



HAL
open science

Impact de la phosphorylation du domaine C-terminal de TDP-43 sur son autoassemblage : implications dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA)

Celia Rabhi

► To cite this version:

Celia Rabhi. Impact de la phosphorylation du domaine C-terminal de TDP-43 sur son autoassemblage : implications dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Biologie cellulaire. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL072 . tel-04721001

HAL Id: tel-04721001

<https://theses.hal.science/tel-04721001v1>

Submitted on 4 Oct 2024

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.

Impact de la phosphorylation du domaine C-terminal de TDP-43 sur son autoassemblage : implications dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA)

*Impact of phosphorylation of the C-terminal domain of TDP-43 on its
self-assembly: implications in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577 : structure et dynamique des systèmes vivants
Spécialité de doctorat : Biologie Moléculaire et Cellulaire
Graduate School: Life Science and Health. Référent : Université d'Évry Val d'Essonne

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Structure-Activité des Biomolécules
Normales et Pathologiques (Université Paris-Saclay, Inserm, Univ Évry)**,
Sous la direction de David Pastré, Professeur et Ahmed Bouhss, Chargé de Recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 15 septembre 2023, par

Célia RABHI

Composition du Jury

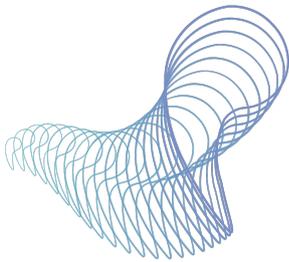
Membres du jury avec voix délibérative

Zoher GUÉROUI Directeur de Recherche, CNRS, ENS Paris-Saclay	Président
Hélène BLASCO Professeur, INSERM, Univ de Tours	Rapporteure
Séverine BOILLÉE Directrice de Recherche, INSERM, Institut du Cerveau et de la Moelle Épinière	Rapporteure
Andrea BURGO Maître de Conférences, INSERM, Généthon	Examineur



sabnp

LABORATOIRE STRUCTURE ET ACTIVITE
DES BIOMOLECULES
NORMALES ET PATHOLOGIQUES



4P-Pharma

Translating Science to Medicine
for Patients



SYNSIGHT



université
PARIS-SACLAY

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement l'ensemble des membres du jury, en commençant par le président, Zoher Guéroui, les rapporteurs, Hélène Blasco et Séverine Boillée, et l'examineur, Andréa Burgo, qui ont consacré du temps à la relecture de ce travail, se sont assurés de la cohérence des travaux présentés, et qui ont contribué à la finalisation de ce manuscrit. Je vous remercie de m'avoir fait le plaisir d'accepter d'évaluer mes travaux de thèse. Mes sincères remerciements vont également à mes directeurs de thèse, David Pastré et Ahmed Bouhss, qui m'ont guidé tout au long de ce projet tout en me laissant une certaine autonomie dans sa réalisation. Leur disponibilité et leur implication ont été déterminantes dans ce projet. Merci pour votre accueil dans le laboratoire. Je suis également reconnaissante envers mes encadrants de chez 4P-Pharma, Revital Rattenbach et Céline MARTIN, qui m'ont permis de réaliser cette thèse et qui m'ont guidé jusqu'à la fin pour ce projet de recherche. Je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers Revital Rattenbach, CEO de 4P-Pharma, pour sa disponibilité, son soutien, ses conseils et sa bienveillance. Tu m'as énormément apporté, tant sur le plan scientifique qu'humain, et tu m'as poussé à rêver plus grand et à sortir de ma zone de confort. Je ne pourrai jamais te remercier assez. Merci d'avoir pris le temps de relire ma thèse, malgré ton emploi du temps chargé. Je remercie également Céline MARTIN, qui m'a accompagné tout au long de ma thèse. J'ai apprécié tes conseils et la liberté que tu m'as accordée pour travailler en autonomie. Je tiens encore à remercier la société 4P-Pharma de m'avoir accueilli, sans vous ma thèse n'aurait pas eu la même saveur. En particulier, je remercie Roselina Lam et Luigi Formicola, pour leur contribution dans l'avancée de ma thèse, pour leur bienveillance et leurs conseils. Je remercie toutes les personnes qui n'ont pas hésité à m'apporter leur aide à 4P-Pharma que ce soient les Parisiens ou les Lillois. Je suis très heureuse de vous avoir rencontré. Merci encore à Éléonore Cardon, Anne-Claire Gaudiez, Emmanuel Dadge et Mohammed Boujnan pour leur implication dans l'organisation de mon pot de thèse.

Mes remerciements vont également à tous mes collègues du laboratoire SABNP, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Tout d'abord, Vandana Joshi, pour ses précieux conseils en biologie cellulaire et moléculaire et sa bienveillance. Ta bonne humeur contagieuse, tes gâteaux parfumés aux saveurs de l'Inde et ton guacamole vont me manquer. Je voudrais également remercier Juan-Carlos Rengifo, alias « Moulée », pour les expériences en RMN réalisées dans le cadre de mon projet. Merci pour tes conseils en musculation et en diététique. Je tiens aussi à remercier Nicolas Babault, qui m'a accompagné et conseillé tout au long du criblage de molécules. Je tiens aussi à exprimer ma gratitude envers Bénédicte Desforgues pour l'aide fournie en biologie cellulaire. Merci à Toi Jean Salone pour ta gentillesse, sans toi le laboratoire ne pourrait fonctionner. Merci à Alexandre Maucuer, qui a répondu à toutes mes questions, sur un brin d'humour et qui m'a guidé dans la réalisation des lignées stables. Merci également à Serhii Pankivskyi, unique post-doc du laboratoire, qui m'a aidé à interpréter mes gels de western blot. Merci également à Andréa Burgo, membre de mon comité de thèse, qui a suivi l'avancée de mon travail. Je remercie Olek Maciejak, notre fournisseur officiel de donuts et tiramisu. Je remercie également Marie-Jeanne Clément et Yitian FENG qui ont participé aux expériences RMN. Je tiens à remercier Lydia Lebouil, pour sa disponibilité en cas de difficulté et sa bonne humeur légendaire. Mes remerciements s'adressent également à Antoine Spiers, stagiaire de Master 2, avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger et de guider à distance. Je remercie également tous les autres doctorants du laboratoire, avec qui j'ai eu le plaisir de discuter, de manger et qui ont également eu le plaisir de m'entendre chanter en salle de biochimie : Efgeniia Mamontonva, Virginie Bernard, Anastasiia Samsonova, Nolan Chen, Diane Valenti et Kimberley Gargoly.

Je souhaite également remercier mon compagnon Lucas, qui m'a soutenu de manière inébranlable tout au long de ces trois années et qui me permet chaque jour de devenir une meilleure personne. Ta présence est un cadeau précieux dans ma vie.

Merci à tous mes amis qui m'ont soutenu jusqu'à présent et qui me feront l'honneur d'être présent le jour de ma soutenance.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, mon soutien inconditionnel. En particulier, mes parents et mes sœurs qui ont toujours été là pour moi. Je tiens tout particulièrement à remercier ma petite sœur qui m'a préparé de bons petits plats pendant que j'écrivais ma thèse et passais en parallèle plusieurs examens pour mon MBA.

Je dédie ma thèse à mes parents, qui ont constamment fait des sacrifices pour nous permettre de poursuivre des études supérieures et réaliser nos rêves. Sans vous, je n'aurai pas pu aller aussi loin.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	4
Abréviations	6
Avant-Propos	10
Introduction	12
Chapitre I- La sclérose latérale amyotrophique (SLA)	12
1.1.1 Définition.....	12
1.1.2 Spectre clinique de la SLA.....	13
1.1.2.1 Épidémiologie	13
1.1.2.2 Hétérogénéité des phénotypes cliniques	14
1.1.2.3 Contribution génétique.....	17
1.1.2.4 Diagnostic de la SLA	23
1.1.3 Mécanismes physiopathologiques	24
1.1.3.1 Métabolisme de l'ARN	24
1.1.3.2 Transport nucléo-cytoplasmique	26
1.1.3.3 Stress oxydant et la dysfonction mitochondriale.....	27
1.1.3.4 Excitotoxicité.....	28
1.1.3.5 Neuro-inflammation et contribution gliale.....	29
1.1.3.6 Autres mécanismes physiopathologiques	30
1.1.4 Approches thérapeutiques	31
1.1.4.1 Approches pharmacologiques	31
1.1.4.2 Approches alternatives	32
Chapitre II- La protéine de liaison à l'ARN, TDP-43	37
1.1.5 Caractéristiques générales	37
1.1.6 Physiologie de TDP-43	38
1.1.6.1 Structure	38
1.1.6.2 Fonctions biologiques	45
1.1.7 Physiopathologie de TDP-43.....	52
1.1.7.1 Délocalisation cytosolique	52
1.1.7.2 Mutations pathologiques.....	53
1.1.7.3 Modifications post-traductionnelles.....	55
1.1.7.4 Mécanismes de perte ou de gain de fonction	58
Chapitre III- Auto-association de TDP-43 et le processus de séparation de phase liquide-liquide (LLPS)	62
1.1.8 Découverte des LLPS	62
1.1.9 Caractéristiques générales des LLPS.....	63
1.1.9.1 Diagramme de phase	63
1.1.9.2 Méthodes d'observation et d'étude des LLPS	65
1.1.9.3 Diversité des condensats	66
1.1.9.4 Fonctions physiologiques des LLPS	67
1.1.9.5 Les interactions multivalentes	69
1.1.9.6 Les régions IDR sont suffisantes pour l'organisation des structures LLPS	70
1.1.10 Condensats spécifiques à TDP-43	73
1.1.11 Le modèle de l'agrégation de TDP-43 : « la transition de phase liquide à solide »	75
1.1.12 Les granules de stress comme interface à l'agrégation des protéines	77
1.1.13 Stratégie de modulation des phases anormales de TDP-43	80

1.1.14	Régulation des phases liquides de TDP-43	84
1.1.15	Les modifications post-traductionnelles.....	85
Chapitre IV- La phosphorylation de TDP-43		87
1.1.16	Le rôle de la phosphorylation dans la pathologie.....	87
1.1.17	Les sites de phosphorylation de TDP-43.....	88
1.1.18	Régulation de la phosphorylation de TDP-43	89
1.1.18.1	Les kinases	89
1.1.18.2	Les phosphatases	92
1.1.19	Conséquences de la phosphorylation de TDP-43	93
1.1.19.1	Effet sur la localisation subcellulaire.....	93
1.1.19.2	Effet sur l'activité d'épissage des ARNm.....	94
1.1.19.3	Effet sur la solubilité et l'agrégation	94
Objectifs de la thèse		96
Matériel et méthodes.....		99
•	Méthodes en Biologie Cellulaire.....	99
a)	Microscope à haut contenu (HCS)	99
b)	Méthode du <i>Microtubule bench (MT bench)</i>	101
Résultats		105
Discussion.....		170
Conclusion et perspectives.....		179
Table des illustrations.....		187
Liste des tableaux		188
Références.....		189

Abréviations

Un nombre important d'abréviations listées ci-dessous sont tirées de la littérature anglophone. Le choix a été fait de conserver la terminologie technique dans le texte avec la traduction associée pour une meilleure compréhension.

aa	<i>Amino acids</i> -Acides aminés
ADNsb	<i>Double-strand DNA</i> -ADN double brin
ANG	<i>Angiogenin</i> -Angiogénine
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
miARN	Micro-ARN
ARNlnc	Long ARN non-codant
ARNr	<i>Ribosomal RNA</i> - ARN ribosomique
ARNsca	<i>Small Cajal body-specific RNAs</i> -Petits ARN spécifiques du corps de Cajal
ASO	<i>Antisens oligonucleotides</i> -Oligonucléotide anti-sens
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> -Adénosine triphosphate
ATXN2	<i>Ataxin-2</i> -Ataxine-2
C9ORF72	<i>Chromosome 9 open reading frame 72</i> -Cadre de lecture ouvert 72 sur le chromosome 9)
CBs	<i>Cajal bodies</i> - Corps de Cajal
CHCHD10	<i>Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein</i>
CHMP7	<i>Charged multivesicular body protein 7</i> -Protéine 7 du corps multivésiculaire chargé
CLIP	<i>Cross-linking and immunoprecipitation</i> -Immunoprécipitation croisée
CSM	<i>Mesenchymal stem cells</i> -Cellules souches mésenchymateuses
CTD	<i>C-terminal domain</i> -Domaine C-terminal
CTF	<i>C-terminal fragments</i> -Fragments C-terminaux
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> -Régulateur de conductance transmembranaire de la mucoviscidose

CR	<i>Conserved region</i> -Région conservée
DCTN1	<i>Dynactin subunit 1</i> -Sous-unité de la dynactine
DFT	Dégénérescences Fronto-Temporales
EWS	<i>Ewing's sarcoma</i> -Sarcome d'Ewing
FDA	<i>Food and drug administration</i> -Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FET	<i>FUS, EWSR1, TAF15</i>
FRET	<i>Föster resonance energy transfer</i> -Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
FTLD	Dégénérescence lobaire fronto-temporale
FUS	<i>Fused in sarcoma/Translocated in sarcoma</i> -Transloqué dans le sarcoma
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> -Protéine fluorescente verte
GS	Granules de stress
GU	Guanine-Uracil (motif)
HA	Étiquette de 6 histidines
HCS	<i>High-content screening</i> -Criblage à haut contenu
HnRNP	<i>Human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i> - Ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène humaine
iCLIP	<i>Individual-nucleotide resolution cross-linking immunoprecipitation</i> (Technique d'identification des interactions protéine-ARN)
IDR	<i>Intrinsically disordered region</i> -Région intrinsèquement désordonnée
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cells</i> -Cellules souches pluripotentes induites
LARKs	<i>Low complexity aromatic-rich kinded segment/Low-complexity amyloid-like reversible kinded segment</i> -Segment de faible complexité riche en aromatiques/de type amyloïde réversible
LATE	<i>Limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy</i> -Encéphalopathie TDP-43 à prédominance limbique liée à l'âge
LCD	<i>Low complexity domain</i> -Domaine de faible complexité
LLPS	<i>Liquid-liquid Phase separation</i> -Transition/séparation de phase liquide-liquide
LMN	<i>Lower Motor Neuron</i> -Motoneurones inférieurs
MBD	<i>Microtubule Binding Domain</i> -Domaine de liaison aux microtubules
MLO	<i>Membraneless organelles</i> - Organites sans membrane
MND	Maladies neurodégénératives

MPT	Modifications post-traductionnelles
MT bench	<i>Microtubule bench</i>
NES	<i>Nuclear exportation signal</i> -Signal d'exportation nucléaire
NfL	<i>Neurofilament light chain</i> -Neurofilament à chaînes légères
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> -Signal de localisation nucléaire
NPC	<i>Nuclear pore complex</i> -Complexe de pores nucléaires
Nrf2	<i>Erythroid 2-related factor 2</i> -Facteur de transcription érythroïde 2
NTD	<i>N-terminal domain</i> -Domaine N-terminal
Nup107	<i>Nucleoporin 107</i> -Nucléoporine 107
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> -Tampon phosphate salin
PFA	Paraformaldéhyde
PL	Pleine longueur
PrLD	<i>Prion-like domain</i> -Domaine de type Prion
Ran	<i>Ras-related nuclear protein</i> -Petite protéine G Ran
RanGAP1	<i>Ran GTPase-activating protein 1</i> -Protéine activatrice de la GTPase Ran 1
RBP	<i>RNA binding protein</i> -Protéine de liaison à l'ARN
RE	<i>Endoplasmic reticulum</i> -Réticulum endoplasmique
RFP	<i>Red fluorescent protein</i> -Protéine fluorescente rouge
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNP	<i>Ribonucleoprotein</i> -Protéine Ribonucléique
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i> -Espèces réactives de l'azote
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> -Espèces réactives de l'oxygène
RRM	<i>RNA Recognition Motif</i> -Motif de reconnaissance de l'ARN
RSS	<i>Reactive sulfur species</i> -Espèces réactives du soufre
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> -Dodécylsulfate de sodium
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SLAf	Forme familiale de la SLA
SLAj	Forme juvénile de la SLA
SLAs	Forme sporadique de la SLA
SNC	Système nerveux central
SOD1	<i>Superoxide dismutase type 1</i> -La superoxyde dismutase 1

STMN2	<i>Stathmin 2</i> -Stathmine 2
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i> -Petit modificateur de type ubiquitine
TAF-15	<i>TATA-box binding protein associated factor 15</i> -Facteur 15 associé à la protéine de liaison à la TATA box
TDP-43	<i>Transactive response DNA-binding protein of 43 kDa</i>
UMN	Upper motor neurons-Motoneurones supérieurs
UNC13A	<i>Unc-13 Homolog A</i> -Homologue A de l'Unc-13
UTR	<i>Untranslated region</i> -Région non traduite

Avant-Propos

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative grave, caractérisée par la dégénérescence des motoneurones. Les agrégats de la protéine TDP-43 sont fréquemment observés dans la SLA et jouent un rôle central dans la pathologie de la maladie. TDP-43 est une protéine essentielle qui régule divers processus liés au métabolisme de l'ARN dans les cellules. Dans les régions cérébrales affectées des patients atteints de SLA, TDP-43 subit des changements progressifs, notamment une déplétion nucléaire, une mauvaise localisation dans le cytoplasme, une mauvaise conformation, des modifications post-traductionnelles (MPT), une autoassociation aberrante (LLPS), et l'assemblage en espèces pathologiques distinctes avant de former des inclusions. On pensait auparavant que l'accumulation de TDP-43 dans le cytoplasme était le principal facteur de toxicité neuronale et de dysfonctionnement. Cependant, il a été observé que la perte de TDP-43 normal dans le noyau pouvait également contribuer à la neurodégénérescence, même en l'absence d'inclusions de TDP-43 dans le cytoplasme.

