM, Cash DM, van Swieten J, Doppler E, Jiskoot L, et al. Presymptomatic cognitive and neuroanatomical changes in genetic frontotemporal dementia in the Genetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI) study: a cross-sectional analysis. *Lancet Neurol*. 2015 Mar 1;14(3):253–62.
318. Warren JD, Rohrer JD, Schott JM, Fox NC, Hardy J, Rossor MN. Molecular nexopathies: a new paradigm of neurodegenerative disease. *Trends Neurosci*. 2013 Oct;36(10):561–9.
319. Zhang Y, Schuff N, Du A-T, Rosen HJ, Kramer JH, Gorno-Tempini ML, et al. White matter damage in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease measured by diffusion MRI. *Brain*. 2009 Sep 1;132(9):2579–92.
320. Mahoney CJ, Ridgway GR, Malone IB, Downey LE, Beck J, Kinnunen KM, et al. Profiles of white matter tract pathology in frontotemporal dementia. *Hum Brain Mapp*. 2014 Feb 7;35(8):4163–79.
321. Caroppo P, Le Ber I, Camuzat A, Clot F, Naccache L, Lamari F, et al. Extensive White Matter Involvement in Patients With Frontotemporal Lobar Degeneration: Think Progranulin. *JAMA Neurol*. 2014 Dec 1;71(12):1562.
322. Agosta F, Galantucci S, Magnani G, Marcone A, Martinelli D, Antonietta Volontè M, et al. MRI signatures of the frontotemporal lobar degeneration continuum. *Hum Brain Mapp*. 2015 Mar 28;36(7):2602–14.

323. McMillan CT, Irwin DJ, Avants BB, Powers J, Cook PA, Toledo JB, et al. White Matter Imaging Helps Dissociate Tau from TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013 Sep;84(9):949–55.
324. Dopfer EGP, Rombouts SARB, Jiskoot LC, den Heijer T, de Graaf JRA, de Koning I, et al. Structural and functional brain connectivity in presymptomatic familial frontotemporal dementia. *Neurology*. 2014 Jul 8;83(2):e19–26.
325. Borroni B, Alberici A, Premi E, Archetti S, Garibotto V, Agosti C, et al. Brain Magnetic Resonance Imaging Structural Changes in a Pedigree of Asymptomatic Progranulin Mutation Carriers. *Rejuvenation Res*. 2008 Jun;11(3):585–95.
326. Vijverberg EGB, Wattjes MP, Dols A, Krudop WA, Möller C, Peters A, et al. Diagnostic Accuracy of MRI and Additional [18F]FDG-PET for Behavioral Variant Frontotemporal Dementia in Patients with Late Onset Behavioral Changes. *J Alzheimers Dis*. 2016 Aug 8;53(4):1287–97.
327. Jacova C, Hsiung G-YR, Tawankanjanachot I, Dinelle K, McCormick S, Gonzalez M, et al. Anterior brain glucose hypometabolism predates dementia in progranulin mutation carriers. *Neurology*. 2013 Oct 8;81(15):1322–31.
328. Deters KD, Risacher SL, Farlow MR, Unverzagt FW, Kareken DA, Hutchins GD, et al. Cerebral hypometabolism and grey matter density in MAPT intron 10 +3 mutation carriers. *Am J Neurodegener Dis*. 2014;3(3):103–14.
329. Cistaro A, Pagani M, Montuschi A, Calvo A, Moglia C, Canosa A, et al. The metabolic signature of C9ORF72-related ALS: FDG PET comparison with nonmutated patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014 May;41(5):844–52.
330. Morbelli S, Ferrara M, Fiz F, Dessi B, Arnaldi D, Picco A, et al. Mapping brain morphological and functional conversion patterns in predementia late-onset bvFTD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2016 Jul;43(7):1337–47.
331. Buratti E. Frontotemporal Dementias: Emerging Milestones of the 21st Century [Internet]. Ghetti B, Boeve B, Rademakers R, editors. Cham: Springer International Publishing; 2021 [cited 2021 Aug 1]. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1281). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-51140-1>
332. Ishii K. PET approaches for diagnosis of dementia. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2014 Dec;35(11):2030–8.
333. Matías-Guiu JA, Cabrera-Martín MN, Moreno-Ramos T, Valles-Salgado M, Fernandez-Matarrubia M, Carreras JL, et al. Amyloid and FDG-PET study of logopenic primary progressive aphasia: evidence for the existence of two subtypes. *J Neurol*. 2015 Jun;262(6):1463–72.
334. Smith R, Puschmann A, Schöll M, Ohlsson T, van Swieten J, Honer M, et al. 18F-AV-1451 tau PET imaging correlates strongly with tau neuropathology in MAPT mutation carriers. *Brain J Neurol*. 2016 Sep;139(Pt 9):2372–9.

335. Ono M, Sahara N, Kumata K, Ji B, Ni R, Koga S, et al. Distinct binding of PET ligands PBB3 and AV-1451 to tau fibril strains in neurodegenerative tauopathies. *Brain J Neurol*. 2017 Mar 1;140(3):764–80.
336. Ishiki A, Harada R, Okamura N, Tomita N, Rowe CC, Villemagne VL, et al. Tau imaging with [18 F]THK-5351 in progressive supranuclear palsy. *Eur J Neurol*. 2017 Jan;24(1):130–6.
337. Villemagne VL, Fodero-Tavoletti MT, Masters CL, Rowe CC. Tau imaging: early progress and future directions. *Lancet Neurol*. 2015 Jan;14(1):114–24.
338. National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 70957463, Flortaucipir (18F); [cité le 21 août 2021]. Disponible à l'adresse : [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flortaucipir\\_18F](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flortaucipir_18F).
339. Alsop DC, Detre JA, Golay X, Günther M, Hendrikse J, Hernandez-Garcia L, et al. Recommended implementation of arterial spin-labeled perfusion MRI for clinical applications: A consensus of the ISMRM perfusion study group and the European consortium for ASL in dementia. *Magn Reson Med*. 2015 Jan;73(1):102–16.
340. Dopper EGP, Chalos V, Ghariq E, den Heijer T, Hafkemeijer A, Jiskoot LC, et al. Cerebral blood flow in presymptomatic MAPT and GRN mutation carriers: A longitudinal arterial spin labeling study. *NeuroImage Clin*. 2016 Feb;12:460–5.
341. Haller S, Zaharchuk G, Thomas DL, Lovblad K-O, Barkhof F, Golay X. Arterial Spin Labeling Perfusion of the Brain: Emerging Clinical Applications. *Radiology*. 2016 Nov;281(2):337–56.
342. Verfaillie SCJ, Adriaanse SM, Binnewijzend MAA, Benedictus MR, Ossenkoppele R, Wattjes MP, et al. Cerebral perfusion and glucose metabolism in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: two sides of the same coin? *Eur Radiol*. 2015 Oct;25(10):3050–9.
343. Tosun D, Schuff N, Rabinovici GD, Ayakta N, Miller BL, Jagust W, et al. Diagnostic utility of ASL-MRI and FDG-PET in the behavioral variant of FTD and AD. *Ann Clin Transl Neurol*. 2016 Oct;3(10):740–51.
344. Zhou J, Greicius MD, Gennatas ED, Growdon ME, Jang JY, Rabinovici GD, et al. Divergent network connectivity changes in behavioural variant frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Brain J Neurol*. 2010 May;133(Pt 5):1352–67.
345. Borroni B, Alberici A, Cercignani M, Premi E, Serra L, Cerini C, et al. Granulin mutation drives brain damage and reorganization from preclinical to symptomatic FTL. *Neurobiol Aging*. 2012 Oct;33(10):2506–20.
346. Hafkemeijer A, Möller C, Dopper EGP, Jiskoot LC, Schouten TM, van Swieten JC, et al. Resting state functional connectivity differences between behavioral variant frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Front Hum Neurosci*. 2015;9:474.
347. Filippi M, Agosta F, Scola E, Canu E, Magnani G, Marcone A, et al. Functional network connectivity in the behavioral variant of frontotemporal dementia. *Cortex J Devoted Study Nerv Syst Behav*. 2013 Oct;49(9):2389–401.



348. Agosta F, Galantucci S, Valsasina P, Canu E, Meani A, Marcone A, et al. Disrupted brain connectome in semantic variant of primary progressive aphasia. *Neurobiol Aging*. 2014 Nov;35(11):2646–55.
349. Seeley WW, Crawford RK, Zhou J, Miller BL, Greicius MD. Neurodegenerative diseases target large-scale human brain networks. *Neuron*. 2009 Apr 16;62(1):42–52.
350. Guo CC, Gorno-Tempini ML, Gesierich B, Henry M, Trujillo A, Shany-Ur T, et al. Anterior temporal lobe degeneration produces widespread network-driven dysfunction. *Brain J Neurol*. 2013 Oct;136(Pt 10):2979–91.
351. Lee SE, Khazenzon AM, Trujillo AJ, Guo CC, Yokoyama JS, Sha SJ, et al. Altered network connectivity in frontotemporal dementia with C9orf72 hexanucleotide repeat expansion. *Brain J Neurol*. 2014 Nov;137(Pt 11):3047–60.
352. Premi E, Cauda F, Gasparotti R, Diano M, Archetti S, Padovani A, et al. Multimodal FMRI resting-state functional connectivity in granulin mutations: the case of fronto-parietal dementia. *PloS One*. 2014;9(9):e106500.
353. Steinacker P, Barschke P, Otto M. Biomarkers for diseases with TDP-43 pathology. *Mol Cell Neurosci*. 2019 Jun;97:43–59.
354. Oeckl P, Steinacker P, Feneberg E, Otto M. Neurochemical biomarkers in the diagnosis of frontotemporal lobar degeneration: an update. *J Neurochem*. 2016 Aug;138:184–92.
355. Feneberg E, Steinacker P, Lehnert S, Schneider A, Walther P, Thal DR, et al. Limited role of free TDP-43 as a diagnostic tool in neurodegenerative diseases. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2014 Sep;15(5–6):351–6.
356. Cicardi ME, Marrone L, Azzouz M, Trotti D. Proteostatic imbalance and protein spreading in amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J*. 2021 May 17;40(10):e106389.
357. Mishra PS, Boutej H, Soucy G, Bareil C, Kumar S, Picher-Martel V, et al. Transmission of ALS pathogenesis by the cerebrospinal fluid. *Acta Neuropathol Commun*. 2020 Dec;8(1):65.
358. Steinacker P, Hendrich C, Sperfeld AD, Jesse S, von Arnim CAF, Lehnert S, et al. TDP-43 in Cerebrospinal Fluid of Patients With Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch Neurol*. 2008 Nov 10;65(11):1481.
359. Kasai T, Tokuda T, Ishigami N, Sasayama H, Foulds P, Mitchell DJ, et al. Increased TDP-43 protein in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2009 Jan;117(1):55–62.
360. Noto Y-I, Shibuya K, Sato Y, Kanai K, Misawa S, Sawai S, et al. Elevated CSF TDP-43 levels in amyotrophic lateral sclerosis: Specificity, sensitivity, and a possible prognostic value. *Amyotroph Lateral Scler*. 2011 Mar;12(2):140–3.
361. Junttila A, Kuvaja M, Hartikainen P, Siloaho M, Helisalmi S, Moilanen V, et al. Cerebrospinal Fluid TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients with and without the C9ORF72 Hexanucleotide Expansion. *Dement Geriatr Cogn Disord Extra*. 2016 Apr 16;6(1):142–9.