Parmi les MPT pathologiques associées à la SLA, on retrouve la phosphorylation de certains résidus sérines C-terminaux de la protéine TDP-43, en particulier les sérines S409/410, qui constitue une signature significative de la maladie. Cette MPT serait associée à une mauvaise localisation de TDP-43 dans le cytoplasme et à son agrégation toxique dans les neurones. En revanche, les mécanismes précis à l'origine de ces modifications et de l'agrégation de TDP-43 demeurent peu clairs.

Ainsi, mon projet de thèse a pour objectif d'élucider les mécanismes sous-jacents à l'autoassociation de TDP-43 (LLPS) et à l'agrégation pathologique en relation avec sa phosphorylation, en vue d'identifier des inhibiteurs de kinases et de phosphatases pouvant moduler les autoassemblages cytoplasmiques de TDP-43. Pour cela, j'ai développé une nouvelle approche *in cellulo* automatisée pour quantifier les autoassemblages de TDP-43 dépendants de la phosphorylation de son domaine C-terminal. Cette méthode, basée sur l'imagerie à haute résolution et le Microtubule Bench

(MTbench), s'est avérée sensible pour détecter les altérations dans la miscibilité de TDP-43 en fonction de son état de phosphorylation. Le résultat principal de mon projet de thèse est que l'hypo-phosphorylation C-terminale de TDP-43 augmente l'autoassemblage de TDP-43 dans le cytoplasme ce qui antagonise son import nucléaire et conduit à sa déplétion dans le noyau.

Dans un premier chapitre, nous aborderons la maladie en commençant par décrire le spectre clinique de la SLA et les mécanismes physiopathologiques associés. Dans un deuxième chapitre, nous procéderons à la caractérisation de TDP-43. Nous examinerons à la fois la structure et les fonctions biologiques de la protéine en approfondissant les processus physiopathologiques dans lesquels elle est impliquée. Le troisième chapitre sera consacré à l'autoassociation de TDP-43 (LLPS). Enfin, nous passerons en revue le rôle de la phosphorylation de TDP-43 dans la SLA. Dans un deuxième chapitre, nous décrirons les objectifs de ce travail de thèse, et présenterons les principaux résultats obtenus.

En conclusion, cette thèse apporte une contribution significative à la compréhension des mécanismes sous-jacents à la pathologie de la SLA, en se concentrant sur le rôle central de la protéine TDP-43 et de sa phosphorylation. Les résultats mettent en évidence l'importance de la phosphorylation du domaine C-terminal de TDP-43 dans la régulation de son autoassemblage et de sa localisation subcellulaire. De plus, l'identification d'inhibiteurs de kinases et de phosphatases qui modulent spécifiquement l'autoassemblage de TDP-43 ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques pour la SLA. Ces inhibiteurs ou d'autres composés pourraient potentiellement être utilisés pour réduire l'agrégation pathologique de TDP-43 dans le cytoplasme et favoriser sa relocalisation nucléaire. Ainsi, ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de thérapies visant à restaurer la localisation nucléaire de TDP-43 et à atténuer les manifestations pathologiques associées à son agrégation cytoplasmique.

Introduction

Chapitre I- La sclérose latérale amyotrophique (SLA)

1.1.1 Définition

La SLA a été décrite pour la première fois en 1869 par le neurologue français Jean-Martin Charcot. Ce dernier a inventé en 1874 la désignation SLA qui provient des anomalies qui ont été observées à l'œil nu (« amyotrophique ») ou à l'échelle microscopique (« sclérose » et « latérale ») en utilisant la méthode anatomo-clinique qu'il a mise au point (Kumar et al., 2011). Cette méthode combine des observations longitudinales effectuées tout au long de la vie d'un patient et une analyse *post-mortem* du cerveau et de la moelle épinière (**Figure 1**). Le terme « amyotrophique » fait référence à l'atrophie musculaire et à la faiblesse qui en résulte, et les termes « sclérose latérale » désignent le durcissement des tissus dans la partie latérale de la moelle épinière et qui s'accompagne d'une gliose (**Figure 1a, 1c**) (Brown et Cleveland, 2016). Charcot définit ainsi la SLA comme une maladie neurodégénérative hétérogène se caractérisant par la perte progressive des motoneurones supérieurs (UMN) et inférieurs (LMN) du cerveau et de la moelle épinière avec une multitude de dysfonctionnements moteurs (Charcot et Joffroy A., 1869). Les statistiques montrent que la moitié des personnes malades décèdent au bout de trois ans après le diagnostic, 1/4 décèdent après cinq ans et 1/10^{ème} décèdent au bout de dix ans ou plus après le diagnostic (Alcaz et al., 1997). La maladie de Charcot est également connue sous le nom de maladie de Lou Gehrig. Lou Gehrig était un célèbre joueur de baseball américain qui a été diagnostiqué avec la SLA et en est décédé en 1941. Son combat contre la maladie a attiré une attention considérable et a contribué à sensibiliser le public à cette affection. Tandis que la SLA est principalement une maladie sporadique, des documents antérieurs à la découverte de Charcot datant de 1880 révèlent l'existence d'une forme de SLA héréditaire à transmission dominante. Un siècle plus tard, les premiers gènes associés à la SLA familiale (SLAf) ont été découverts dont le premier fut SOD1 (*Superoxide dismutase 1*).

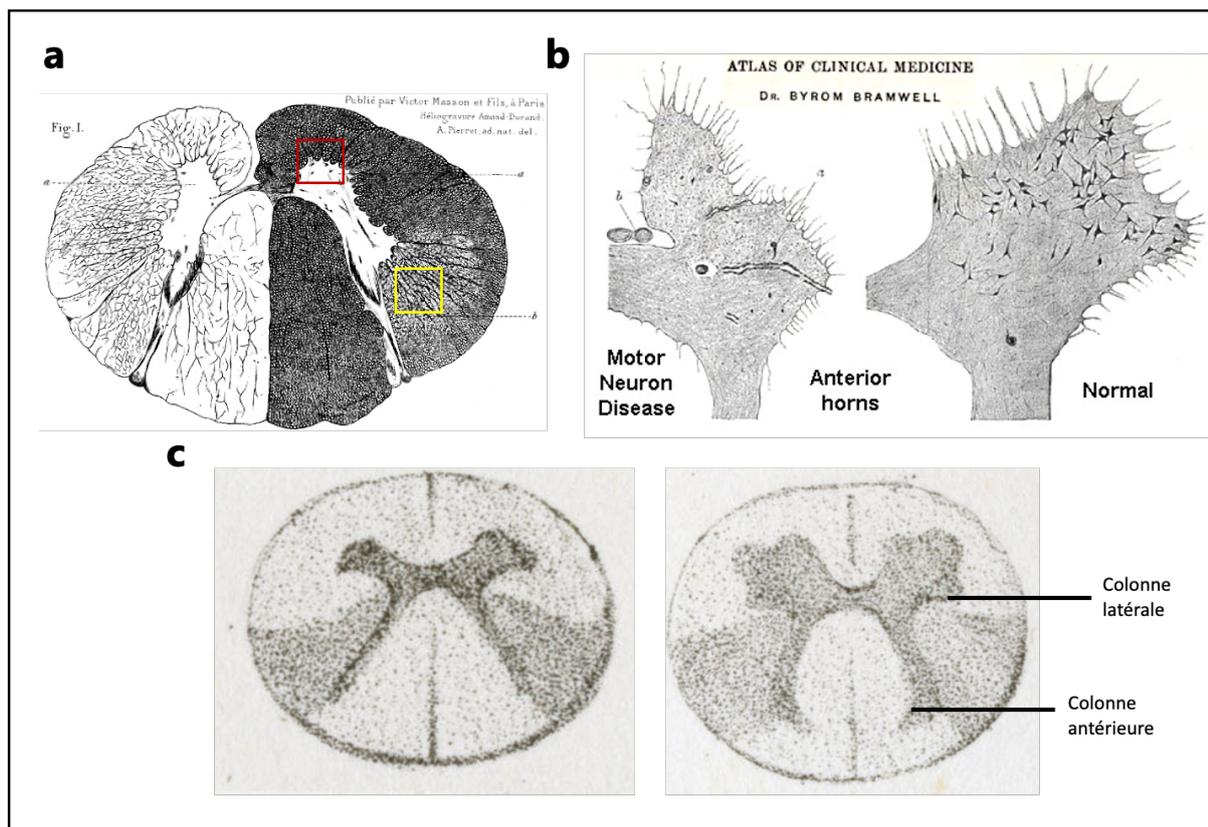


Figure 1- Les prémices de la SLA spinale.

a. Coupe transversale de la moelle épinière dans la région cervicale supérieure d'une patiente de JM Charcot, prénommée Catherine A. Dans le carré rouge, on voit les rares débris cellulaires dans les cornes antérieures. Dans le carré jaune, on aperçoit une sclérose des colonnes latérales déterminée par l'atrophie d'un grand nombre d'axones. Adapté de : Paris, Masson et Cie, 1914, Héliogravure Amand-Durand. b. Schéma d'un neurone moteur malade à gauche et sain à droite. On voit à gauche une réduction du nombre de motoneurons dans la corne antérieure. **Adapté de :** Byrom Bramwell, *Atlas of Clinical Medicine*, 1892-1896. c. Schémas représentant une sclérose symétrique de la partie postérieure des colonnes latérales dans la région dorsale. **Adapté de :** R Baloh.

1.1.2 Spectre clinique de la SLA

1.1.2.1 Épidémiologie

Appartenant aux groupes des maladies rares, la SLA est pourtant l'affection la plus fréquente des maladies des motoneurons. Selon les différentes études réalisées, l'incidence de la SLA est d'environ 2 à 3 cas pour 100 000 individus par an et la prévalence de la maladie est d'environ 6 pour 100 000 personnes (Longinetti et al., 2019). La SLA touche généralement les adultes âgés de 40 à 70 ans, mais peut également affecter des personnes plus jeunes. Les hommes sont légèrement plus susceptibles de développer la SLA que les femmes (Longinetti et al., 2019). Les facteurs de risque pour la SLA

comprennent les antécédents familiaux de la maladie, ce qui suggère une prédisposition génétique, ainsi que l'exposition à des produits chimiques et des toxines environnementales. Cependant, dans la plupart des cas, la cause sous-jacente de la SLA est inconnue (Kiernan et al., 2011 ; Longinetti et al., 2019).

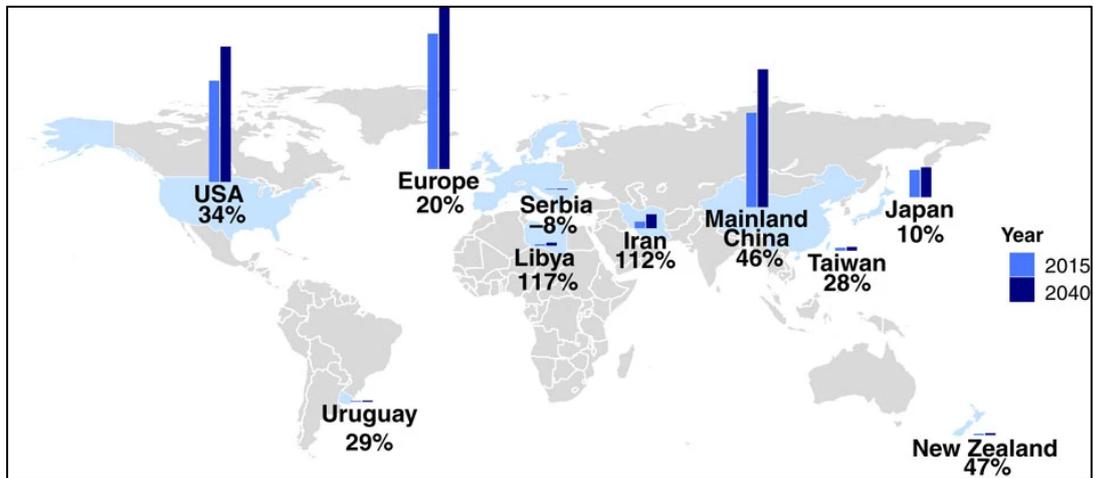


Figure 2- Augmentation attendue du nombre de cas de SLA entre 2015 et 2040.

En bleu sont représentés les pays étudiés, en bleu roi est représenté l'accroissement de la prévalence en 2015 et en bleu marine celle de 2040. Le pourcentage d'augmentation du nombre de cas au cours de cette période est indiqué sous le nom du pays. **D'après:** Arthur, Karissa C et al. "Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040." *Nature communications* vol. 7 12408. 11 Aug. 2016, doi:10.1038/ncomms12408.

Une étude parue dans le journal *Nature Communications* a analysé l'incidence de la SLA dans 10 pays et régions ce qui a permis aux auteurs de prédire une augmentation significative d'environ 32% entre 2015 et 2040 (**Figure 2**). Ce nombre élevé est attribué au vieillissement de la population dans les années à venir en plus de l'accroissement de la population. Cette tendance est similaire à celle prévue pour la maladie de Parkinson, où le nombre de personnes atteintes doublera entre 2005 et 2030 (Karissa et al., 2016). On notera aussi un accroissement grandissant du nombre de patients atteints de ces deux maladies neurodégénératives dans les pays en développement.

1.1.2.2 Hétérogénéité des phénotypes cliniques

On distingue principalement deux formes de la maladie : la forme sporadique ou la forme familiale. La forme sporadique représente la majorité des cas de SLA (environ

90%) et survient de manière aléatoire (environnementaux et/ou génétique). Les formes familiales représentent environ 10% des cas de SLA et sont dues à une mutation dans un gène, dont le gène *TARDBP* (*Transactive response DNA binding protein*) (Ma et al., 2017). Il existe également une grande hétérogénéité clinique de la maladie ce qui peut rendre le diagnostic difficile, avec des présentations cliniques très différentes. En effet, les patients peuvent présenter des symptômes très différents les uns des autres, notamment en ce qui concerne la distribution et la sévérité des symptômes moteurs et non-moteurs. De plus, la maladie peut évoluer de manière très différente d'un patient à l'autre, avec une durée de survie allant de quelques mois à plus de 10 ans dans de rares cas (Alcaz et al., 1997). La SLA peut être classée en différents sous-types en fonction des symptômes et des signes cliniques : bulbaire et spinale. En cas de forme bulbaire, la zone de la bouche est atteinte en premier lieu. Cela provoque des troubles d'articulation et de déglutition. Dans le deuxième cas, la forme spinale, ce sont des muscles des membres qui sont prioritairement touchés. Les symptômes se caractérisent alors par une faiblesse d'un membre. Ils s'étendent par la suite aux autres membres. (Chio et al., 2008). Suivent ensuite des phénomènes de spasticité, une atrophie musculaire, des difficultés à respirer, une perte de poids, des troubles du comportement... Une étude a montré que les patients atteints de la forme bulbaire ont un âge plus avancé et une survie plus courte que ceux atteints de la forme spinale (Westeneng et al., 2018). A terme, l'insuffisance respiratoire devient très sévère et représente un des principaux facteurs de mortalité de la maladie (Chio et al., 2008). La SLA peut également être classée selon son âge d'apparition. Les formes juvéniles, qui apparaissent avant l'âge de 25 ans, représentent environ 5% des cas, tandis que la forme tardive, qui apparaît après l'âge de 65 ans, représente environ 10% des cas (Lehky et al., 2021).

La SLA peut également être classée en sous-types basés sur l'atteinte relative des motoneurones supérieurs (UMN) par rapport aux motoneurones inférieurs (LMN) (Ma et al., 2017) (**Figure 3**). Une perte combinée des motoneurones qui contrôlent l'activité des muscles, à savoir les UMN dans le cortex cérébral et les LMN dans la moelle et la corne antérieure de la moelle épinière, dans une ou plusieurs régions corporelles est un signe

clinique de la SLA (Goutman et al., 2022). La dégénérescence initiale des UMN et LMN dans le tronc cérébral est liée à la forme bulbaire de la SLA.

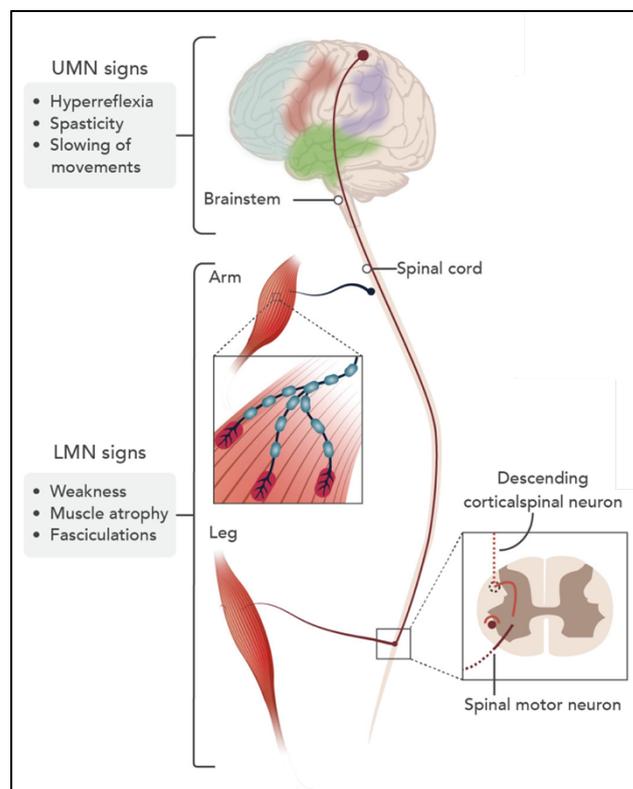


Figure 3- Phénotypes de la SLA en fonction de l'implication relative des motoneurones supérieurs UMN par rapport aux motoneurones LMN et de la distribution régionale.

On parle de plus en plus de la SLA comme d'une maladie très hétérogène. Les signes d'atteinte des LMN comprennent la faiblesse musculaire, l'atrophie, les fasciculations et la diminution du tonus musculaire tandis que ceux des UMN sont l'hyperréflexie, l'augmentation du tonus musculaire et la lenteur des mouvements comme ceux de la langue. **Adapté de:** Masrori, P, and P Van Damme. "Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review." *European journal of neurology* vol. 27,10 (2020): 1918-1929. doi:10.1111/ene.14393.

La dégénérescence initiale des UMN et LMN dans les régions cervicales et lombaires est liée à la SLA d'origine spinale. Ce dysfonctionnement entraîne progressivement une faiblesse des muscles squelettiques volontaires suivi de la mort à défaut de pouvoir respirer normalement (Fang et al., 2017). En moyenne, la survie médiane est de 19 mois après le diagnostic et de 30 mois après l'apparition de la maladie (Lacomblez et al., 1996 ; Logroscino et al., 2008). Souvent, les patients atteints de SLA à prédominance LMN possèdent des caractéristiques qui sont plus invalidantes que celles associées aux UMN. En effet, la perte des LMN induit des crampes, une atrophie musculaire, des fasciculations et une faiblesse marquée tandis que la perte des UMN

entraîne de l'hyperréflexie, (réflexes exagérés ou hyperactifs), de la spasticité (contractions musculaires involontaires) et une faiblesse moins prononcée. Les variantes UMN se déclarent majoritairement chez les hommes et les femmes de moins de 60 ans. Classiquement, la SLA est considérée comme une maladie avec des dysfonctionnements moteurs mais il existe d'autres formes plus atypiques qui sont associées à des troubles cognitifs et comportementaux, et qui s'inscrivent dans le *continuum* des démences fronto-temporales (DFT) (Strong et al., 2017). Il est intéressant de souligner que chez environ 50% des patients atteints de DFT, une maladie neurodégénérative souvent apparentée à la maladie d'Alzheimer, on retrouve une accumulation anormale de la protéine TDP-43 dans *les neurones*.

En résumé, la SLA est une maladie complexe et hétérogène qui peut présenter des formes différentes et des symptômes très variables d'un patient à l'autre. Les données issues de la recherche clinique et fondamentale suggèrent de multiples causes de la SLA dont des composantes génétiques importantes mais variées qui sont présentées dans la section suivante.

1.1.2.3 Contribution génétique

Bien que la majorité des cas de SLA soient sporadiques, c'est-à-dire sans antécédents familiaux de la maladie, 10% des cas de SLA sont hérités de manière autosomique dominante (30% des gènes n'ont pas encore été identifiés) (Taylor et al., 2016). Au total, plus de 30 gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans les formes familiales de la SLA, parmi lesquels certains codent pour des protéines responsables du contrôle du traitement de l'ARNm. (Tableau 1). Parmi ces protéines, quatre ont été identifiées comme responsables de plus de 50% des cas génétiques de la SLA. Il s'agit de *SOD1*, *C9ORF72* (*Chromosome 9 open reading frame 72*), *TARDBP* et *FUS* (*FUsed in Sarcoma*) en raison de leur plus grande fréquence (Goutman et al., 2018). Certains gènes notamment *ANG* (*Angiogenin*), *ATXN2* (*Ataxin 2*) et *DCTN1* (*Dynactin Subunit 1*) n'induisent pas forcément la maladie mais sont considérés comme des facteurs de risque de la maladie (Chia et al., 2018). Ces gènes codent, pour la plupart,

des protéines qui ont des rôles importants dans la régulation de la fonction neuronale et/ou de la survie cellulaire (Renton et al., 2014). L'étude des mutations présentes dans les gènes associés à la SLA revêt une importance cruciale, car elle permet de mieux appréhender les mécanismes pathologiques fondamentaux de cette maladie et d'ouvrir la voie au développement de nouvelles thérapies. Dans cette optique, nous allons maintenant aborder les principaux gènes impliqués dans la SLA, ainsi que leurs caractéristiques spécifiques.

- **Le gène *C9ORF72***

Le gène le plus fréquemment muté dans la SLA est *C9ORF72*, dont l'étude en 2011 a permis de découvrir une répétition hexanucléotidique étendue (GGGGCC) dans la partie non codante du gène (DeJesus-Hernandez et al., 2011 ; Renton et al., 2011). Cette répétition a été associée à environ 34% des cas de SLA^f et à 5% des cas de SLAs (Zou et al., 2017). Un individu sain possède normalement une trentaine de ces répétitions alors que chez un individu atteint par la SLA, on peut retrouver des centaines voire des milliers de répétitions (DeJesus-Hernandez et al., 2011 ; Renton et al., 2011). La fonction du gène *C9ORF72* reste encore très peu comprise mais des recherches actuelles s'orientent vers des fonctions de régulation du trafic des endosomes et de l'autophagie (Fard et al., 2014 ; Nassif et al., 2017). D'autres études *in vivo* ont mis en évidence un rôle de *C9ORF72* dans le système immunitaire (Atanasio et al., 2016 ; Burberry et al., 2016). Différentes hypothèses ont été avancées dans la littérature pour expliquer les mécanismes pathologiques associés à *C9ORF72*. Trois d'entre elles se distinguent : a) la toxicité induite par les répétitions d'hexanucléotides 4G2C dans la partie non codante du gène *C9ORF72*; b) l'haploinsuffisance de *C9ORF72* ; et c) la toxicité des protéines contenant des répétitions dipeptidiques (Gitler et Tsuiji, 2016 ; Mejzini et al., 2019). *In fine*, la neurodégénérescence observée dans la SLA serait une combinaison de ces mécanismes de gain et de perte de fonction de la protéine *C9ORF72*.

▪ **Le gène *SOD1***

Le deuxième gène fréquemment muté dans la SLA est *SOD1* qui code pour une enzyme ubiquitaire qui est la superoxyde dismutase cytoplasmique à cuivre et zinc jouant un rôle essentiel d'antioxydant qui convertit le superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (Rosen et al., 1993). La protéine SOD1 représente 1 à 2% du total des protéines solubles dans le système nerveux (Pardo et al., 1995). Elle est très conservée au cours de l'évolution (Wang et al., 2006). Environ 10 à 20% des cas de SLA autosomiques dominants sont générés par des mutations du gène SOD1. Le mécanisme par lequel la protéine SOD1 mutée induit la dégénérescence des MNs et conduit ensuite à l'apparition de symptômes moteurs reste mal compris (Berdyński et al., 2022). Néanmoins, une hétérogénéité phénotypique des mutations de SOD1 est observée selon la gravité, l'âge d'apparition, la durée et le degré de progression de la maladie (Andersen, 2021). De plus, la découverte de ce gène a permis d'accélérer la compréhension de la physiopathologie de la SLA notamment au travers du développement de modèles animaux transgéniques de SOD1 dont le plus connu est SOD1^{G93A} (Gurney et al., 1994 ; Hayashi et al., 2016). L'Édaravone, un médicament approuvé par la FDA en 2017, a été évalué dans des modèles de souris exprimant la protéine humaine SOD1 mutée hSOD1^{G93A}. Les résultats ont montré que l'Édaravone a significativement ralenti le déclin moteur, réduit le stress oxydatif, prévenu la perte des motoneurones et diminué l'accumulation de la protéine mutée dans la moelle épinière (Ito et al., 2008).

▪ **Le gène *TARDBP***

La découverte majeure de la pathologie de la protéine TDP-43 chez les patients atteints de SLA a été rapidement confirmée par un certain nombre d'études montrant sa présence en très grande majorité dans des agrégats cytoplasmiques hyper-ubiquitylés et phosphorylés dans le cerveau *post-mortem* de patients atteints de cette maladie (Neumann et al., 2006 ; Arai et al., 2006). De nombreuses modifications de TDP-43 ont été observées dans ces inclusions : la translocation dans le cytoplasme de la protéine, la

poly-ubiquitinylation, l'hyper-phosphorylation et la présence des fragments de clivages de protéolyse portant principalement la partie C-terminale (CTF-25 et CTF-35). Ces études pionnières ont permis d'identifier TDP-43 comme étant le principal composant pathologique des inclusions cytoplasmiques dans la SLA (Prasad et al., 2019). Paradoxalement, les agrégats de TDP-43 sont aussi retrouvés dans les formes sporadiques de la SLA mais aussi dans les cas où l'on retrouve des répétitions hexanucléotidiques de C90RF72 (Schipper et al., 2016). En revanche, la protéine TDP-43 n'est pas retrouvée dans les cas de SLAf causés par les mutations du gène FUS et rarement dans des cas de SLAf causés par des mutations du gène SOD1, suggérant que TDP-43 pourrait être impliquée dans des voies d'agrégation différentes (Gendron et al., 2010). Des mutations du gène *TARDBP* ont ensuite été mises en évidence et ont été impliquées dans environ 4% de SLAf et 1% des cas de SLAs (Broach et al., 2014, Xu et al., 2022) et pourtant TDP-43 est observée sous forme agrégée dans les neurones dans 97% des cas totaux de SLA (Purice et Taylor., 2018). A ce jour, il existerait plus de 50 mutations de TDP-43 associées à la maladie dont la plupart sont des mutations faux-sens qui se retrouvent concentrées dans son domaine C-terminal aussi appelé *Prion-Like* (Buratti, 2015). L'accumulation cytoplasmique de TDP-43 est concomitante à une perte de TDP-43 dans le noyau ce qui a permis l'apparition de deux postulats permettant d'expliquer la pathogénicité de TDP-43 dans la SLA : TDP-43 subit une perte de ses fonctions nucléaires et/ou un gain de fonction toxique dans le cytoplasme (Lee et al., 2012). Au cours de la dernière décennie, la protéine TDP-43 a été associée à un nombre croissant de maladies neurodégénératives dont la SLA ou les dégénérescences lobaires fronto-temporales (FTLD) qui sont regroupées sous le terme de « protéinopathie de TDP-43 » (Boer et al., 2021). Dans des conditions normales, TDP-43 est majoritairement nucléaire mais peut transiter du noyau vers le cytoplasme pour exercer différentes fonctions cellulaires (Ayala et al., 2008). Concernant les fonctions de TDP-43, c'est une protéine ubiquitaire et hautement conservée qui joue un rôle essentiel de liaison à l'ARN/ADN et qui appartient à la classe des ribonucléoprotéines hétérogènes (hnRNP). Elle est impliquée dans de nombreux processus biologiques en particulier le métabolisme de

l'ARN (Tollervey et al., 2011 ; Ratti et Buratti, 2016). Cette fonction majoritaire de TDP-43 s'explique par sa capacité à se lier de manière préférentielle aux motifs répétitifs GU de l'ARN par l'intermédiaire de ses deux domaines de liaison à l'ARN (RRM1 et 2) qui sont très conservés au cours de l'évolution (Lukavsky et al., 2013). Toutefois, sa fonction de régulateur dans l'épissage des ARN pré-messagers reste la plus documentée dans la littérature (Buratti et al., 2001). La protéine TDP-43 sera présentée plus en détail dans le chapitre 2.

- **Le gène *FUS***

Après la découverte de TDP-43, des mutations dans un gène codant pour une autre protéine de liaison à l'ARN, le gène *FUS* ont été identifiées chez des patients présentant des formes juvéniles rares de SLA (SLAj, avant l'âge de 25 ans) (Gromicho et al., 2017). Comme pour TDP-43, la protéine FUS présente une localisation anormale dans le cytoplasme et forme des agrégats dans les neurones et les cellules gliales des patients atteints de SLA. (Kwiatkowski et al., 2009 ; Vance et al., 2009). Il est intéressant de noter que les patients présentant des mutations du gène TDP-43 ne montrent pas la formation d'agrégats de FUS, suggérant que ces deux protéines suivent des voies pathologiques indépendantes dans la maladie. (Vance et al., 2009). Plus de 50 mutations du gène *FUS* ont été associées à la SLA. Selon les premières études épidémiologiques, les mutations FUS représentent 4 à 6% des cas de SLAf et 0,7 à 1,8% des cas de SLAs. Une étude réalisée en Chine a révélé la présence de mutations FUS dans plus de 30% des cas de SLAj (Liu et al., 2017). La protéine FUS appartient à la famille des protéines FET (*FUS*, *EWS*, *TAF-15*), qui inclut deux autres protéines de liaison à l'ARN aussi corrélées à la SLA, notamment : *EWS* (*Ewing sarcoma*) et TAF15 (TATA-Box Binding Protein Associated Factor 15) (Zinszner et al., 1997). Si l'on compare FUS à TDP-43, il est remarquable de constater qu'elles partagent de nombreuses similitudes, tant au niveau de leurs fonctions dans le métabolisme de l'ARN que de leur présence ubiquitaire dans les cellules (Ratti et Buratti, 2016). Malgré leur ressemblance, FUS et TDP-43 ne régulent pas les mêmes cibles d'ARN (Lagier-Tourenne et al., 2012). De plus en plus d'études montrent un nouveau rôle

de FUS dans le mécanisme de réparation de l'ADN et dans la préservation de l'intégrité génomique (Altmeyer et al., 2015 ; Wang et al., 2018) mais les fonctions exactes de FUS dans la réparation de l'ADN restent encore à élucider.

Tableau 1- Liste des gènes codant des protéines de liaison à l'ARN associées à la SLA et leurs principales fonctions biologiques.

La plupart de ces protéines sont impliquées dans le métabolisme de l'ARN. *Adapté de* : (Chao Xue et al., 2020 et Mejzini et al., 2019).

Gène	Protéine	Fonctions biologiques	Références
TARDBP	<i>TAR DNA-binding Protein, 43kD</i>	Métabolisme des ARN dont l'épissage des ARN	Rutherford et al., 2008 ; Sreedharan et al., 2008 ; Neumann, 2009
FUS	<i>Fused in sarcoma RNA binding protein</i>	Métabolisme des ARN dont l'épissage des ARN, réparation à l'ADN	Kwiatkowski et al., 2009 ; Vance et al., 2009
TAF15	<i>TATA-binding protein-associated factor 2N</i>	Régulation de l'expression des gènes (transcription)	Couthouis et al., 2011 ; Ticozzi et al., 2011
EWSR1	<i>EWS RNA binding Protein 1</i>	Régulation de l'épissage des ARN, répresseur transcriptionnel	Couthouis et al., 2012
HNRNPA1	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>	Métabolisme des ARN dont l'épissage des ARN	Kim et al., 2013 ; Naruse et al., 2018
HNRNPA2/B1	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>	Métabolisme des ARN dont l'épissage des ARN	Kim et al., 2013 ; Fifita et al., 2017
ATXN2	<i>Ataxin 2</i>	Métabolisme des ARN, signalisation mTOR, endocytose	Elden et al., 2010 ; Sproviero et al., 2016
TIA1	<i>Tia 1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein</i>	Métabolisme des ARN	Beck et al., 1996 ; Gilks et al., 2004
MATR3	<i>Matrin 3</i>	Métabolisme des ARN, organisation de la chromatine	Johnson et al., 2014b

Avec les progrès des techniques du séquençage de nouvelle génération et au nombre croissant de nouveaux cas de SLA, d'autres variants génétiques ont été

découverts (**Figure 4**). Une grande majorité de ces variants est associée à une pathologie de type TDP-43 dans un contexte SLA : *OPTN* (Maruyama et al., 2010) ; *SQSTM1* (Fecto et al., 2011) ; *UBQLN2* (Deng et al., 2011) ; hnRNPA1/A2B1 (Kim et al., 2013) ; *MATR3* (Johnson et al., 2014) ; *TBK1* (Borghero et al., 2015) ; *NEK1* (Brenner et al., 2016) ; *KIF5A* (Nicolas et al., 2018) et *UNC13A* (Ma et al., 2022 ; Brown et al., 2022). Les gènes associés à la SLA sont classés selon différentes catégories, qu'ils soient impliqués dans la perturbation de la protéostasie/autophagie, du métabolisme de l'ARN ou dans l'altération de la dynamique du cytosquelette (Brown et al., 2017).

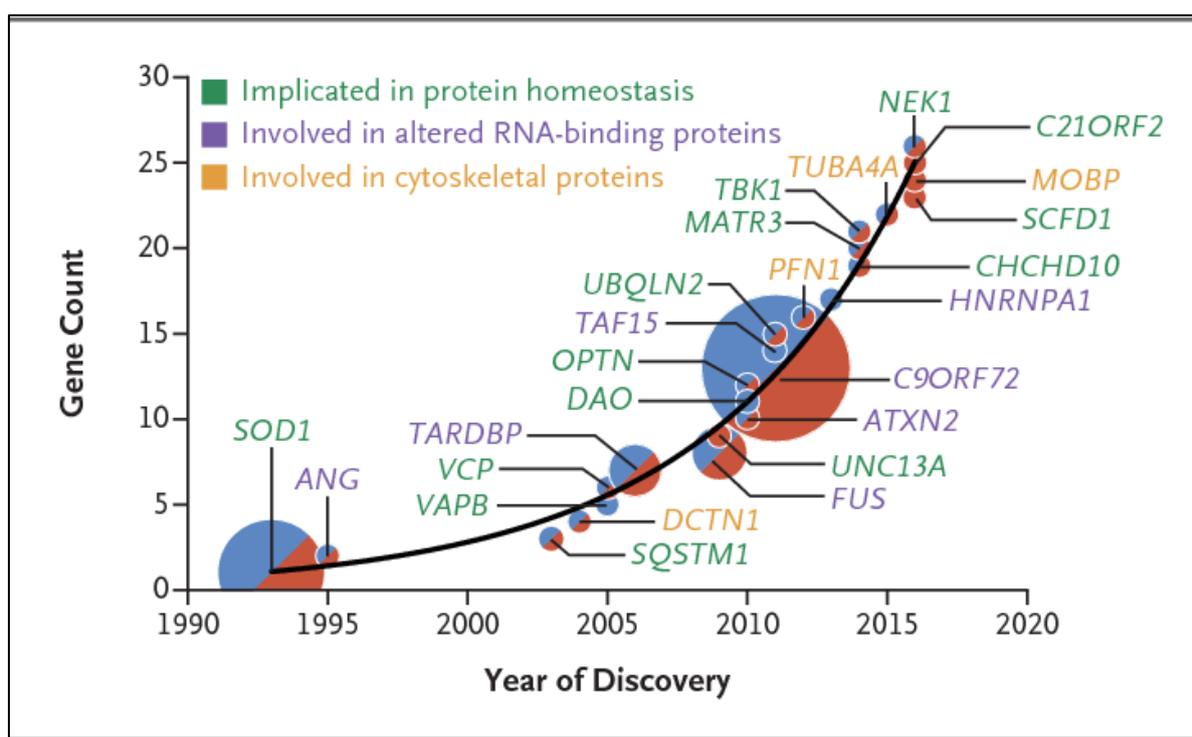


Figure 4- Les gènes associés à la SLA ne cessent d'augmenter depuis 1990.