362. Kuiperij HB, Versleijen AAM, Beenes M, Verwey NA, Benussi L, Paterlini A, et al. Tau Rather than TDP-43 Proteins are Potential Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Frontotemporal Lobar Degeneration Subtypes: A Pilot Study. Hall A, editor. *J Alzheimers Dis*. 2016 Nov 19;55(2):585–95.
363. Suarez-Calvet M, Dols-Icardo O, Llado A, Sanchez-Valle R, Hernandez I, Amer G, et al. Plasma phosphorylated TDP-43 levels are elevated in patients with frontotemporal dementia carrying a C9orf72 repeat expansion or a GRN mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014 Jun 1;85(6):684–91.
364. Bourbouli M, Rentzos M, Bougea A, Zouvelou V, Constantinides VC, Zaganas I, et al. Cerebrospinal Fluid TAR DNA-Binding Protein 43 Combined with Tau Proteins as a Candidate Biomarker for Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Spectrum Disorders. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2017;44(3–4):144–52.
365. Baer ET. Post-Dural Puncture Bacterial Meningitis. 2006;105(2):13.
366. Cognat E, Berengère K, Paul Z, Belbachir A, Paquet C. Recommandations HAS Ponction Lominaire. *Rev Neurol (Paris)*. 2020 Sep;176:S114.
367. Ahmed RM, Paterson RW, Warren JD, Zetterberg H, O'Brien JT, Fox NC, et al. Biomarkers in dementia: clinical utility and new directions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014 Dec;85(12):1426–34.
368. Andreasson U, Blennow K, Zetterberg H. Update on ultrasensitive technologies to facilitate research on blood biomarkers for central nervous system disorders. *Alzheimers Dement Diagn Assess Dis Monit*. 2016 Jan;3(1):98–102.
369. Sancesario G, Bernardini S. AD biomarker discovery in CSF and in alternative matrices. *Clin Biochem*. 2019 Oct;72:52–7.
370. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gattringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018 Oct;14(10):577–89.
371. Sproviero D, La Salvia S, Giannini M, Crippa V, Gagliardi S, Bernuzzi S, et al. Pathological Proteins Are Transported by Extracellular Vesicles of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Front Neurosci*. 2018 Jul 19;12:487.
372. Kasai T, Kojima Y, Ohmichi T, Tatebe H, Tsuji Y, Noto Y, et al. Combined use of CSF NfL and CSF TDP-43 improves diagnostic performance in ALS. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019 Dec;6(12):2489–502.
373. Foulds P, McAuley E, Gibbons L, Davidson Y, Pickering-Brown SM, Neary D, et al. TDP-43 protein in plasma may index TDP-43 brain pathology in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2008 Aug;116(2):141–6.
374. De Marco G, Lupino E, Calvo A, Moglia C, Buccinnà B, Grifoni S, et al. Cytoplasmic accumulation of TDP-43 in circulating lymphomonocytes of ALS patients with and without TARDBP mutations. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2011 May;121(5):611–22.

375. Nardo G, Pozzi S, Pignataro M, Lauranzano E, Spano G, Garbelli S, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis Multiprotein Biomarkers in Peripheral Blood Mononuclear Cells. Pant H, editor. PLoS ONE. 2011 Oct 5;6(10):e25545.
376. Thompson AG, Gray E, Heman-Ackah SM, Mäger I, Talbot K, Andaloussi SE, et al. Extracellular vesicles in neurodegenerative disease — pathogenesis to biomarkers. *Nat Rev Neurol*. 2016 Jun;12(6):346–57.
377. Basu SS, Deutsch EC, Schmaier AA, Lynch DR, Blair IA. Human platelets as a platform to monitor metabolic biomarkers using stable isotopes and LC–MS. *Bioanalysis*. 2013 Dec;5(24):3009–21.
378. Tocantins LM. THE MAMMALIAN BLOOD PLATELET IN HEALTH AND DISEASE: *Medicine*. 1938 May;17(2):155-243.
379. Leiter O, Walker TL. Platelets: The missing link between the blood and brain? *Prog Neurobiol*. 2019 Dec;183:101695.
380. Goubau C, Buyse GM, Di Michele M, Van Geet C, Freson K. Regulated granule trafficking in platelets and neurons: A common molecular machinery. *Eur J Paediatr Neurol*. 2013 Mar;17(2):117–25.
381. Canobbio I. Blood platelets: Circulating mirrors of neurons? *Res Pract Thromb Haemost*. 2019 Oct;3(4):564–5.
382. Sotnikov I, Veremeyko T, Starossom SC, Barteneva N, Weiner HL, Ponomarev ED. Platelets Recognize Brain-Specific Glycolipid Structures, Respond to Neurovascular Damage and Promote Neuroinflammation. Block ML, editor. PLoS ONE. 2013 Mar 26;8(3):e58979.
383. Leiter O, Walker TL. Platelets in Neurodegenerative Conditions—Friend or Foe? *Front Immunol*. 2020 May 5;11:747.
384. Chacón-Fernández P, Säuberli K, Colzani M, Moreau T, Ghevaert C, Barde Y-A. Brain-derived Neurotrophic Factor in Megakaryocytes. *J Biol Chem*. 2016 May;291(19):9872–81.
385. Gabriele S, Sacco R, Persico AM. Blood serotonin levels in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2014 Jun;24(6):919–29.
386. Padmakumar M, Van Raes E, Van Geet C, Freson K. Blood platelet research in autism spectrum disorders: In search of biomarkers. *Res Pract Thromb Haemost*. 2019 Oct;3(4):566–77.
387. Kaneez FS, Saeed SA. Investigating GABA and its function in platelets as compared to neurons. *Platelets*. 2009 Jan;20(5):328–33.
388. Kim J, Lee S, Kang S, Kim S-H, Kim J-C, Yang M, et al. Brain-derived neurotropic factor and GABAergic transmission in neurodegeneration and neuroregeneration. *Neural Regen Res*. 2017 Oct;12(10):1733–41.

389. Chen M, Inestrosa NC, Ross GS, Fernandez HL. Platelets Are the Primary Source of Amyloid  $\beta$ -Peptide in Human Blood. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Aug;213(1):96–103.
390. Ciabattoni G, Porreca E, Di Febbo C, Di Iorio A, Paganelli R, Bucciarelli T, et al. Determinants of platelet activation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007 Mar;28(3):336–42.
391. Wilhite R, Sage JM, Bouzid A, Primavera T, Agbas A. Platelet phosphorylated TDP-43: an exploratory study for a peripheral surrogate biomarker development for Alzheimer's disease. *Future Sci OA*. 2017 Nov;3(4):FSO238.
392. Ehinger JK, Morota S, Hansson MJ, Paul G, Elmér E. Mitochondrial dysfunction in blood cells from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol*. 2015 Jun;262(6):1493–503.
393. Shrivastava M, Vivekanandhan S, Pati U, Behari M, Das TK. Mitochondrial Perturbance and Execution of Apoptosis in Platelet Mitochondria of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int J Neurosci*. 2011 Jan;121(3):149–58.
394. Shrivastava M, Das TK, Behari M, Pati U, Vivekanandhan S. Ultrastructural Variations in Platelets and Platelet Mitochondria: A Novel Feature in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ultrastruct Pathol*. 2011 Apr;35(2):52–9.
395. Forrest V, Ince P, Leitch M, Marshall EF, Shaw PJ. Serotonergic neurotransmission in the spinal cord and motor cortex of patients with motor neuron disease and controls: quantitative autoradiography for 5-HT<sub>1a</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors. *J Neurol Sci*. 1996 Aug;139:83–90.
396. Dupuis L, Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Jullien P, Lacomblez L, Salachas F, et al. Platelet Serotonin Level Predicts Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Egles C, editor. *PLoS ONE*. 2010 Oct 13;5(10):e13346.
397. Hishizawa M, Yamashita H, Akizuki M, Urushitani M, Takahashi R. TDP-43 levels are higher in platelets from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis than in healthy controls. *Neurochem Int*. 2019 Mar;124:41–5.
398. Galimberti D, Fumagalli GG, Fenoglio C, Cioffi SMG, Arighi A, Serpente M, et al. Progranulin plasma levels predict the presence of GRN mutations in asymptomatic subjects and do not correlate with brain atrophy: results from the GENFI study. *Neurobiol Aging*. 2018 Feb;62:245.e9-245.e12.
399. Sellami L, Rucheton B, Ben Younes I, Camuzat A, Saracino D, Rinaldi D, et al. Plasma progranulin levels for frontotemporal dementia in clinical practice: a 10-year French experience. *Neurobiol Aging*. 2020 Jul;91:167.e1-167.e9.
400. Almeida S, Gao F, Coppola G, Gao F-B. Suberoylanilide hydroxamic acid increases progranulin production in iPSC-derived cortical neurons of frontotemporal dementia patients. *Neurobiol Aging*. 2016 Jun;42:35–40.