Depuis la découverte du gène TARDBP, au moins 18 gènes ont été associés à la SLA. Ces gènes sont regroupés selon leur implication dans la dérégulation de 3 grandes catégories de processus biologiques : l'homéostasie protéique, le métabolisme des ARN et la dynamique du cytosquelette. **D'après:** Brown, Robert H, and Ammar Al-Chalabi. "Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The New England journal of medicine* vol. 377,2 (2017): 162-172. doi:10.1056/NEJMra1603471.

1.1.2.4 Diagnostic de la SLA

Le diagnostic de la SLA vise à évaluer initialement sa gravité et les facteurs pronostiques, en particulier sur le plan nutritionnel et respiratoire, tout en recherchant

systématiquement des complications potentielles qui peuvent être silencieuses. Les symptômes de la SLA, souvent initialement confondus avec d'autres maladies, évoluent progressivement vers une faiblesse musculaire et une atrophie, caractérisées par un affaiblissement des muscles, des secousses musculaires, des crampes, et une diminution du tonus musculaire. Les signes cliniques évoquent la dégénérescence des MN inférieurs et supérieurs. La SLA ne présente pas d'autres signes neurologiques ou cognitifs associés. Le diagnostic est établi par des médecins généralistes et neurologues, souvent avec l'aide d'autres spécialistes et professions paramédicales. Les tests diagnostiques comprennent une électroneuromyographie (ENMG), une IRM cérébrale et médullaire, une stimulation magnétique, et une étude génétique en cas de forme familiale. D'autres examens peuvent être envisagés en fonction des besoins. En cas de doute, le bilan doit être réévalué après 3 à 6 mois, et une aggravation symptomatique sur cette période peut confirmer le diagnostic.

1.1.3 Mécanismes physiopathologiques

Bien que les mécanismes exacts de la SLA ne soient pas encore complètement compris, plusieurs processus physiopathologiques ont été identifiés comme étant potentiellement impliqués dans la maladie, tels que le métabolisme de l'ARN, le transport nucléo-cytoplasmique, le stress oxydant, la dysfonction mitochondriale, l'excitotoxicité et la neuro-inflammation (**Figure 5**). Ils vous seront expliqués ci-dessous.

1.1.3.1 Métabolisme de l'ARN

La perturbation du métabolisme de l'ARN semble jouer un rôle clé dans la physiopathologie de la SLA. Plusieurs RBPs telles que TDP-43 ou FUS ont des rôles majeurs dans le métabolisme des ARN notamment l'épissage, la transcription, la stabilité ou bien la biogénèse des microARN (Butti et al., 2018). Ces deux protéines ont des sites de liaison sur plus de 5000 gènes et régulent les niveaux d'expression de centaines d'ARNm. En outre, de nombreuses mutations pathologiques associées à la SLA ont été

retrouvées dans des gènes codant pour des RBPs (Gordon et al., 2019). La plupart d'entre elles induisent une relocalisation de TDP-43 dans le cytoplasme (Prasad et al., 2019). Par ailleurs, une étude a montré que la séquestration cytoplasmique de TDP-43 altère en aval le métabolisme de l'ARN (Cooper-Knock et al., 2014), notamment des anomalies d'épissage. En outre, la présence accrue de TDP-43 dans le cytoplasme est associée à plusieurs centaines d'altérations de l'épissage (Tollervey et al., 2011), le transcrite Stathmine-2 (STMN2) étant le plus affecté par la déplétion nucléaire de TDP-43 (Klim et al., 2019). Outre les mutations et la localisation anormale, l'agrégation des RBPs est aussi un facteur important du dysfonctionnement du métabolisme de l'ARN dans la SLA (Barmada et al., 2015). En effet, il semble évident que lorsque TDP-43 est séquestrée dans le cytoplasme, elle perd sa capacité à remplir ses fonctions essentielles liées au métabolisme de l'ARN dans le noyau. Ainsi, il existe une hypothèse pour expliquer l'apparition de la SLA, elle résulterait d'une perte de fonction nucléaire et/ou d'un gain de fonction toxique dans le cytoplasme (Cf section 1.1.7.4). Certaines RBPs, notamment TDP-43, FUS, TAF15, hnRNPA1/A2B1, EWSR1, ont aussi la capacité d'être recrutées dans des compartiments liquides (Wolozin et al., 2019) comme les granules de stress (GS). Ces GS sont des structures cytoplasmiques dynamiques, riches en protéines et en ARNm, qui jouent un rôle crucial dans le stockage et la stabilisation des ARNm lors de situations de stress cellulaire, assurant ainsi une régulation fine du métabolisme de l'ARN (Marcelo et al., 2021). En outre, il a été montré dans des cellules NSC-34 (Lignée cellulaire hybride motoneurones-neuroblastome de souris) exprimant des formes mutées de TDP-43 (A315T ou M337V), une altération de la dynamique des GS comparées aux cellules contrôles (Ding et al., 2021). Enfin, des études récentes ont suggéré que les GS pourraient servir de sites potentiels pour la formation des agrégats de protéines dont TDP-43 (Dewey et al., 2012, Baradaran-Heravi et al., 2020 ; Sternburg et al., 2022).

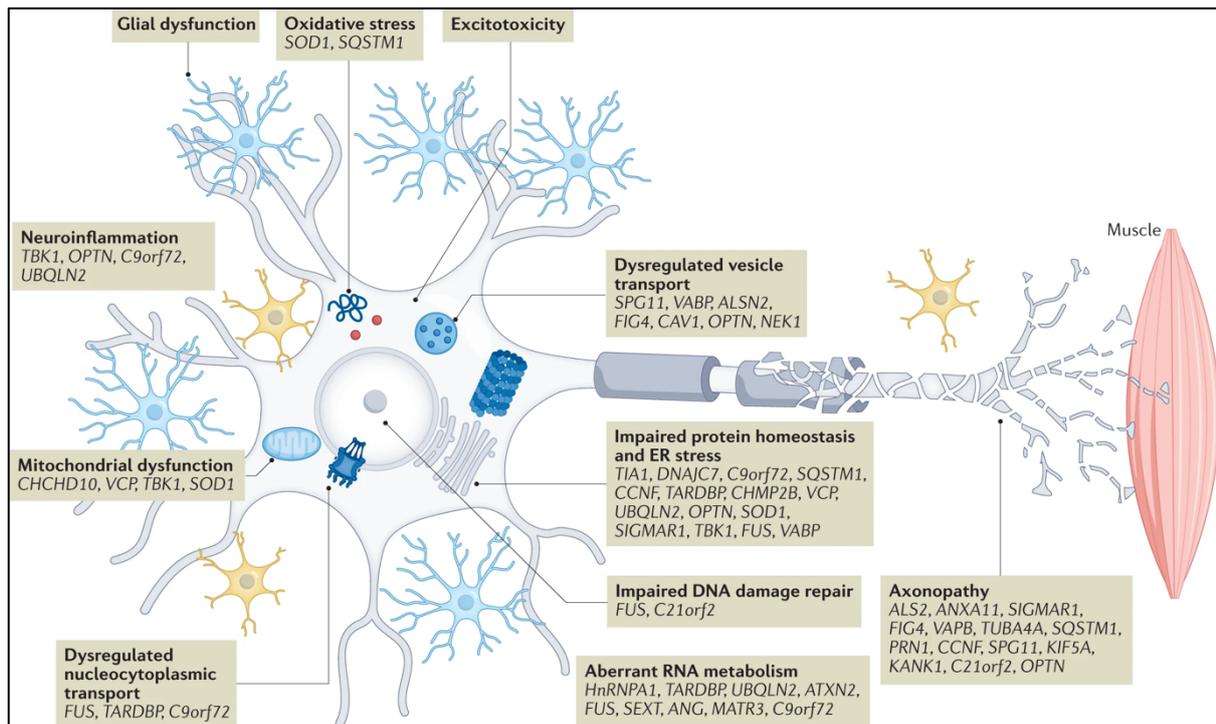


Figure 5- Mécanismes pathophysiologiques dans la SLA et leurs gènes causatifs à l'origine de la neurodégénérescence du motoneurone.

De nombreuses voies sont dérégulées par exemple, l'excitotoxicité, le stress oxydant, le transport vésiculaire, la réparation de l'ADN, le métabolisme de l'ARN ou encore le transport nucléo-cytoplasmique. Une multitude de gènes dont des gènes codant des protéines de liaison à l'ARN est impliquée dans le développement de la maladie. **D'après:** Mead, Richard J et al. "Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation." *Nature reviews. Drug discovery* vol. 22,3 (2023): 185-212. doi:10.1038/s41573-022-00612-2.

1.1.3.2 Transport nucléo-cytoplasmique

Les arguments en faveur d'une altération du transport nucléo-cytoplasmique ont été apportés à la suite de l'observation de la mauvaise localisation et de l'agrégation des protéines de liaison à l'ARN concomitante avec leur déplétion nucléaire. Également, des études *in vitro* et *in vivo* récentes ont démontré l'interaction d'un récepteur de transport nucléaire, la RanGAP1 (Ran GTPase Activating Protein 1) avec les répétitions G4C2 de C9ORF72 (Zhang et al., 2015). De plus, il a aussi été observé que les expansions répétées de C9ORF72 provoquaient des anomalies morphologiques de l'enveloppe nucléaire et une rétention nucléaire des ARNm (Freibaum et al., 2015). Une autre étude intéressante a montré dans les noyaux de neurones spinaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) provenant de patients C9ORF72, une diminution de l'expression de 8

nucléoporines (Nups) et une altération de la localisation de RanGAP1 (Coyne et al., 2021). Il a également été constaté que le stress cellulaire perturbait l'importation nucléaire en séquestrant des facteurs de transport cruciaux dans les granules de stress (Zhang et al., 2018). Dans une étude *in vitro* plus récente, la lésion du complexe du pore nucléaire (NPC) dans la SLA a été liée à une accumulation nucléaire de la protéine membranaire spécifique au réticulum endoplasmique, la protéine CHMP7 (*Charged multivesicular body protein 7*), un régulateur critique du contrôle qualité du NPC, en utilisant des tissus *post-mortem* et des motoneurons dérivés d'iPSC provenant de patients C9ORF72 (Coyne et al., 2021). L'inhibition de l'export nucléaire de CHMP7 perturbe l'activité des Nups et la fonction normale de TDP-43 ce qui participe au développement de la SLA, suggérant ainsi que CHMP7 pourrait devenir une nouvelle cible thérapeutique intéressante (Coyne et al., 2021).

1.1.3.3 Stress oxydant et la dysfonction mitochondriale

Le stress oxydatif peut résulter de niveaux excessifs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), d'espèces réactives de l'azote ou d'un mauvais fonctionnement des systèmes de défense antioxydants. Les ROS contribuent de manière significative aux lésions neuronales et au vieillissement du système nerveux central (SNC) en modifiant la structure et la fonction des biomolécules, notamment des protéines, des lipides, de l'ADN et de l'ARN. De nombreuses preuves indiquent que les dommages oxydatifs jouent un rôle clé dans la physiopathologie de la SLA (Barber et al., 2010 ; Ferraiuolo et al., 2011 ; D'Amico et al., 2013). Parmi les facteurs mesurés dans les biofluides des patients atteints de SLA, on retrouve entre autres les marqueurs du stress oxydatifs qui sont dérégulés chez les patients (Blasco et al., 2017). Il existe également des preuves de l'altération des systèmes de défense contre le stress oxydatif dans la SLA, notamment la dérégulation de l'homéostasie du glutathion (Kim, 2021) et le système cytoprotecteur ARE (élément de réponse antioxydante) du facteur nucléaire lié à l'érythroïde 2 (Nrf2) (Cuadrado et al., 2019 ; Jimenez-Villegas et al., 2021). Le stress oxydatif peut contribuer à de nombreux autres processus physiopathologiques impliqués dans les lésions des

motoneurones et les exacerber (Barber et al., 2010). Des essais biochimiques et cellulaires ont permis d'identifier le stress oxydatif comme un signal qui favorise la formation d'agrégats de TDP-43 acétylés. L'acétylation de TDP-43 entrave la liaison à l'ARN et favorise l'accumulation d'espèces de TDP-43 insolubles et hyper-phosphorylées qui ressemblent aux inclusions pathologiques trouvées dans le SNC des personnes atteintes de la SLA (Cohen et al., 2015). La mauvaise localisation de TDP-43 et de FUS se produit dans les modèles cellulaires de SLA exposés au stress oxydatif, ce qui provoquerait des altérations dans le métabolisme de l'ARN (Colombrita et al., 2009). Le stress oxydatif chronique favorise la phosphorylation de TDP-43 médiée par la phosphatase GADD34, une caractéristique de la protéinopathie TDP-43 (Goh et al., 2018). L'agrégation cytoplasmique de TDP-43 séquestre des microARN et des protéines spécifiques, y compris des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire, ce qui entraîne un dérèglement de la fonction mitochondriale qui accroît encore le stress oxydatif (Zuo et al., 2021). Ainsi, un cycle accéléré de stress oxydatif, d'agrégation de protéines et de dysfonctionnement mitochondrial s'établit. Une atténuation efficace du stress oxydatif pourrait potentiellement ralentir la dégénérescence des motoneurones. Une analyse rétrospective des médicaments évalués chez les souris mSOD1 a indiqué que les médicaments qui ciblent spécifiquement le stress oxydatif pourraient être les candidats thérapeutiques les plus prometteurs pour la prévention de la dégénérescence des motoneurones (Benatar et al., 2007). L'atténuation du stress oxydatif est probablement le principal mécanisme d'action de l'Édaravone, un médicament piégeant les radicaux libres.

1.1.3.4 Excitotoxicité

L'un des premiers mécanismes proposés pour expliquer la SLA était l'excitotoxicité du glutamate qui est une surstimulation des récepteurs du glutamate qui entraîne une dégénérescence neuronale induite par l'entrée massive d'ions calcium dans la cellule (Rothstein et al., 1990). Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur puissant associé à la mémoire et à l'apprentissage. Concernant les études portant sur

l'excitotoxicité du glutamate, des niveaux très hauts de ce neurotransmetteur ont été trouvés dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de SLA (Rothstein et al., 1990). De plus, la perte du principal transporteur synaptique de recapture du glutamate, le transporteur d'acides aminés excitateurs 2 (EAAT2), a été observée dans des modèles transgéniques de souris exprimant la protéine SOD1 mutée (SOD1^{G93A}) et chez des patients atteints de SLA (Guo et al., 2003). Plus de 60% des patients atteints de SLAs présentent une perte moyenne de 50% du transporteur EAAT2 (Rothstein et al., 1995 ; Shaw et al., 1994). Par conséquent, Au cours de la dernière décennie, de nombreux efforts ont été déployés pour identifier des composés capables de réduire la toxicité du glutamate et/ou d'augmenter l'expression de EAAT2.

1.1.3.5 Neuro-inflammation et contribution gliale

Il est désormais établi que la neuroinflammation est un facteur important dans la pathogenèse de la SLA. En effet, de plus en plus d'études indiquent que les cellules microgliales jouent un rôle important dans la SLA. Pendant longtemps, l'absence de marqueur spécifique permettant de distinguer les macrophages périphériques (capables d'envahir le SNC) de la microglie a rendu difficile l'étude individuelle de ces deux populations cellulaires. En particulier, lors des études *in vivo* sur des modèles de rongeurs atteints de SLA, les deux types de cellules étaient souvent considérées comme une seule population. En 2006, deux études indépendantes ont démontré que la diminution de l'expression de la protéine SOD1 humaine mutante (hSOD1) uniquement dans les macrophages/microglies d'un modèle de souris SLA hSOD1 mutante entraînait un ralentissement de la progression de la maladie et une augmentation de la survie (Beers et al., 2006 ; Boillée et al., 2006). Dans la SLA, le MN spinal en dégénérescence projette sa partie la plus longue, l'axone, dans la périphérie, et l'axone serait donc en contact avec des macrophages réactifs et d'autres cellules immunitaires périphériques, tandis que le soma dans le SNC serait en contact avec la microglie. Cette particularité de la moelle épinière a conduit à l'idée que, dans la SLA, il pourrait être intéressant de cibler directement le système immunitaire périphérique et les macrophages le long des nerfs

moteurs périphériques pour ralentir la neurodégénérescence. Il s'agirait d'une approche thérapeutique potentiellement plus facile que de cibler la microglie dans le SNC et, en ciblant la neuro-inflammation, elle pourrait être utilisée pour tous les cas de SLA. Cette idée a été rapportée dans un article récent qui a démontré que les profils d'expression génétique étaient très différents au cours de la maladie dans la microglie et les macrophages de souris hSOD1 mutantes (Chiot et al., 2020), ce qui montre que les deux types de cellules peuvent jouer des rôles différents dans la maladie. Dans cette étude, le remplacement des macrophages SOD1 mutants périphériques par des macrophages plus neurotrophiques a diminué à la fois l'activation des macrophages du nerf sciatique et l'activation microgliale du SNC (Chiot et al., 2020). Ce résultat est particulièrement intéressant car il montre qu'en modulant les macrophages à la périphérie, il est possible d'agir sur l'inflammation du SNC.

1.1.3.6 Autres mécanismes physiopathologiques

Il existe de nombreuses autres voies physiopathologiques décrites dans la SLA (**Figure 5**). Parmi elles, l'homéostasie protéique qui est l'équilibre entre la production et la dégradation des protéines, est un mécanisme qui est perturbé dans la SLA. Des perturbations dans les voies de dégradation protéique telles que le système ubiquitine-protéasome et le système autophagique peuvent conduire à une accumulation excessive de protéines et une toxicité cellulaire (Webster et al., 2017). C'est notamment le cas de plusieurs RBPs dans la SLA, qui sont pour la plupart des substrats directs ou indirects de ces voies (Mead et al., 2023). Enfin, des dommages à l'ADN, la perte de l'intégrité et du transport axonal ont aussi été liés à la physiopathologie de la SLA (Nicolas et al., 2018 ; Mitra et al., 2019). En raison de la multitude des voies physiologiques dérégulées dans la SLA, de nombreux efforts de recherche sont actuellement concentrés sur le ciblage de ces voies dans l'espoir de développer de nouvelles thérapies.

1.1.4 Approches thérapeutiques

La SLA est une maladie complexe et mortelle pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement curatif. Cependant, plusieurs approches thérapeutiques ont été développées pour améliorer la qualité de vie des patients atteints de SLA et pour ralentir la progression de la maladie. Ces approches combinent à la fois des traitements pharmacologiques ou des traitements alternatifs comme la thérapie génique. C'est ce que nous allons maintenant voir dans cette partie.

1.1.4.1 Approches pharmacologiques

Jusqu'en 2022, il n'existait que deux molécules approuvées par la FDA : le Riluzole et l'Edaravone. Une autre molécule a été récemment approuvée par la FDA : la molécule AMX0035 (The ALS association). Le Riluzole, premier médicament approuvé en 1995 pour la SLA, est un inhibiteur de la libération présynaptique du glutamate permettant de réduire l'excitotoxicité des motoneurones (Benoit et Escande, 1991). Administré en voie orale, il permet de prolonger la survie des patients atteints de SLA, toutefois ses effets sont très modestes avec une survie augmentée de seulement 3 mois (Geevasinga et al., 2016). L'Edaravone, molécule approuvée en 2017 et uniquement disponible au Japon, est un antioxydant qui agit en neutralisant les radicaux libres, des molécules hautement réactives qui peuvent endommager les neurones par la peroxydation des acides gras insaturés (Ahmadinejad et al., 2017). Il est administré par perfusion intraveineuse et est destiné à ralentir la progression de la maladie chez les patients atteints de SLA. Toutefois, l'Edaravone est disponible en France sous forme d'autorisation temporaire d'utilisation (ATU), pour des patients qui présentent les critères pour lesquels le médicament a montré une efficacité dans les essais cliniques (ANSM). Cependant, faute d'efficacité prouvée, un laboratoire a renoncé à commercialiser l'Edaravone (Witzel et al., 2022). Une nouvelle forme orale de l'Edaravone a été récemment approuvée aux Etats-Unis et remplacera la voie intraveineuse (Mead et al., 2023). Deux études encourageantes publiées en 2020 concernent un composé appelé l'ezogabine, un antiépileptique qui réduit l'excitabilité des motoneurones (Wainger et al., 2021). Une autre étude clinique de

phase II montre que ce médicament réduit cette hyperexcitabilité au niveau cortical et spinal chez des patients atteints de SLA, mais l'efficacité de ce composé sur les symptômes et la progression de la maladie n'a pas encore été évaluée (#NCT02450552).

En 2022, la FDA a approuvé l'AMX0035 de la société américaine Amylyx pour le traitement de la SLA. Il s'agit du troisième médicament à recevoir l'approbation de la FDA après le Riluzole et l'Edaravone. L'AMX0035 est une combinaison à dose fixe de deux composés génériques, le phénylbutyrate de sodium et le taurursodiol, qui est destiné à réduire la mort des cellules neuronales. Pour l'instant, le mécanisme d'action exact de ce médicament reste inconnu, mais les travaux de la société Amylyx suggèrent qu'il agirait en réduisant le stress du réticulum endoplasmique (RE) et le dysfonctionnement mitochondrial (Rodrigues et al., 2003 ; Zhou et al., 2011). Également, les molécules thérapeutiques ciblant les dysfonctions musculaires ont récemment eu un regain d'intérêt dans la SLA (Li et al., 2021). L'idée est d'apporter une première approche neuroprotectrice et une seconde approche symptomatique en améliorant l'activité musculaire avec deux activateurs de troponine actuellement en développement, le tirasemtiv (#NCT02936635) et le reldesemtiv (#NCT04944784). Au total, 91 programmes de développement pré-cliniques de molécules pour la SLA ont été identifiés (**Figure 6**).

1.1.4.2 Approches alternatives

D'autres approches thérapeutiques existent pour la SLA et sont en cours de développement, notamment des approches de thérapie génique et thérapie cellulaire.

1.1.4.2.1 Thérapie génique et cellulaire

La thérapie génique offre un potentiel thérapeutique prometteur pour soigner les patients atteints de la SLA. Il existe de nombreuses stratégies ciblant les gènes telles que les oligonucléotides antisens (ASO), les ARN interférents (ARNi), les vecteurs viraux ou l'édition de gènes avec la technologie de CRISPR-Cas9 (*CRISPR-associated protein 9*) (Miller et al., 2020). Ces approches sont actuellement testées en phase préclinique/clinique de développement. Elles visent pour la plupart des patients

présentant des mutations dans les gènes *SOD1*, *C9ORF72* et *FUS*. Un des traitements récemment approuvés par la FDA est un ASO développé par Biogen, connu sous le nom de Tofersen dont l'effet vise à réduire la synthèse de la protéine SOD1 mutée impliquée dans la SLAf (Miller et al., 2020 ; Biogen.com). Les ASO sont des petites molécules oligonucléotides qui s'hybrident à leur ARN cible pour induire sa dégradation en visant la voie de dégradation dépendante de la RNase H1, réduisant ainsi la synthèse de protéines cibles (Oskarsson et al., 2021). Dans des études sur des rongeurs exprimant des mutations de SOD1, cet ASO a montré un prolongement de la survie d'environ 40 jours (McCampbell, A. et al., 2018). De plus, les résultats préliminaires d'un essai de phase 1/2 ont montré que Tofersen était sûr et bien toléré chez les patients porteurs de la mutation SOD1 (#NCT02623699). Suite à ces résultats, le Tofersen a reçu récemment une autorisation accélérée de mise sur le marché par la FDA, pour le traitement de la SLA. Il est actuellement en phase III (ATLAS Trial, Biogen) pour une fin prévue en 2027 (#NCT04856982). Toutefois, la réduction des niveaux de la protéine anormale peut également influencer la quantité de la protéine normale, ce qui est une des limites de l'utilisation des ASO. Une deuxième limite est l'immunogénicité potentielle de l'ASO. L'approche utilisant des cellules souches continue d'être un domaine d'intérêt pour la SLA. Elle met l'accent sur la modulation du microenvironnement toxique par opposition au remplacement des cellules défectueuses par des cellules saines injectées. L'une des plus grandes thérapies cellulaires récente est celle de NurOwn (#NCT03280056), mise au point par BrainStorm Cell Therapeutics, qui est à base de cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Berry et al., 2019). Ces cellules ont été prélevées dans la moelle osseuse des patients et manipulées en culture pour qu'elles produisent en grande quantité des facteurs neurotrophiques. Elles sont ensuite transplantées chez le patient par voie intrathécale. L'apport de CSM dans des modèles murins, a montré une diminution de la perte des motoneurones par rapport au groupe non traité (Boido et al., 2014 ; Forostyak et al., 2014). Les CSM permettraient de stimuler la croissance de nouveaux motoneurones et la réinnervation de la jonction neuromusculaire (Berry et al., 2019). Malheureusement, les derniers essais cliniques de phase III n'ont pas été

concluants, de nombreux paramètres sont à prendre en compte pour améliorer les résultats comme le choix de la source de cellules souches ou encore le mode d'administration (Nabavi et al., 2019). Plusieurs mécanismes physiopathologiques sont actuellement ciblés dans le développement préclinique et les essais cliniques pour la SLA (**Figure 6**). La neuro-inflammation est la plus ciblée et elle est couverte par une variété d'approches thérapeutiques. Ensuite viennent les thérapies géniques utilisant les ASO et puis enfin les thérapies cellulaires. En revanche, l'exploration du métabolisme de l'ARN est prête à être entreprise pour le développement de futures thérapies.

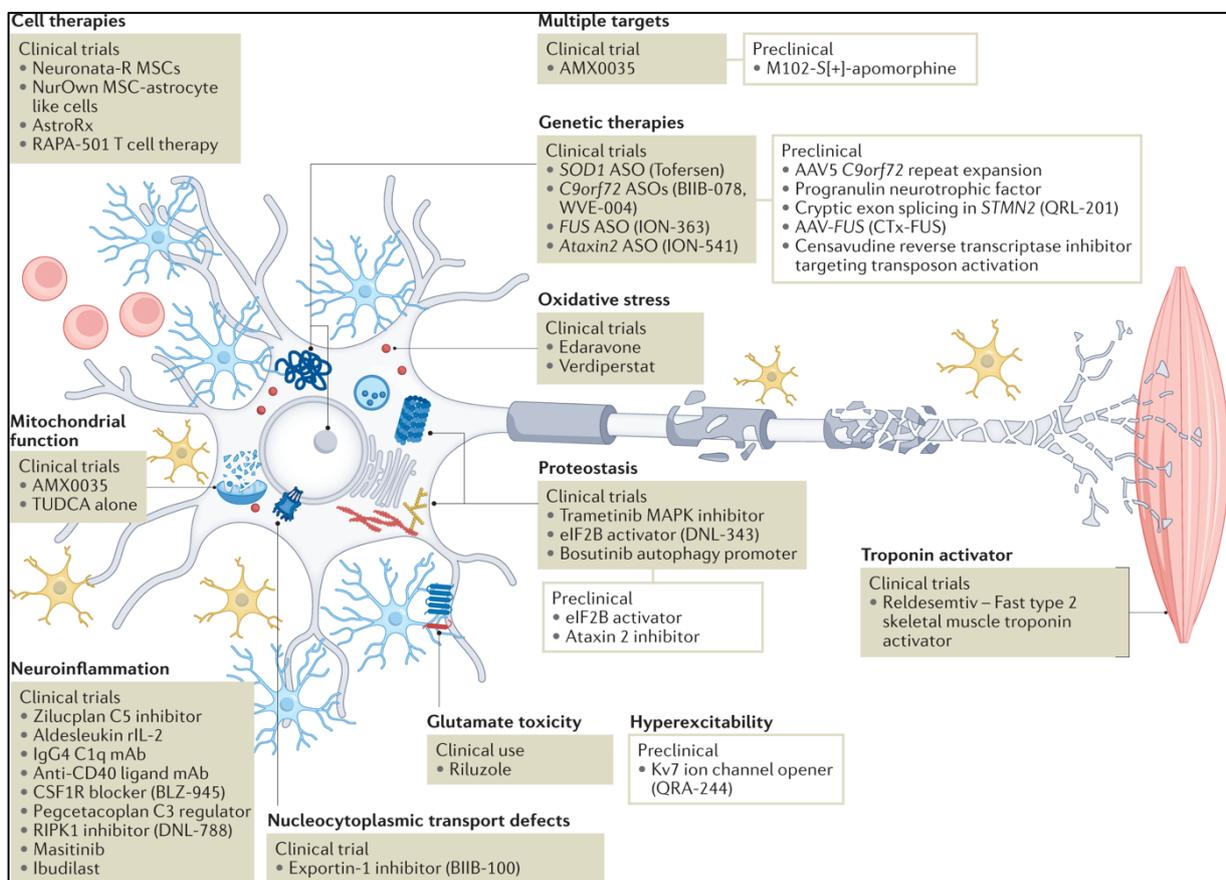


Figure 6- Les mécanismes physiopathologiques majoritairement ciblés dans la SLA et les thérapies associées en pré-clinique et clinique.

La neuro-inflammation est la voie thérapeutique la plus ciblée. La thérapie génique avec les ASO sont aussi bien représentés en clinique et ciblent des gènes spécifiques de la SLA. L'une des voies physiopathologiques encore peu ciblée dans la SLA est le métabolisme de l'ARN. **D'après:** Mead, Richard J et al. "Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation." *Nature reviews. Drug discovery* vol. 22,3 (2023): 185-212. doi:10.1038/s41573-022-00612-2.

1.1.4.2.2 Biomarqueurs

Les maladies provoquent des changements biologiques et morphologiques bien avant l'apparition des premiers symptômes, ce qui offre une opportunité d'intervention thérapeutique précoce pour prévenir les dommages irréversibles. Ainsi, l'identification de biomarqueurs pourrait également aider à prédire la progression de la SLA, à surveiller la réponse aux traitements et à évaluer l'efficacité des essais cliniques en cours. Plusieurs approches sont explorées, notamment : les neurofilaments (NfL) qui sont des protéines constituant le cytosquelette des neurones. Chez environ 15% des cas de SLA, liée à des variants pathologiques génétiques, les niveaux de NfL dans le sang augmentent significativement avant l'apparition des symptômes (Benatar et al., 2018). Cette augmentation est corrélée à la rapidité de la progression de la maladie, ce qui en fait un marqueur de prédiction précis pour ces formes de SLA. Cependant, les NfL ne sont pas encore un substitut validé pour mesurer directement le bien-être des patients atteints de SLA ou leur survie, ce qui est nécessaire pour être considéré comme un véritable point de remplacement (Benatar et al., 2018 ; 2023). Dans la catégorie des biomarqueurs, on retrouve aussi les protéines de certains types de lymphocytes, dont les quantités varient en fonction de l'évolution de la maladie chez les patients atteints de SLA (Luotti et al., 2020). Par exemple, ils ont identifié dans cette étude un groupe de protéines ayant un potentiel de biomarqueur dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC), y compris des protéines impliquées dans la stabilité de l'ARN et l'agglutination des protéines, comme PPIA (*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A*), HSC70 (*heat shock cognate protein 71 kDa*), hnRNPA2B1 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1*) et TDP-43. Le suivi de leur concentration sanguine pourrait servir de marqueur de la progression de la maladie (Luotti et al., 2020). De plus, l'imagerie fonctionnelle, telle que l'IRM et le PET-scan, pourrait permettre de mesurer des paramètres liés à l'atrophie de la moelle épinière et à l'inflammation, offrant ainsi des informations sur la progression de la maladie (Chew et al., 2019 ; Chollet et al., 2022). Des essais sont en cours pour valider l'utilité de ces marqueurs. En ce qui concerne les oxydants, les niveaux d'expression des produits du stress oxydatif tels que le 8-OHdG (*8-hydroxy-2'*

deoxyguanosine) et le dialdéhyde malonique (MDA) et des produits du système antioxydant tels que SOD1 et GPX (*glutathione peroxidase*) ont été rapportés comme étant modifiés dans les fluides corporels des patients atteints de SLA par rapport à ceux des patients témoins. Par conséquent, ce changement est suspecté d'être un candidat biomarqueur prometteur pour la SLA (Simpson et al., 2004 Blasco et al., 2017 ; Hosaka et al., 2021). Plusieurs études ont déjà montré que les niveaux de 8-OHdG dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), le plasma et l'urine étaient élevés chez les patients atteints de SLA sporadique et familiale par rapport aux patients témoins non malades et aux patients atteints d'autres maladies neurologiques (Ihara et al., 2005 ; Mitsumoto et al., 2008 ; Blasco et al., 2017).

Chapitre II- La protéine de liaison à l'ARN, TDP-43

1.1.5 Caractéristiques générales

La protéine TDP-43 initialement identifiée en 1995 comme un suppresseur de l'expression génétique du VIH-1, est une protéine qui se lie à l'ADN et l'ARN. Cette protéine est très conservée au cours de l'évolution et exprimée de manière ubiquitaire (Ou et al., 1995 ; Buratti et al., 2008 ; Palomo et al., 2019). C'est un membre largement exprimé de la famille des ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP) (Prasad et al., 2019). Dans des conditions physiologiques normales, TDP-43 est majoritairement nucléaire mais peut aussi faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Ayala et al., 2008). TDP-43 joue un rôle central dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la régulation du métabolisme des ARN incluant l'épissage alternatif des ARN pré-messagers, la stabilité et le transport des ARNm, la traduction, la régulation des ARN non-codants et joue également un rôle clé dans la réponse au stress cellulaire (Prasad et al., 2019). Il n'est donc pas surprenant que l'altération de ces mécanismes centraux dans la cellule soient en lien avec le développement de maladies neurodégénératives (Ash et al., 2010 ; Kabashi et al., 2010 ; Xu et al., 2011). En 2006, la protéine TDP-43 est retrouvée comme composant principal des inclusions cytoplasmiques hyper-phosphorylées et ubiquitinylées (**Figure 7**), une des signatures pathologiques majeures des patients atteints de SLA et de FTLD (Neumann et al., 2006 ; Arai et al., 2006). Plus tard, des mutations dominantes dans le gène TDP-43 sont identifiées comme étant une cause primaire de la SLA, si bien qu'aujourd'hui il existerait plus de 48 variantes pathogènes de TDP-43 associées à la maladie (Lattante et al., 2013). TDP-43 est constitué de plusieurs domaines. Un domaine N-terminal (NTD, 1-102aa), deux domaines de reconnaissance à l'ARN (RRM1, 106-177aa et RRM2, 192-259aa) ainsi qu'un domaine C-terminal (CTD, 274-414aa). Il contient aussi une séquence de localisation nucléaire (NLS, 82-98aa) et une séquence d'exportation nucléaire (NES, 239-250aa) (Ayala et al., 2008). La plupart des mutations qui sont des mutations faux sens se retrouvent localisées dans le domaine C-terminal. Nous allons maintenant décrypter l'architecture multi-domaine de TDP-43 pour comprendre ses fonctions physiologiques et enfin nous étudierons ses

caractéristiques pathologiques et son lien avec les maladies neurodégénératives telles que la SLA.