401. Chitramuthu BP, Bennett HPJ, Bateman A. Progranulin: a new avenue towards the understanding and treatment of neurodegenerative disease. *Brain*. 2017 Dec 1;140(12):3081–104.
402. Wilke C, Gillardon F, Deuschle C, Dubois E, Hobert M, Just J, et al. Serum Levels of Progranulin Do Not Reflect Cerebrospinal Fluid Levels in Neurodegenerative Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2016 Mar 14;13.
403. Mori K, Weng S-M, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, et al. The C9orf72 GGGGCC Repeat Is Translated into Aggregating Dipeptide-Repeat Proteins in FTLD/ALS. *Science*. 2013 Mar 15;339(6125):1335–8.
404. Zu T, Liu Y, Banez-Coronel M, Reid T, Pletnikova O, Lewis J, et al. RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci*. 2013 Dec 17;110(51):E4968–77.
405. Davidson YS, Barker H, Robinson AC, Thompson JC, Harris J, Troakes C, et al. Brain distribution of dipeptide repeat proteins in frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol Commun*. 2014 Dec;2(1):70.
406. Mackenzie IR, Arzberger T, Kremmer E, Troost D, Lorenzl S, Mori K, et al. Dipeptide repeat protein pathology in C9ORF72 mutation cases: clinico-pathological correlations. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2013 Dec;126(6):859–79.
407. Jiang J, Ravits J. Pathogenic Mechanisms and Therapy Development for C9orf72 Amyotrophic Lateral Sclerosis/Frontotemporal Dementia. *Neurotherapeutics*. 2019 Oct;16(4):1115–32.
408. Gendron TF, Chew J, Stankowski JN, Hayes LR, Zhang Y-J, Prudencio M, et al. Poly(GP) proteins are a useful pharmacodynamic marker for C9ORF72 -associated amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Transl Med*. 2017 Mar 29;9(383):eaai7866.
409. Meeter LHH, Gendron TF, Sias AC, Jiskoot LC, Russo SP, Donker Kaat L, et al. Poly(GP), neurofilament and grey matter deficits in C9orf72 expansion carriers. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018 May;5(5):583–97.
410. Lehmer C, Oeckl P, Weishaupt JH, Volk AE, Diehl- Schmid J, Schroeter ML, et al. Poly- GP in cerebrospinal fluid links C9orf72 - associated dipeptide repeat expression to the asymptomatic phase of ALS / FTD. *EMBO Mol Med*. 2017 Jul;9(7):859–68.
411. Su Z, Zhang Y, Gendron TF, Bauer PO, Chew J, Yang W-Y, et al. Discovery of a Biomarker and Lead Small Molecules to Target r(GGGGCC)-Associated Defects in c9FTD/ALS. *Neuron*. 2014 Sep;83(5):1043–50.
412. Skillbäck T, Farahmand BY, Rosén C, Mattsson N, Nägga K, Kilander L, et al. Cerebrospinal fluid tau and amyloid- $\beta_{1-42}$  in patients with dementia. *Brain*. 2015 Sep;138(9):2716–31.
413. Toledo JB, Brettschneider J, Grossman M, Arnold SE, Hu WT, Xie SX, et al. CSF biomarkers cutoffs: the importance of coincident neuropathological diseases. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2012 Jul;124(1):23–35.

414. Rivero-Santana A, Ferreira D, Perestelo-Pérez L, Westman E, Wahlund L-O, Sarría A, et al. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for the Differential Diagnosis between Alzheimer's Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration: Systematic Review, HSROC Analysis, and Confounding Factors. *J Alzheimers Dis*. 2016 Nov 19;55(2):625–44.
415. Baldeiras I, Santana I, Leitão MJ, Ribeiro MH, Pascoal R, Duro D, et al. Cerebrospinal fluid A $\beta$ 40 is similarly reduced in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Alzheimer's Disease. *J Neurol Sci*. 2015 Nov;358(1–2):308–16.
416. Bian H, Van Swieten JC, Leight S, Massimo L, Wood E, Forman M, et al. CSF biomarkers in frontotemporal lobar degeneration with known pathology. *Neurology*. 2008 May 6;70(Issue 19, Part 2):1827–35.
417. Irwin DJ, Lleó A, Xie SX, McMillan CT, Wolk DA, Lee EB, et al. Ante mortem cerebrospinal fluid tau levels correlate with postmortem tau pathology in frontotemporal lobar degeneration: CSF p-tau in FTL. *Ann Neurol*. 2017 Aug;82(2):247–58.
418. Kämäläinen A, Herukka S-K, Hartikainen P, Helisalmi S, Moilanen V, Knuutila A, et al. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease in Patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis with the C9ORF72 Repeat Expansion. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2015;39(5–6):287–93.
419. Blennow K, Vanmechelen E, Hampel H. CSF Total tau, A $\beta$ 42 and Phosphorylated tau Protein as Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 2001;24(1–3):087–98.
420. Goossens J, Bjerke M, Van Mossevelde S, Van den Bossche T, Goeman J, De Vil B, et al. Diagnostic value of cerebrospinal fluid tau, neurofilament, and progranulin in definite frontotemporal lobar degeneration. *Alzheimers Res Ther*. 2018 Dec;10(1):31.
421. Borroni B, Benussi A, Archetti S, Galimberti D, Parnetti L, Nacmias B, et al. Csf p-tau<sub>181</sub>/tau ratio as biomarker for TDP pathology in frontotemporal dementia. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2015 Mar 31;16(1–2):86–91.
422. Grossman M, Farmer J, Leight S, Work M, Moore P, Deerlin VV, et al. Cerebrospinal fluid profile in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2005;57(5):721–9.
423. Zetterberg H, Burnham SC. Blood-based molecular biomarkers for Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2019 Dec;12(1):26.
424. Mattsson N, Schöll M, Strandberg O, Smith R, Palmqvist S, Insel PS, et al. 18F-AV-1451 and CSF T-tau and P-tau as biomarkers in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med*. 2017 Sep;9(9):1212–23.
425. Foiani MS, Woollacott IO, Heller C, Bocchetta M, Heslegrave A, Dick KM, et al. Plasma tau is increased in frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Aug;89(8):804–7.
426. Illán-Gala I, Lleó A, Karydas A, Staffaroni AM, Zetterberg H, Sivasankaran R, et al. Plasma tau and neurofilament light in frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease. *Neurology*. 2021 Feb 2;96(5):e671–e683.

427. Codron P, Cassereau J, Eyer J, Letournel F. Neuronal Intermediate Filaments in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Dans: Foyaca-Sibat H. Update on Amyotrophic Lateral Sclerosis. Croatie: InTech; 2016.
428. Zetterberg H, van Swieten JC, Boxer AL, Rohrer JD. Review: Fluid biomarkers for frontotemporal dementias. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2019 Feb;45(1):81–7.
429. Zhao Y, Xin Y, Meng S, He Z, Hu W. Neurofilament light chain protein in neurodegenerative dementia: A systematic review and network meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019 Jul;102:123–38.
430. Rojas JC, Bang J, Lobach IV, Tsai RM, Rabinovici GD, Miller BL, et al. CSF neurofilament light chain and phosphorylated tau 181 predict disease progression in PSP. *Neurology*. 2018 Jan 23;90(4):e273–81.
431. Hansson O, Janelidze S, Hall S, Magdalinou N, Lees AJ, Andreasson U, et al. Blood-based NfL: A biomarker for differential diagnosis of parkinsonian disorder. *Neurology*. 2017 Mar 7;88(10):930–7.
432. Lu C-H, Macdonald-Wallis C, Gray E, Pearce N, Petzold A, Norgren N, et al. Neurofilament light chain: A prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2015 Jun 2;84(22):2247–57.
433. Oosterveld LP, Verberk IMW, Majbour NK, El-Agnaf OM, Weinstein HC, Berendse HW, et al. CSF or Serum Neurofilament Light Added to  $\alpha$ -Synuclein Panel Discriminates Parkinson's From Controls. *Mov Disord*. 2020 Feb;35(2):288–95.
434. Byrne LM, Rodrigues FB, Johnson EB, Wijeratne PA, De Vita E, Alexander DC, et al. Evaluation of mutant huntingtin and neurofilament proteins as potential markers in Huntington's disease. *Sci Transl Med*. 2018 Sep 12;10(458):eaat7108.
435. Abdelhak A, Junker A, Brettschneider J, Kassubek J, Ludolph A, Otto M, et al. Brain-Specific Cytoskeletal Damage Markers in Cerebrospinal Fluid: Is There a Common Pattern between Amyotrophic Lateral Sclerosis and Primary Progressive Multiple Sclerosis? *Int J Mol Sci*. 2015 Jul 31;16(8):17565–88.
436. Rosengren LE, Karlsson J-E, Karlsson J-O, Persson LI, Wikkelsø C. Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Neurodegenerative Diseases Have Increased Levels of Neurofilament Protein in CSF. *J Neurochem*. 2002 Nov 23;67(5):2013–8.
437. Gaetani L, Blennow K, Calabresi P, Di Filippo M, Parnetti L, Zetterberg H. Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019 Aug;90(8):870–81.
438. Skillback T, Farahmand B, Bartlett JW, Rosen C, Mattsson N, Nagga K, et al. CSF neurofilament light differs in neurodegenerative diseases and predicts severity and survival. *Neurology*. 2014 Nov 18;83(21):1945–53.
439. Landqvist Waldö M, Frizell Santillo A, Passant U, Zetterberg H, Rosengren L, Nilsson C, et al. Cerebrospinal fluid neurofilament light chain protein levels in subtypes of frontotemporal dementia. *BMC Neurol*. 2013 Dec;13(1):54.

440. Forgrave LM, Ma M, Best JR, DeMarco ML. The diagnostic performance of neurofilament light chain in CSF and blood for Alzheimer's disease, frontotemporal dementia, and amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement Diagn Assess Dis Monit*. 2019 Dec;11(1):730–43.
441. Tiedt S, Duering M, Barro C, Kaya AG, Boeck J, Bode FJ, et al. Serum neurofilament light: A biomarker of neuroaxonal injury after ischemic stroke. *Neurology*. 2018 Oct 2;91(14):e1338–47.
442. Al Nimer F, Thelin E, Nyström H, Dring AM, Svenningsson A, Piehl F, et al. Comparative Assessment of the Prognostic Value of Biomarkers in Traumatic Brain Injury Reveals an Independent Role for Serum Levels of Neurofilament Light. *PLoS ONE*. 2015;10(7):e013217.
443. Rana OR, Schröder JW, Baukloh JK, Saygili E, Mischke K, Schiefer J, et al. Neurofilament light chain as an early and sensitive predictor of long-term neurological outcome in patients after cardiac arrest. *Int J Cardiol*. 2013 Sep;168(2):1322–7.
444. Al Shweiki MR, Steinacker P, Oeckl P, Hengerer B, Danek A, Fassbender K, et al. Neurofilament light chain as a blood biomarker to differentiate psychiatric disorders from behavioural variant frontotemporal dementia. *J Psychiatr Res*. 2019 Jun;113:137–40.
445. Eratne D, Loi SM, Walia N, Farrand S, Li Q-X, Varghese S, et al. A pilot study of the utility of cerebrospinal fluid neurofilament light chain in differentiating neurodegenerative from psychiatric disorders: A 'C-reactive protein' for psychiatrists and neurologists? *Aust N Z J Psychiatry*. 2020 Jan;54(1):57–67.
446. Katisko K, Cajanus A, Jääskeläinen O, Kontkanen A, Hartikainen P, Korhonen VE, et al. Serum neurofilament light chain is a discriminative biomarker between frontotemporal lobar degeneration and primary psychiatric disorders. *J Neurol*. 2020 Jan;267(1):162–7.
447. Niikado M, Chrem-Méndez P, Itzcovich T, Barbieri-Kennedy M, Calandri I, Martinetto H, et al. Evaluation of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Chain as a Routine Biomarker in a Memory Clinic. *J Gerontol Ser A*. 2019 Mar 14;74(4):442–5.
448. Pijnenburg YAL, Verwey NA, Flier WM, Scheltens P, Teunissen CE. Discriminative and prognostic potential of cerebrospinal fluid phosphoTau/tau ratio and neurofilaments for frontotemporal dementia subtypes. *Alzheimers Dement Diagn Assess Dis Monit*. 2015 Dec;1(4):505–12.
449. van der Ende EL, Meeter LH, Poos JM, Panman JL, Jiskoot LC, Dopfer EGP, et al. Serum neurofilament light chain in genetic frontotemporal dementia: a longitudinal, multicentre cohort study. *Lancet Neurol*. 2019 Dec;18(12):1103–11.
450. Abu-Rumeileh S, Mometto N, Bartoletti-Stella A, Polischi B, Oppi F, Poda R, et al. Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Patients with Frontotemporal Dementia Spectrum: A Single-Center Study. Engelborghs S, editor. *J Alzheimers Dis*. 2018 Oct 30;66(2):551–63.
451. Meeter LH, Dopfer EG, Jiskoot LC, Sanchez-Valle R, Graff C, Benussi L, et al. Neurofilament light chain: a biomarker for genetic frontotemporal dementia. *Ann Clin Transl Neurol*. 2016 Jul 1;3(8):623–36.