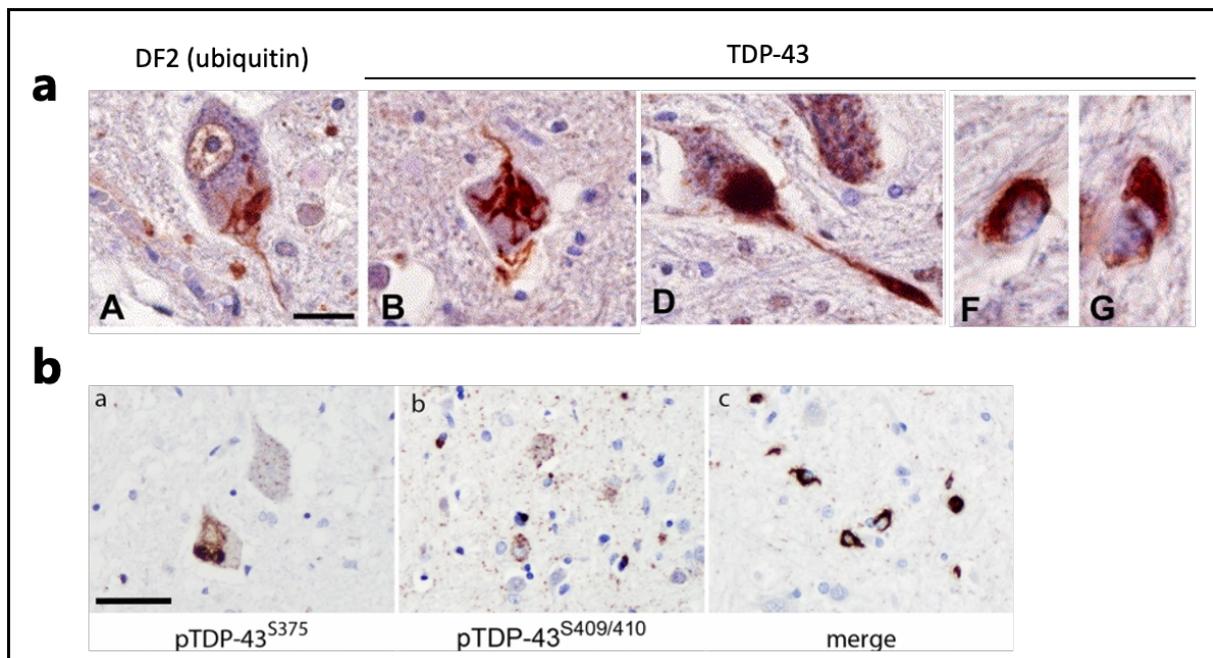


Figure 7- Immunomarcage de TDP-43 sur des tissus de la moelle épinière issus de patients atteints de SLA.

a. Les sections sont contre-colorées à l'hématoxyline. En A, on voit un marquage de l'anti-ubiquitine (DF2) et en B, un marquage avec un anticorps monoclonal contre TDP-43. Des inclusions dans les motoneurones sont visibles en marron foncé. Dans l'image D, il est représenté une inclusion arrondie et compacte dans le cytoplasme d'un neurone et une structure dystrophique de type neurite dans une dendrite apicale marquée par un anticorps polyclonal anti-TDP43. En F et G sont représentées des inclusions gliales positives pour TDP-43. b. On observe des inclusions cytoplasmiques dans la moelle épinière positives pour pTDP-43^{S375} et pTDP-43^{S409/410}. *Adapté de: Arai et al., 2006 ; Neumann et al., 2020*

1.1.6 Physiologie de TDP-43

1.1.6.1 Structure

La protéine TDP-43 contient 414 acides aminés et le gène codant TARDBP est situé sur le chromosome n°1. Elle comprend trois domaines : un domaine N-terminal (aa 1-102) contenant un signal de localisation nucléaire NLS (aa 82-98), deux motifs de reconnaissance à l'ARN, RRM1 (aa 106-176) et RRM2 (aa 192-262) avec un signal d'exportation nucléaire NES (aa 239-250) et une région C-terminale riche en glycines (aa 274-414) (**Figure 8**). Ces trois domaines ont des fonctions distinctes : le domaine NTD joue un rôle crucial dans la détermination du niveau de multimérisation de TDP-43 dans

la cellule (monomères, dimères ou oligomères), les RRM s'associent majoritairement à l'ARN mais aussi à l'ADN simple brin et des partenaires protéiques et puis le CTD est essentiel pour les interactions protéine-protéine ainsi que pour le processus de séparation de phase liquide-liquide (LLPS) (**Figure 8**).

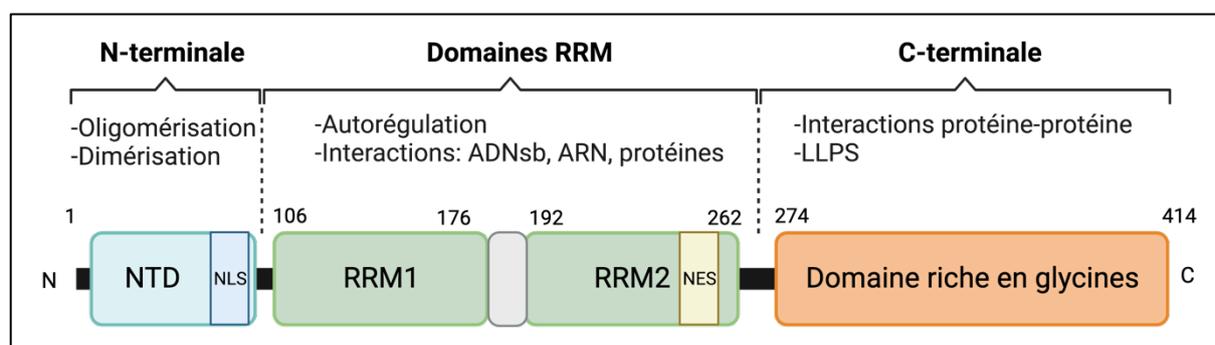


Figure 8- Structure et fonctions des domaines de la protéine TDP-43.

TDP-43 contient trois domaines fonctionnels : le domaine NTD (aa 1-102), deux motifs RRM de reconnaissance à l'ARN (aa 106-262) et le CTD (aa 274-414). Le NTD est important pour l'oligomérisation de TDP-43, les RRM sont principalement impliqués dans la liaison avec de nombreux partenaires d'interaction et présentent une grande affinité pour l'ADN simple brin (ADNsb), l'ARN et les protéines, tandis que le CTD est un important régulateur des interactions protéines-protéines et du processus LLPS.

Adapté de: Hergesheimer, Rudolf C et al. "The debated toxic role of aggregated TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis: a resolution in sight?." *Brain : a journal of neurology* vol. 142,5 (2019): 1176-1194. doi:10.1093/brain/awz078. **Créé avec BioRender.com.**

▪ Le domaine N-terminal (NTD)

Le NTD de TDP-43 est hautement conservé chez les animaux (Ayala et al., 2005) et joue un rôle crucial dans la fonction d'épissage de TDP-43 (Zhang et al., 2013). Le NTD existe dans un équilibre monomère-dimère dans des conditions physiologiques normales (Zhang et al., 2013). D'ailleurs, l'interface intermoléculaire entre monomères consécutifs est principalement formée par des résidus chargés et polaires (Wang et al., 2018). Le monomère NTD est constitué de six brins β et d'une seule hélice α (**Figure 9**) arrangée dans un domaine axin-1 (DIX), qui facilite la formation de dimères (Mompean et al., 2017). Plus tard, grâce aux techniques de RMN, il a été découvert que le domaine NTD et la forme pleine longueur de TDP-43 sont capables de former des oligomères *in vitro* et il a été suggéré que l'oligomérisation de TDP-43 serait nécessaire à sa fonction (Wang et al., 2018). D'autres preuves convergent vers une oligomérisation réversible du NTD ce qui augmenterait la propension du CTD à l'agrégation (Tsoi et al., 2017). Wang et ses

collègues (2018) ont suggéré qu'une substitution phosphomimétique S48E perturbait l'auto-association du NTD, le processus de séparation de phase liquide-liquide *in vitro*, et la fonction d'épissage de TDP-43. Il a aussi été rapporté que les dix premiers résidus de la NTD sont cruciaux pour la formation des homodimères fonctionnels et sont également impliqués dans l'agrégation de TDP-43 (Zhang et al., 2013). Il a été avancé que la dimérisation de TDP-43 via son NTD permettrait les interactions avec ses protéines partenaires et ARN cibles empêchant potentiellement son agrégation. En effet, la forme dimérique native du NTD de TDP-43 est essentielle et permet de protéger l'activité d'épissage des ARN pré-messagers, d'améliorer la solubilité et d'empêcher la formation des inclusions cytoplasmiques de TDP-43 (Jiang et al., 2017).



Figure 9- Structure tridimensionnelle du domaine N-terminal de TDP-43.

Ce domaine obtenu en RMN à partir de la protéine TDP-43 humaine exprimée chez *Escherichia coli*, est structuré en 6 brins β (jaune) et une hélice α (rose). Ce modèle (RCSB PDB ID : 2N4P) est disponible ici : <https://www.rcsb.org/structure/2N4P>. **D'après:** Mompeán M, Romano V, Pantoja-Uceda D, et al. *The TDP-43 N-terminal domain structure at high resolution. FEBS J. 2016;283(7):1242-1260. doi:10.1111/febs.13651.*

En outre, le NTD possède un signal de localisation nucléaire (NLS, aa 82-98) qui se trouve dans le linker entre le NTD et les domaines de liaison à l'ARN (RRM1/2). Le NLS est reconnu par la protéine Importine- α pour le transport actif de TDP-43 dans le noyau (Winton et al., 2008 ; Pinarbasi et al., 2018). Une étude récente a révélé que la phosphorylation du NLS réduit l'affinité pour l'importine α 1/ β et perturbe l'interface de dimérisation du domaine NTD de TDP-43 (Doll et al., 2022). Des études montrent que

des formes tronquées du NLS entraînent une relocalisation cytoplasmique et une agrégation de TDP-43 (Winton et al., 2008 ; Barmada et al., 2010).

- **Les motifs de reconnaissance à l'ARN, RRM1/2**

TDP-43 contient deux motifs de reconnaissance à l'ARN (RRM1 et RRM2, RRM1/2) qui sont importants pour la liaison spécifique à l'ARN avec une affinité plus grande pour les séquences courtes et riches en UG des molécules d'ARN (Kuo et al., 2014). Un linker d'une quinzaine d'acides aminés sépare les domaines RRM1/2 qui sont très bien conservés (Conlon et Manley, 2017). Les deux domaines RRM de TDP-43 présentent un repliement canonique ($\beta1\alpha1\beta2\beta3\alpha2\beta4$) caractéristique des RRM avec une structure secondaire supplémentaire β -hairpin ($\beta3'\beta3''$), insérée entre $\alpha2$ et $\beta4$, qui élargit la surface du feuillet β accessible pour la liaison à l'ARN (Lukavsky et al., 2013 ; Sun et Chackrabartty, 2017). Il a été démontré que le RRM1 est suffisant et essentiel pour une liaison correcte aux acides nucléiques (Furukawa et al., 2016). Le RRM2 pourrait contribuer à la dimérisation de la protéine TDP-43 (Kuo et al., 2009). TDP-43 ciblerait plus de 6000 ARN, y compris des ARN spécifiques aux neurones impliqués dans des troubles neurodégénératifs (Polymenidou et al., 2011 ; Tollervey et al., 2011). Il est intéressant de noter que TDP-43 se lie activement aux régions 3' non traduites (UTR) de plusieurs milliers de transcrits d'ARNm et autorégule son propre ARNm pour contrôler sa propre concentration cellulaire et peut être aussi sa solubilité (Ayala et al., 2011). L'étude menée par Lukavsky et ses collègues (2013) a permis de démontrer que de nombreuses mutations dans les domaines RRM altéraient la capacité de liaison à l'ARN tout en n'interférant pas de manière significative avec la reconnaissance de l'ARN. De plus, une mutation pathologique K181E située dans le *linker* entre les domaines RRM1 et RMM2 conduit à l'agrégation de TDP-43 et réduit l'affinité pour ses ARN cibles (Chen et al., 2019). D'autres études récentes montrent que le recrutement de TDP-43 dans les granules de stress riches en ARNm permet de préserver la solubilité de TDP-43 dans le cytoplasme (Mann et al., 2019 ; Zacco et al., 2019) mais aussi dans le noyau avec l'ARN nucléaire dans des conditions normales (Maharana et al., 2018 ; Wang et al., 2020).

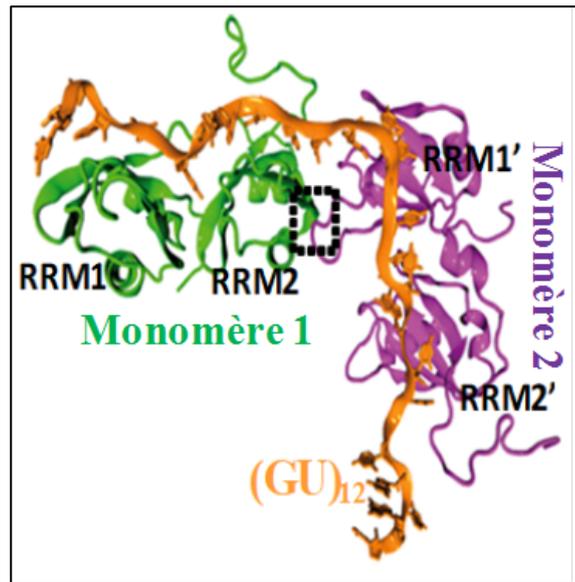


Figure 10- Modèle tridimensionnel correspondant aux domaines RRM1/2 fixé à l'oligonucléotide (GU)₁₂ avec l'interface d'interaction (carré pointillé noir) entre le monomère 1 et le monomère 2.
D'après : Laboratoire SABNP.

Enfin, une autre étude récente a démontré que l'altération de la liaison coopérative de TDP-43 à l'ARNm peut être critique pour maintenir la solubilité de TDP-43 dans le noyau et dans le cytoplasme en particulier dans les granules de stress enrichies en ARNm (Rengifo-Gonzalez et al., 2021). Récemment, Rengifo et al. (2021) ont montré que la liaison coopérative de TDP-43 sur de longues répétitions riches en GU trouvées dans les introns des ARN cibles conduit à une multimérisation réversible de TDP-43 via une interaction intermoléculaire impliquant des domaines RRM2 et RRM1 de deux unités adjacentes de TDP-43 (**Figure 10**). Cette interface intermoléculaire implique une poche centrée autour du résidu Val220, localisé dans le domaine RRM2 du premier monomère et la boucle 3 du domaine RRM1 de la seconde unité monomérique. Les résidus d'acides aminés et les interactions mises en jeu, pour la stabilité de cette interface, ont été identifiés. Ces assemblages favoriseraient ainsi la dynamique et la solubilité des complexes TDP-43/ARN et ainsi ses fonctions physiologiques.

Un signal d'export nucléaire (NES, aa 239-250) est également présent dans le RRM2 de TDP-43 et des mutations dans ce domaine entraînent une accumulation anormale de TDP-43 dans le noyau (Buratti et al., 2010).

- **Le domaine C-terminal**

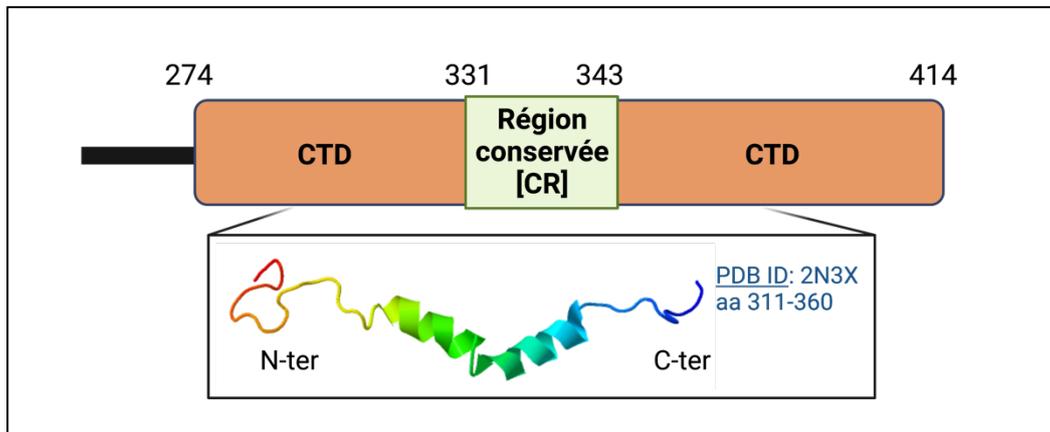


Figure 11- Le domaine C-terminal de TDP-43 est faiblement structuré.

Le domaine CTD de TDP-43 est riche en résidus polaires (acide aspartique et glutamique). Une courte région du domaine CTD riche en résidus aliphatiques comprises entre les aa 321 et 340 qui abrite une sous-région conservée en hélice- α (région conservée [CR]) a été identifiée. Cette hélice favoriserait la dimérisation de TDP-43 par le biais d'un contact intermoléculaire hélice-hélice et serait importante pour la capacité de TDP-43 à se séparer en phase. **Adapté de:** Conicella, Alexander E et al. "ALS Mutations Disrupt Phase Separation Mediated by α -Helical Structure in the TDP-43 Low-Complexity C-Terminal Domain." *Structure (London, England : 1993) vol. 24,9 (2016): 1537-49. doi:10.1016/j.str.2016.07.007.* Créé à partir de Biorender.com.