452. Palermo G, Mazzucchi S, Della Vecchia A, Siciliano G, Bonuccelli U, Azuar C, et al. Different Clinical Contexts of Use of Blood Neurofilament Light Chain Protein in the Spectrum of Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2020 Nov;57(11):4667–91
453. Steinacker P, Anderl-Straub S, Diehl-Schmid J, Semler E, Uttner I, von Arnim CAF, et al. Serum neurofilament light chain in behavioral variant frontotemporal dementia. *Neurology*. 2018 Oct 9;91(15):e1390–401.
454. Varhaug KN, Torkildsen Ø, Myhr K-M, Vedeler CA. Neurofilament Light Chain as a Biomarker in Multiple Sclerosis. *Front Neurol*. 2019 Apr 5;10:338.
455. Kušnierová P, Zeman D, Hradílek P, Čábal M, Zapletalová O. Neurofilament levels in patients with neurological diseases: A comparison of neurofilament light and heavy chain levels. *J Clin Lab Anal*. 2019 Sep;33(7):e22948.
456. Li D, Shen D, Tai H, Cui L. Neurofilaments in CSF As Diagnostic Biomarkers in Motor Neuron Disease: A Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci*. 2016 Nov 29;8:290.
457. Wilke C, Pujol-Calderón F, Barro C, Stransky E, Blennow K, Michalak Z, et al. Correlations between serum and CSF pNfH levels in ALS, FTD and controls: a comparison of three analytical approaches. *Clin Chem Lab Med CCLM*. 2019 Sep 25;57(10):1556–64.
458. De Schaepdryver M, Jeromin A, Gille B, Claeys KG, Herbst V, Brix B, et al. Comparison of elevated phosphorylated neurofilament heavy chains in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Apr;89(4):367–73.
459. de Jong D, Jansen RWMM, Pijnenburg YAL, van Geel WJA, Borm GF, Kremer HPH, et al. CSF neurofilament proteins in the differential diagnosis of dementia. *J Neurol Neurosurg Amp Psychiatry*. 2007 Sep 1;78(9):936–8.
460. Brettschneider J, Petzold A, Schöttle D, Claus A, Riepe M, Tumani H. The Neurofilament Heavy Chain (NfH<sup>SMIB5</sup>) in the Cerebrospinal Fluid Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006;21(5–6):291–5.
461. Pijnenburg YAL, Janssen JC, Schoonenboom NSM, Petzold A, Mulder C, Stigbrand T, et al. CSF Neurofilaments in Frontotemporal Dementia Compared with Early Onset Alzheimer's Disease and Controls. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007;23(4):225–30.
462. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug;256(5517):495–7.
463. Klausen MS, Anderson MV, Jespersen MC, Nielsen M, Marcatili P. LYRA, a webserver for lymphocyte receptor structural modeling. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jul 1;43(W1):W349–55.
464. Sela-Culang I, Benhnia MR-E-I, Matho MH, Kaefer T, Maybeno M, Schlossman A, et al. Using a Combined Computational-Experimental Approach to Predict Antibody-Specific B Cell Epitopes. *Structure*. 2014 Apr;22(4):646–57.

465. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jul 3;45(W1):W24-W29.
466. Larsen J, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res.* 2006 Apr 24;2:2.
467. Erlanger BF. The preparation of antigenic Hapten-Carrier conjugates: A survey. *Methods in Enzymology.* Elsevier. 1980;70:85–104.
468. Atherton E, Fox H, Harkiss D, Logan CJ, Sheppard RC, Williams BJ. A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylamino-acids. *J Chem Soc Chem Commun.* 1978;(13):537.
469. Neumann M, Kwong LK, Lee EB, Kremmer E, Flatley A, Xu Y, et al. Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. *Acta Neuropathol (Berl).* 2009 Feb;117(2):137–49.
470. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2001;70(6):849–60.
471. Littlefield JW. Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts in vitro and Their Presumed Recombinants. *Science.* 1964 Aug 14;145(3633):709–10.
472. Gefter ML, Margulies DH, Scharff MD. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somatic Cell Genet.* 1977 Mar;3(2):231–6.
473. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug;227(5259):680–5.
474. Koller A, Wätzig H. Precision and variance components in quantitative gel electrophoresis. *ELECTROPHORESIS.* 2005 Jun;26(12):2470–5.
475. Kokoulina P, Rohn TT. Caspase-Cleaved Transactivation Response DNA-Binding Protein 43 in Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies. *Neurodegener Dis.* 2010;7(4):243-50.
476. Rohn TT. Caspase-cleaved TAR DNA-binding protein-43 is a major pathological finding in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2008 Sep;1228:189–98.
477. Kwong LK, Irwin DJ, Walker AK, Xu Y, Riddle DM, Trojanowski JQ, et al. Novel monoclonal antibodies to normal and pathologically altered human TDP-43 proteins. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Dec;2(1):33.
478. Che M, Jiang Y, Xie Y, Jiang L, Hu H. Aggregation of the 35- kDa fragment of TDP-43 causes formation of cytoplasmic inclusions and alteration of RNA processing. *FASEB J.* 2011 Jul;25(7):2344–53.