Le domaine C-terminal (CTD) de TDP-43 est fortement désordonné avec des séquences de faible complexité qui comprend une région riche en glycine, un segment riche en acides aminés polaires non chargés, la glutamine et l'asparagine (Q/N) et une autre région enrichie en glycine et en sérines (**Figure 11**) (François-Moutal et al., 2019). La composition du CTD présente des similarités aux domaines de type prion (PrLD) de plusieurs protéines de levure, dont Sup35 ou encore Rnq1 lui permettant ainsi d'être très flexible. Ces protéines de levure contiennent un domaine prionogène et peuvent passer d'une conformation désordonnée à une conformation de type amyloïde riche en feuillets cross- β , parfois en tant que réponse physiologique adaptative (Liebman et Chernoff, 2012). Parmi les protéines humaines contenant un domaine de type prion, environ 29% sont des protéines de liaison à l'ARN telles que EWRS1, FUS ou encore TAF15 qui sont elles-mêmes impliquées dans la pathogénèse de diverses maladies neurodégénératives (Monahan et al., 2018). Au niveau de ses fonctions, le CTD de TDP-43 est connu pour être un important régulateur des interactions protéine-protéine et du processus de séparation de phase liquide-liquide (LLPS) (Prasad et al., 2019). Ces interactions protéine-

protéine sont cruciales pour la régulation de l'expression génique et le traitement de l'ARN. Plus particulièrement, le CTD de TDP-43 peut interagir avec les protéines de la famille hnRNP *in vitro*, telles que hnRNPA2/B1 et hnRNP C, afin de sélectionner le site d'épissage des ARNm de TDP-43 (D'Ambrogio et al., 2009). La fonction la plus connue de TDP-43 dans l'épissage est celle de la répression de l'inclusion des exons cryptiques, par exemple l'exon 9 de l'ARNm CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Tollervey et al., 2011) ou celui du gène *UNC13A* (*unc-13 homolog A, C.elegans*) (Ma et al., 2022). Dans le cas de la transcription, le CTD de TDP-43 interagit avec l'ARN polymérase II et agit en tant que répresseur transcriptionnel des gènes, notamment le gène *acrv1* dans les spermatocytes (Lalmansingh et al., 2011). TDP-43 interagit également avec d'autres RBP, notamment FUS ou TIA1 (Cytotoxic granule associated RNA binding protein), des protéines impliquées dans la réponse immunitaire des protéines de choc thermique (Hsp40, Hsp70), mais aussi des protéines impliquées dans la réponse au stress cellulaire, notamment SOD1 (Prasad et al., 2019). Il a également été montré que le domaine CTD de TDP-43 est impliqué dans la formation d'agrégats pathologiques. Premièrement, les protéines contenant une région intrinsèquement désordonnée (IDR) sont sujettes à l'agrégation (Santamaria et al., 2017). Il a été montré que la suppression de l'IDR de TDP-43 réduit la formation d'agrégats de la protéine dans les cellules (Prasad et al., 2018). Deuxièmement, sur une cinquantaine de mutations dans le gène TARDBP, codant la protéine TDP-43, environ 29 se retrouvent localisées dans le domaine CTD de TDP-43 (Buratti et al., 2015).

Le domaine CTD de TDP-43 est également impliqué dans le processus de séparation de phase liquide-liquide (LLPS), mécanisme important permettant de former des condensats sans membrane ayant des fonctions biologiques spécifiques tels que les granules de stress. Des études récentes ont révélé l'existence d'une courte région conservée (CR) couvrant les aa 320-343 susceptible d'adopter une structure en hélice- α (**Figure 11**), en particulier lorsque TDP-43 subit une LLPS. Cette structure pourrait induire une dimérisation de TDP-43 par un contact intermoléculaire hélice-hélice ce qui favoriserait la formation des structures LLPS (Conicella et al., 2016, 2020). De plus, la

région CR est critique puisqu'à elle seule, elle héberge sept variants associés à la SLA (Buratti et al., 2018). Ce processus sera présenté plus en détails dans le **chapitre III**. Des mutations dans le CTD de TDP-43 ou des conditions de stress spécifiques peuvent favoriser une transition d'une phase liquide à une phase solide dite d'agrégats irréversibles (Patel et al., 2015) (**Cf Chapitre III**). En plus des mutations et des conditions de stress, des études ont montré que les gouttelettes liquides vieilles (laissées plusieurs jours) sont susceptibles de former progressivement des fibrilles riches en brins β (Conicella et al., 2020 ; Fonda et al., 2021). En outre, des études ont également montré que le CTD de TDP-43 est une région propice aux modifications post-traductionnelles dont la phosphorylation qui peut entraîner la formation d'agrégats de TDP-43 *in vitro* et *in vivo* (Choksi et al., 2014 ; Nonaka et al., 2016). Troisièmement, des fragments C-terminaux (CTF) de TDP-43 d'environ 25 et 35 kDa peuvent être générés par le clivage protéolytique de la caspase 3 au niveau des résidus Asp89 et Asp219 dans les cellules en culture (Dormann et al., 2009). Les CTF sont caractéristiques de la pathologie puisqu'ils sont retrouvés dans les inclusions des cerveaux de patients atteints de SLA, et en particulier les fragments CTF de ~25 kDa sont la forme la plus abondante (Zhang et al., 2007, 2009).

1.1.6.2 Fonctions biologiques

Étant donné la complexité de la structure de la protéine et de la localisation subcellulaire variable, TDP-43 est une protéine qui participe à de nombreux processus cellulaires et moléculaires. Au niveau cellulaire, TDP-43 joue un rôle important dans le développement et le maintien du système nerveux central (CNS). Au niveau moléculaire, TDP-43 qui est une protéine de liaison à l'ARN, intervient dans les différentes étapes du métabolisme de l'ARN et de la régulation de l'expression des gènes, en passant de la transcription au transport de l'ARN et à la traduction (**Figure 12**).

_____ Ses cibles sont principalement des acides nucléiques (ARN, ADN) et des protéines (Han et al., 2010). Outre son importante implication dans la régulation de l'ARN, TDP-43 peut contribuer à la formation d'organites sans membrane grâce à sa capacité à se

séparer en phase via le processus LLPS, médié par le CTD (Prasad et al., 2019) qui fait l'objet d'une description détaillée dans le **chapitre III**.

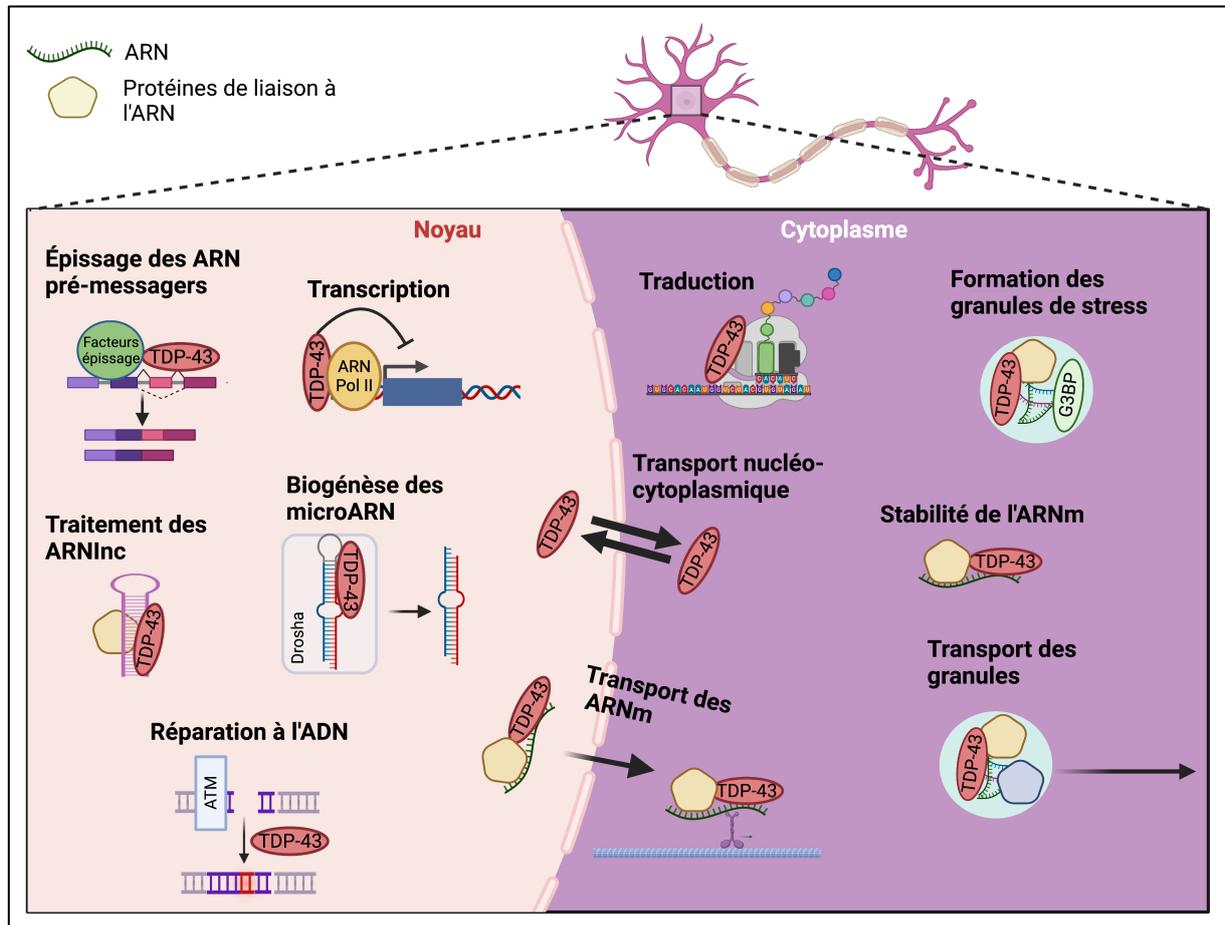


Figure 12- Les fonctions de TDP-43 en lien avec le métabolisme de l'ARN/ADN.

TDP-43 est impliquée dans de nombreuses étapes du métabolisme de l'ARN : épissage et traitement des ARNinc/microARN dans le noyau, transport et stabilité des ARNm, traduction, formation des granules de stress et transport des granules dans le cytoplasme. Quant aux fonctions liées au traitement de l'ADN, elles comprennent la transcription et la réparation à l'ADN. **Adapté de:** Prasad, Archana et al. "Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Frontiers in molecular neuroscience* vol. 12 25. 14 Feb. 2019, doi:10.3389/fnmol.2019.00025. **Créé avec BioRender.com.**

▪ Fonctions moléculaires liées à la régulation des ARN

a) Épissage des ARNm

L'épissage alternatif est une étape cruciale de l'expression génique réalisé par un complexe de protéines, nommé spliceosome et qui permet de générer l'ARNm mature à partir du transcrit précurseur (ARN pré-messager). Les introns de l'ARN pré-messager sont supprimés et les exons sont réunis ou exclus dans certains cas pour former la

séquence codante qui sera traduite en protéine. Dans le noyau, TDP-43 se lie spécifiquement aux séquences riches en GU avec des affinités de l'ordre du nanomolaire au sein des séquences introniques permettant ainsi la régulation de l'épissage (Tollervey et al., 2011 ; Polymenidou et al., 2011). Notamment, les transcrits avec de longs introns possèdent de nombreux sites de liaison riches en GU (Polymenidou et al., 2011). Par ailleurs, TDP-43 agit comme un gardien du transcriptome en réprimant l'épissage des exons « cryptiques » (Donde et al., 2019), des séquences introniques qui ne sont normalement pas épissées dans les ARNm matures (Ling et al., 2015). L'exemple le plus connu est celui de l'exon 9 de l'ARNm *CFTR* (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) qui code pour le régulateur transmembranaire de conductance impliqué dans la mucoviscidose. L'inclusion incorrecte de l'exon 9 dans le transcrit de *CFTR* conduit à la production d'une protéine CFTR anormale, contribuant ainsi à la pathogenèse de la mucoviscidose (Burrati et al., 2001, 2004). L'épissage par l'intermédiaire de TDP-43 lui permet aussi de réguler finement son propre transcrit. TDP-43 régule les événements d'épissage de plusieurs ARNm importants tels que *CFTR*, *TARDBP*, *HTT*, *SNCA*, *STMN2* et *UNC13A* (Buratti et Baralle, 2001 ; Polymenidou et al., 2011, 2012 ; Klim et al., 2019 ; Ma et al., 2022) dont une grande majorité est impliquée dans des fonctions neuronales. Par ailleurs, il a été mis en évidence que sa fonction d'épissage est compromise dans la SLA et dans d'autres protéinopathies de TDP-43 (Sun et al., 2017). En effet, la déplétion nucléaire de TDP-43 entraîne des défauts d'épissage de l'ARNm. De même, la surexpression de TDP-43 peut engendrer des complexes d'épissage dysfonctionnels en raison de l'approvisionnement limité de partenaires protéiques. Ces altérations du processus d'épissage sont préjudiciables pour les neurones (Heyburn et Moussa, 2016 ; Lu et al., 2016). Dans un modèle de souris transgénique, les mutations de TDP-43 associées à la SLA, Q331K et M337V, induisent des changements des processus d'épissage de l'ARNm (Polymenidou et al., 2012 ; Lagier-Tourenne et al., 2012 ; Arnold et al., 2013). Une étude récente a montré que la perte nucléaire de TDP-43 dans des lignées cellulaires neuronales a entraîné l'inclusion de l'exon cryptique dans l'ARNm *UNC13A* et une réduction de l'expression de la protéine *UNC13A* impliquée dans la

régulation de la libération des neurotransmetteurs dans les synapses. Elle joue un rôle crucial dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique, ce qui permet la libération des neurotransmetteurs pour la transmission de l'influx nerveux entre les neurones (Rosa Ma et al., 2022). Ainsi, ces défauts pourraient être liés à la perte de fonction de TDP-43 dans le noyau causant un changement dans le métabolisme de l'ARN.

b) Transport axonal des ARNm

Les neurones sont des structures complexes caractérisés par de longs axones qui communiquent entre eux par des synapses et qui sont très éloignés du corps cellulaire. TDP-43 est une protéine de liaison à l'ARN qui est impliquée dans le transport axonal de l'ARNm. En effet, TDP-43 peut transloquer dans le cytoplasme et il est connu qu'elle s'associerait à l'ARNm pour former des granules de RNP afin de les transporter dans les axones à l'aide du réseau de microtubules où ils seront traduits localement en protéines (Alami et al., 2014). La traduction locale au niveau des axones est nécessaire au bon fonctionnement de la cellule, il est donc essentiel de transporter l'ARNm jusqu'au lieu de sa traduction. Cependant, il existe des mutations de la protéine TDP-43 associées à la SLA qui altèrent le transport des granules de RNP causant une perturbation de l'homéostasie neuronale et un dysfonctionnement neuronal (Khalil et al., 2018).

c) Stabilité des ARNm

La stabilisation de l'ARN est un processus faisant intervenir des protéines de liaison à l'ARN qui vont favoriser ou inhiber la machinerie de dégradation de l'ARN. C'est ainsi que TDP-43 régule la stabilité de plusieurs ARNm y compris celle de son propre ARNm (Ayala et al., 2011 ; Costessi et al., 2014). La capacité de liaison de TDP-43 aux séquences 3'UTR de ces ARNm est responsable de la régulation de la stabilité de l'ARNm (Tollervey et al., 2011). Cette liaison aux ARNm cibles affecte la demi-vie sous deux aspects : TDP-43 peut soit maintenir la stabilité de l'ARNm en se liant à la partie 3'UTR, c'est le cas de l'ARNm de *NEFL* (*Neurofilament Light Chain*) soit promouvoir la désintégration de

l'ARNm dont celui de *VEGFA* (*Vascular Endothelial Growth Factor A*) ou de celui de la *GRN* (*Progranulin*) (Volkening et al., 2009 ; Colombrita et al., 2012). Au total, TDP-43 modifie la stabilité de 1330 transcrits et en déstabilise près de 75% (Sidibé et al., 2021).

d) Biogénèse et traitement des microARN et ARNInc

Il existe une variété d'ARN dont les ARN non codants, qui sont issus de la transcription de l'ADN mais qui ne seront pas traduits en protéine. On peut notamment citer les microARN (miARN), des petits ARN d'une vingtaine de bases et longs ARN non-codants (ARNInc), contenant plus de 200 nucléotides. Leurs fonctions restent encore mal comprises mais ils semblent importants pour la régulation des gènes et leur dérégulation a des implications dans le développement des cancers (Zhang et al., 2021). Des études ont constaté la liaison de TDP-43 au complexe nucléaire Drosha afin de se lier de manière directe aux miARN pour faciliter la production de miARN précurseurs (pré-miARN) (Kawahara et Mieda-Sato, 2012). A l'inverse, la régulation à la baisse de TDP-43 et le stress cellulaire sont responsables de l'altération de la production de deux miARN dans les cellules HEK293T (Hawley et al., 2020). Une autre étude a mis en lumière l'interaction de TDP-43 à NEAT1 (*Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1*), un ARNInc abondant dans les paraspeckles, des condensats nucléaires formés par la LLPS (Naganuma et al., 2012). En particulier, des expériences d'immunoprécipitation (CLIP) ont montré que les niveaux du transcrit NEAT1 sont augmentés dans le cerveau des patients atteints de SLA et dans d'autres maladies neurodégénératives (An et al., 2018). Fait intéressant, il a été récemment montré que la surexpression de l'isoforme constitutif de NEAT1, NEAT1_1 améliore la toxicité de TDP-43 dans des modèles de drosophile et de levure de la protéinopathie de TDP-43 suggérant un rôle plutôt protecteur de NEAT1_1 (Matsukawa et al., 2021). Enfin, la régulation croisée de NEAT1 et TDP-43 est importante pour leurs fonctions dans la différenciation et la pluripotence des cellules souches (Modic et al., 2019).

e) Traduction

De nombreuses RBPs sont impliquées dans le contrôle globale ou spécifique de la traduction des protéines. TDP-43 possède de nombreux partenaires protéiques impliqués dans la traduction tels que des facteurs de régulation de la traduction ou les sous-unités des ribosomes (Coyne et al., 2014 ; Chu et al., 2019). Il a été démontré que TDP-43 influence la traduction d'ARNm spécifiques, à la fois positivement et négativement (Majumder et al., 2012). Par exemple, il a été constaté que TDP-43 réprime la traduction des ARNm *futsch* et *hsc70-4* dans les axones (Coyne et al., 2014,2017) et le transcrit de *Rac1* dans les dendrites (Chu et al., 2019). TDP-43 peut aussi inhiber la traduction de plusieurs ARNm via leur séquestration dans les granules de stress afin de les protéger des effets du stress cellulaire (Aulas et Vande Velde, 2015). Au contraire, TDP-43 se lie directement aux ARNm *Mig12* et *Camta1* afin de favoriser leur traduction. Cependant, ces transcrits sont liés aux maladies neurodégénératives dont la SLA, suggérant ainsi qu'un défaut de la traduction pourrait contribuer au développement de la maladie (Neelagandan et al., 2019).