479. Vanderstichele H, Bibl M, Engelborghs S, Le Bastard N, Lewczuk P, Molinuevo JL, et al. Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: A consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement*. 2012 Jan;8(1):65–73.
480. Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 10;106(6):1760–5.
481. Guan Y, Zhu Q, Huang D, Zhao S, Jan Lo L, Peng J. An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide. *Sci Rep*. 2015 Oct;5(1):13370.
482. Budini M, Romano V, Quadri Z, Buratti E, Baralle FE. TDP-43 loss of cellular function through aggregation requires additional structural determinants beyond its C-terminal Q/N prion-like domain. *Hum Mol Genet*. 2015 Jan 1;24(1):9–20.
483. Musaeus CS, Gleeup HS, Høgh P, Waldemar G, Hasselbalch SG, Simonsen AH. Cerebrospinal Fluid/Plasma Albumin Ratio as a Biomarker for Blood-Brain Barrier Impairment Across Neurodegenerative Dementias. *J Alzheimers Dis*. 2020 May 19;75(2):429–36.
484. Sage JM, Hall L, McVey A, Barohn RJ, Statland JM, Jawdat O, et al. Use of Capillary Electrophoresis Immunoassay to Search for Potential Biomarkers of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Human Platelets. *J Vis Exp*. 2020 Feb 10;156.
485. MacLeod R, Tibben A, Frontali M, Evers-Kiebooms G, Jones A, Martinez-Descales A, et al. Recommendations for the predictive genetic test in Huntington's disease: Recommendations for the predictive genetic test in Huntington's disease. *Clin Genet*. 2013 Mar;83(3):221–31.
486. Mattsson N, Andreasson U, Persson S, Carrillo MC, Collins S, Chalbot S, et al. CSF biomarker variability in the Alzheimer's Association quality control program. *Alzheimers Dement*. 2013 May;9(3):251–61.
487. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, et al. Dynamic Visualization of Thrombopoiesis Within Bone Marrow. *Science*. 2007 Sep 21;317(5845):1767–70.
488. Wilson DH, Rissin DM, Kan CW, Fournier DR, Piech T, Campbell TG, et al. The Simoa HD-1 Analyzer: A Novel Fully Automated Digital Immunoassay Analyzer with Single-Molecule Sensitivity and Multiplexing. *J Lab Autom*. 2016 Aug;21(4):533–47.
489. Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, Howes SC, Fournier DR, Song L, et al. Single-Molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol*. 2010 Jun;28(6):595–9.
490. Ichikawa T, Baba H, Maeshima H, Shimano T, Inoue M, Ishiguro M, et al. Serum levels of TDP-43 in late-life patients with depressive episode. *J Affect Disord*. 2019 May;250:284–8.

491. Ren Y, Li S, Chen S, Sun X, Yang F, Wang H, et al. TDP-43 and Phosphorylated TDP-43 Levels in Paired Plasma and CSF Samples in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurol*. 2021 Jun 14;12:663637.
492. Hampel H, O'Bryant SE, Molinuevo JL, Zetterberg H, Masters CL, Lista S, et al. Blood-based biomarkers for Alzheimer disease: mapping the road to the clinic. *Nat Rev Neurol*. 2018 Nov;14(11):639–52.
493. Fourier A, Formaglio M, Kaczorowski F, Mollion H, Perret-Liaudet A, Sauvee M, et al. A combination of total tau and neurofilaments discriminates between neurodegenerative and primary psychiatric disorders. *Eur J Neurol*. 2020 Jul;27(7):1164–9.
494. Papa L, Akinyi L, Liu MC, Pineda JA, Tepas JJ, Oli MW, et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase is a novel biomarker in humans for severe traumatic brain injury\*: *Crit Care Med*. 2010 Jan;38(1):138–44.
495. Tongaonkar P, Chen L, Lambertson D, Ko B, Madura K. Evidence for an Interaction between Ubiquitin-Conjugating Enzymes and the 26S Proteasome. *Mol Cell Biol*. 2000 Jul 1;20(13):4691–8.
496. Matuszczak E, Tylicka M, Komarowska MD, Debek W, Hermanowicz A. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 – physiology and pathology. *Cell Biochem Funct*. 2020 Jul;38(5):533–40.
497. Höller D, Dikic I. Receptor endocytosis via ubiquitin-dependent and -independent pathways. *Biochem Pharmacol*. 2004 Mar;67(6):1013–7.
498. Reddy SS, Shruthi K, Reddy VS, Raghu G, Suryanarayana P, Giridharan NV, et al. Altered ubiquitin-proteasome system leads to neuronal cell death in a spontaneous obese rat model. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 2014 Sep;1840(9):2924–34.
499. Freeman MR. Specification and Morphogenesis of Astrocytes. *Science*. 2010 Nov 5;330(6005):774–8.
500. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2011 Mar;93(3):421–43.
501. Yue JK, Yuh EL, Korley FK, Winkler EA, Sun X, Puffer RC, et al. Association between plasma GFAP concentrations and MRI abnormalities in patients with CT-negative traumatic brain injury in the TRACK-TBI cohort: a prospective multicentre study. *Lancet Neurol*. 2019 Oct;18(10):953–61.
502. Foerch C, Niessner M, Back T, Bauerle M, De Marchis GM, Ferbert A, et al. Diagnostic Accuracy of Plasma Glial Fibrillary Acidic Protein for Differentiating Intracerebral Hemorrhage and Cerebral Ischemia in Patients with Symptoms of Acute Stroke. *Clin Chem*. 2012 Jan 1;58(1):237–45.
503. Jesse S, Steinacker P, Cepek L, Arnim CV, Tumani H, Lehnert S, et al. Glial Fibrillary Acidic Protein and Protein S-100B: Different Concentration Pattern of Glial Proteins in Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer's Disease and Creutzfeldt-Jakob Disease. *J Alzheimers Dis*. 2009 Jul 1;17(3):541–51.

504. Lant SB, Robinson AC, Thompson JC, Rollinson S, Pickering-Brown S, Snowden JS, et al. Patterns of microglial cell activation in frontotemporal lobar degeneration: Microglia and frontotemporal lobar degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014 Oct;40(6):686–96.
505. Pennington K, Beasley CL, Dicker P, Fagan A, English J, Pariante CM, et al. Prominent synaptic and metabolic abnormalities revealed by proteomic analysis of the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 2008 Dec;13(12):1102–17.
506. Wilke C, Preische O, Deuschle C, Roeben B, Apel A, Barro C, et al. Neurofilament light chain in FTD is elevated not only in cerebrospinal fluid, but also in serum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 Nov;87(11):1270–2.
507. Andersson E, Janelidze S, Lampinen B, Nilsson M, Leuzy A, Stomrud E, et al. Blood and cerebrospinal fluid neurofilament light differentially detect neurodegeneration in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2020 Nov;95:143–53.
508. Adiutori R, Aarum J, Zubiri I, Bremang M, Jung S, Sheer D, et al. The proteome of neurofilament-containing protein aggregates in blood. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 May 25;498:168–77.
509. Brophy GM, Mondello S, Papa L, Robicsek SA, Gabrielli A, Tepas J, et al. Biokinetic Analysis of Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L1 (UCH-L1) in Severe Traumatic Brain Injury Patient Biofluids. *J Neurotrauma*. 2011 Jun;28(6):861–70.
510. Oeckl P, Weydt P, Steinacker P, Anderl-Straub S, Nordin F, Volk AE, et al. Different neuroinflammatory profile in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia is linked to the clinical phase. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019 Jan;90(1):4–10.
511. Li R, Wang J, Xie W, Liu J, Wang C. UCHL1 from serum and CSF is a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020;7(8):1420–8.
512. Ducharme S, Dols A, Laforce R, Devenney E, Kumfor F, van den Stock J, et al. Recommendations to distinguish behavioural variant frontotemporal dementia from psychiatric disorders. *Brain*. 2020 Jun 1;143(6):1632–50.
513. Reijls BLR, Teunissen CE, Goncharenko N, Betsou F, Blennow K, Baldeiras I, et al. The Central Biobank and Virtual Biobank of BIOMARKAPD: A Resource for Studies on Neurodegenerative Diseases. *Front Neurol*. 2015 Oct 15;6:216
514. Barro C, Benkert P, Disanto G, Tsagkas C, Amann M, Naegelin Y, et al. Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain*. 2018 Aug 1;141(8):2382–91.
515. Gendron TF, Daugherty LM, Heckman MG, Diehl NN, Wu J, Miller TM, et al. Phosphorylated neurofilament heavy chain: A biomarker of survival for *C9ORF72* - associated amyotrophic lateral sclerosis: *C9ORF72* ALS Prognostic. *Ann Neurol*. 2017 Jul;82(1):139–46.
516. Poesen K, Van Damme P. Diagnostic and Prognostic Performance of Neurofilaments in ALS. *Front Neurol*. 2019 Jan 18;9:1167.

517. Benatar M, Turner MR, Wu J. Defining pre-symptomatic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2019 Jul 3;20(5–6):303–9.
518. Weydt P, Oeckl P, Huss A, Müller K, Volk AE, Kuhle J, et al. Neurofilament levels as biomarkers in asymptomatic and symptomatic familial amyotrophic lateral sclerosis: Biomarkers in ALS. *Ann Neurol*. 2016 Jan;79(1):152–8.
519. Zucchi E, Bonetto V, Sorarù G, Martinelli I, Parchi P, Liguori R, et al. Neurofilaments in motor neuron disorders: towards promising diagnostic and prognostic biomarkers. *Mol Neurodegener*. 2020 Dec;15(1):58.
520. Ferrari R, Manzoni C, Hardy J. Genetics and molecular mechanisms of frontotemporal lobar degeneration: an update and future avenues. *Neurobiol Aging*. 2019 Jun;78:98–110.
521. Barschke P, Oeckl P, Steinacker P, Al Shweiki MR, Weishaupt JH, Landwehrmeyer GB, et al. Different CSF protein profiles in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia with *C9orf72* hexanucleotide repeat expansion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020 May;91(5):503–11.
522. Zhu S, Wuolikainen A, Wu J, Öhman A, Wingsle G, Moritz T, et al. Targeted Multiple Reaction Monitoring Analysis of CSF Identifies UCHL1 and GPNMB as Candidate Biomarkers for ALS. *J Mol Neurosci*. 2019;69(4):643–57.
523. Demirel ÖF, Cetin İ, Turan Ş, Sağlam T, Yıldız N, Duran A. Decreased Expression of  $\alpha$ -Synuclein, Nogo-A and UCH-L1 in Patients with Schizophrenia: A Preliminary Serum Study. *Psychiatry Investig*. 2017;14(3):344.
524. Abu-Rumeileh S, Steinacker P, Polisch B, Mammana A, Bartoletti-Stella A, Oeckl P, et al. CSF biomarkers of neuroinflammation in distinct forms and subtypes of neurodegenerative dementia. *Alzheimers Res Ther*. 2020 Dec;12(1):2.
525. Ishiki A, Kamada M, Kawamura Y, Terao C, Shimoda F, Tomita N, et al. Glial fibrillar acidic protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and frontotemporal lobar degeneration. *J Neurochem*. 2016 Jan;136(2):258–61.
526. Marelli C, Hourregue C, Gutierrez L-A, Paquet C, Menjot de Champfleury N, De Verbizier D, et al. Cerebrospinal Fluid and Plasma Biomarkers do not Differ in the Presenile and Late-Onset Behavioral Variants of Frontotemporal Dementia. Borroni B, editor. *J Alzheimers Dis*. 2020 Apr 7;74(3):903–11.
527. Heller C, Foiani MS, Moore K, Convery R, Bocchetta M, Neason M, et al. Plasma glial fibrillary acidic protein is raised in progranulin-associated frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020 Mar;91(3):263–70.
528. Xiong P, Zeng Y, Wu Q, Huang DXH, Zainal H, Xu X, et al. Combining Serum Protein Concentrations to Diagnose Schizophrenia: A Preliminary Exploration. *J Clin Psychiatry*. 2014 Aug 26;75(08):e794–801.
529. Serrano GE, Intorcchia A, Carew J, Chiarolanza G, Hidalgo JA, Sue LI, et al. Feasibility Study: Comparison of Frontal Cortex Needle Core Versus Open Biopsy for Detection of Characteristic Proteinopathies of Neurodegenerative Diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015 Sep;74(9):934–42.

530. Leuzy A, Ashton NJ, Mattsson-Carlgrén N, Dodich A, Boccardi M, Corre J et al. 2020 update on the clinical validity of cerebrospinal fluid amyloid, tau, and phospho-tau as biomarkers for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021 Jul;48(7):2121–39.
531. Ashton NJ, Leuzy A, Karikari TK, Mattsson-Carlgrén N, Dodich A, Boccardi M et al. The validation status of blood biomarkers of amyloid and phospho-tau assessed with the 5-phase development framework for AD biomarkers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021 Jul;48(7):2140-2156.