▪ Métabolisme de l'ADN

Des fonctions liées au métabolisme de l'ADN telles que la transcription ou la réparation de l'ADN impliquant des RBPs ont également été décrites. En particulier, TDP-43 semble jouer un rôle global dans la régulation de la transcription mais ses fonctions exactes sont moins établies que la protéine FUS par exemple. Des études ont cependant révélé que TDP-43 se retrouve enrichi au niveau des fibrilles de périchromatine (PFs), des sites nucléaires de transcription (Casafont et al., 2009). Ces données semblent suggérer un rôle régulateur de TDP-43 en tant que facteur de transcription. En effet, TDP-43 participe au contrôle de la transcription de certains gènes en agissant en tant que répresseur transcriptionnel, notamment pour le gène de souris SP-10 (*mouse acrosomal protein*) durant la spermatogénèse (Lalmansingh et al., 2011). Un autre exemple récent est celui de la répression par TDP-43 du gène VPS4B *in vivo* (*Vacuolar protein sorting 4 homolog B*). TDP-43 pourrait également jouer un rôle supplémentaire en stabilisant la

machinerie de transcription au niveau du promoteur et ainsi rester liée même après avoir cessé d'agir comme répresseur (Schwenk et al., 2016). De nouvelles études ont mis en évidence un rôle essentiel de TDP-43 dans la réparation des cassures d'ADN par jonction non homologue (NHEJ) en régulant le recrutement des facteurs de réparation NHEJ classiques sur les sites de cassures en réponse aux agressions génomiques (Mitra et Muralidhar, 2019). Il a été montré qu'une perte de fonction de la protéine TDP-43 dans les motoneurones spinaux provoque des défauts de réparation des cassures de l'ADN qui ont été liés au développement de la SLA (Mitra et Muralidhar, 2019).

- **Autres fonctions cellulaires**

Outre ses fonctions dans le métabolisme des ARN et de l'ADN, la protéine TDP-43 est impliquée dans de nombreux processus cellulaires dont l'autophagie. TDP-43 joue un rôle important dans la régulation de la dégradation des protéines et des organites défectueux par l'autophagie (Wang et al., 2008). Des études ont montré que la protéine TDP-43 est impliquée dans la régulation de l'autophagie de plusieurs manières, tout d'abord TDP-43 est capable d'interagir directement avec les protéines impliquées dans la formation de la membrane autophagique, telles que Atg7 et Atg12 (Wang et al., 2012). De plus, TDP-43 régule également la traduction de certaines protéines nécessaires à la formation de la membrane autophagique, comme Atg12 et LC3 (Budini et al., 2017). Enfin, la régulation de l'autophagie par TDP-43 pourrait être altérée dans les maladies neurodégénératives telles que la SLA (Deng et al., 2011).

En plus de son rôle dans l'autophagie, TDP-43 est également impliquée dans la régulation de la fonction mitochondriale, une fonction qui suscite encore une controverse (Wang et al., 2013). Plusieurs études ont montré que TDP-43 interagit avec des protéines impliquées dans la régulation de la fission, de la fusion et de la bioénergétique mitochondriales (Wang et al., 2016 ; Gao et al., 2019). En outre, la surexpression de TDP-43 peut induire une fragmentation mitochondriale et une diminution de l'activité respiratoire, ce qui suggère un rôle clé de TDP-43 dans le

maintien de la fonction mitochondriale normale (Wang et al., 2013 ; Magrané et al., 2014).

Enfin, la protéine TDP-43 est impliquée dans le développement synaptique et neuronal. Des études ont montré que TDP-43 est exprimé à des niveaux élevés dans les neurones et joue un rôle important dans la régulation de la plasticité synaptique, de la formation de la membrane axonale et du transport des ARNm dans les neurones (Iguchi et al., 2013 ; Wu et al., 2015). Des études ont également montré que la surexpression de TDP-43 peut entraîner une perturbation de la formation des synapses et de la signalisation neuronale, ce qui suggère un rôle clé de TDP-43 dans le développement neuronal normal (Jiang et al., 2019 ; Lépine et al., 2022).

En somme, toutes ces fonctions cellulaires sont interconnectées et cruciales pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. En cas de dérégulation, elles peuvent engendrer des maladies dont la SLA. Nous allons examiner dans la partie suivante, les mécanismes physiopathologiques de TDP-43 impliqués dans la SLA.

1.1.7 Physiopathologie de TDP-43

1.1.7.1 Délocalisation cytosolique

La délocalisation de TDP-43 dans le cytoplasme est un événement clé dans la pathologie de la SLA et d'autres maladies neurodégénératives. TDP-43 est normalement une protéine nucléaire impliquée dans la régulation de l'expression des gènes et le traitement de l'ARN. Cependant, dans la SLA, TDP-43 est trouvée dans le cytoplasme des neurones affectés, où elle forme des agrégats (Neumann et al., 2006). Les mécanismes sous-jacents à cette délocalisation sont complexes et encore mal compris, mais plusieurs hypothèses ont été proposées. Plusieurs études ont suggéré que des défauts dans l'import nucléaire pourraient être à l'origine de cette redistribution pathologique et responsable des niveaux accrus de TDP-43 dans le cytoplasme (Hutten et Dormann, 2020). L'import nucléaire de TDP-43 est régulé par la séquence signal de localisation nucléaire (NLS) présent dans la protéine. La séquence NLS permet à TDP-43 de se lier à des protéines d'import nucléaire et d'être transportée dans le noyau (Prasad et al., 2019).

Des mutations dans la région NLS de TDP-43 ont été associées à des défauts d'import nucléaire de la protéine dans des modèles cellulaires et dans des tissus de patients atteints de SLA (Bäumer et al., 2010 ; Budini et al., 2012). De plus, des modifications post-traductionnelles de TDP-43, telles que la phosphorylation, pourraient perturber l'interaction entre TDP-43 et les protéines d'import nucléaire (importines), conduisant à une délocalisation cytosolique de la protéine (Nonaka et al., 2013). Des études ont également suggéré que l'agrégation des importines pourrait jouer un rôle dans la mauvaise localisation cytoplasmique de TDP-43. Il a été montré que TDP-43 interagit avec la protéine d'import nucléaire *Transportin-1* (TRN-1) afin de réguler son propre transport (Ling et al., 2010). Il a été également suggéré que l'agrégation de TRN-1 peut perturber cette interaction et conduire à la délocalisation de TDP-43 dans le cytoplasme (Chen et al., 2016) tout comme la surexpression de l'Importine- β , une autre protéine de transport (Zhang et al., 2017). De plus, il a été proposé que l'agrégation des importines pourrait également contribuer à la formation des agrégats de TDP-43. Des études ont montré que les agrégats de TDP-43 sont associés à l'accumulation d'importines dans le cytoplasme des cellules touchées par la SLA (Nonaka et al., 2013). En outre, l'interaction entre TDP-43 et les importines dans le cytoplasme peut conduire à la formation de complexes qui favorisent l'agrégation de la protéine (Wang et al., 2013). Néanmoins, une fois que TDP-43 s'accumule dans le cytoplasme, la protéine resterait soluble et distribuée de manière homogène (Ayala et al., 2011 ; Bentmann et al., 2012), suggérant que le défaut d'import nucléaire n'est pas à lui seul responsable de l'agrégation pathologique de TDP-43.

1.1.7.2 Mutations pathologiques

Une cinquantaine de mutations dans le gène TARDBP ont été associées à la SLA. Ces mutations se trouvent majoritairement dans la partie CTD de TDP-43 (Sreedharan et al., 2008 ; Buratti, 2015) (**Figure 13**).

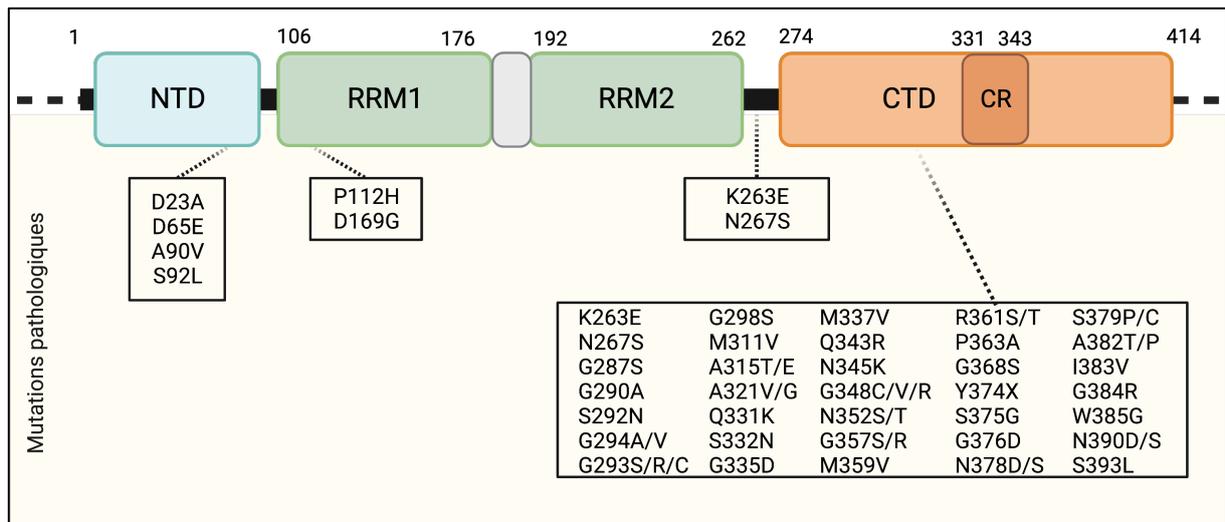


Figure 13- Mutations pathologiques de TDP-43 associées à la SLA.

L'ensemble des mutations générant des substitutions d'acides aminés de la protéine TDP-43 dans la SLA et SLAs sont présentées. La majorité des mutations se regroupent dans le domaine de faible complexité de TDP-43 (CTD/LCD). **Adapté de:** Prasad, Archana et al. "Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Frontiers in molecular neuroscience* vol. 12 25. 14 Feb. 2019, doi:10.3389/fnmol.2019.00025. **Créé avec Biorender.com.**

Les mutations dans le CTD renforcent la propension intrinsèque à l'agrégation de la protéine TDP-43. Une étude a montré que les protéines TDP-43 exprimées de manière recombinée *in vitro*, et portant les mutations liées à la SLA, y compris Q331K, M337V, Q343R, N345K, R361S et N390D favorisent la cytotoxicité dans les cellules de levure (Johnson et al., 2009). De plus, la mutation A315T de TDP-43 provoque la formation de fibrilles amyloïdes et conduit à la mort des neurones en culture primaire (Guo et al., 2011). Les mutations de TDP-43 conduisent à une protéinopathie TDP-43 et des symptômes de SLA identiques à ceux de la SLAs. Néanmoins certaines mutations de TDP-43 qui ont une plus grande propension à l'agrégation, et c'est notamment le cas de G294V, A315T, M337V, G376D et A382T, induisent la mauvaise localisation de TDP-43 (Mitsuzawa et al., 2018 ; Mutihac et al., 2015). En outre, il a été décrit que certaines mutations de TDP-43 telles que D169G, A315T, Q343R, G348C et R361S modulent la dynamique des GS (Prasad et al., 2019). Il a été observé que ces mutations induisent la formation de plus grands GS et la réduction de leur mobilité et de leur densité de distribution ce qui nuit à l'homéostasie de l'ARN et conduit à un dysfonctionnement neuronal. Il a été aussi observé que les protéines mutantes TDP-43 ont une demi-vie plus

longue qui peut être corrélée avec l'accélération de l'apparition de la maladie. Ainsi, les mutations de TDP-43 associées à la SLA telles que D169G, K263E, G298S, A315T, M337V, Q343R, G348C, N352S et A382T, contribuent à l'accélération de la pathologie et augmentent la propension à l'agrégation de TDP-43 dans la SLA (Austin et al., 2014 ; Watanabe et al., 2013).

1.1.7.3 Modifications post-traductionnelles

Une modification post-traductionnelle (MPT) est une modification qui implique l'ajout covalent d'un groupement chimique sur un acide aminé ou implique une modification enzymatique comme le clivage protéolytique après sa synthèse ribosomique (Buratti, 2018). Les MPT peuvent être réversibles, par exemple la phosphorylation ou irréversible comme la protéolyse. Ces modifications sont essentielles pour réguler la structure, la fonction et l'interaction des protéines dans les cellules, ainsi que leur localisation subcellulaire et leur stabilité. TDP-43 subit un grand nombre de MPT, notamment la phosphorylation, l'ubiquitination, la protéolyse, l'acétylation, l'oxydation, la méthylation ou encore la O-GlcNAc-glycosylation (**Figure 14**) (Maurel et al., 2019 ; Sternburg et al., 2022).

La plupart d'entre elles ont été identifiées dans les inclusions cytoplasmiques pathologiques de TDP-43 (Buratti, 2018). Parmi elles, on peut citer les principales, à savoir l'hyper-phosphorylation de TDP-43, l'ubiquitination et la formation des fragments C-terminaux (CTF) (Neumann et al., 2006). La phosphorylation de TDP-43 a été largement étudiée dans la SLA, et elle est considérée comme l'une des signatures pathologiques la plus importante. La phosphorylation consiste brièvement en l'ajout d'un groupement phosphate sur une sérine, une thréonine ou une tyrosine d'une protéine. Des études ont montré que TDP-43 est hyper-phosphorylée dans les neurones de patients atteints de SLA, ce qui peut entraîner sa mauvaise localisation dans le cytoplasme et la formation d'agrégats pathologiques. Il a été décrit que plusieurs kinases, dont CK1 (Casein kinase 1), GSK3- β (Glycogène Synthase Kinase 3b), ERK (Extracellular signal-regulated kinase) et

p38 (p38 mitogen-activated protein kinases) sont impliquées dans la phosphorylation de TDP-43 dans la SLA (Hasegawa et al., 2018).

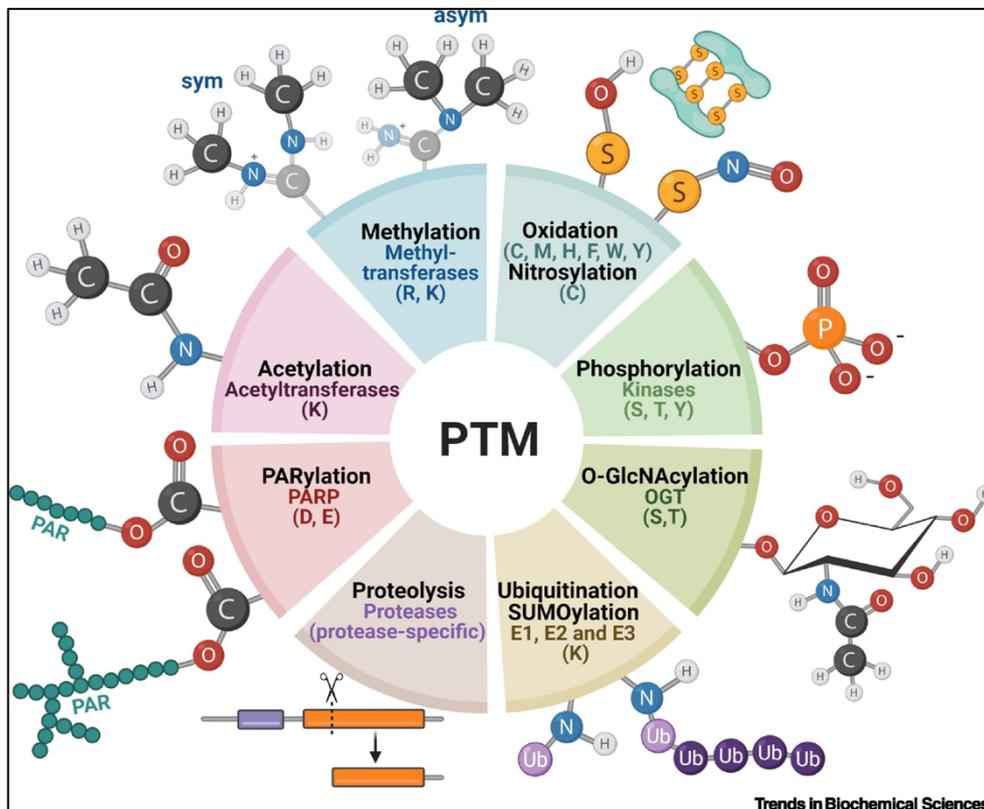


Figure 14- Les différentes modifications post-traductionnelles (MPT) de TDP-43.

TDP-43 est sujette à de nombreuses MPT, on en compte au total 8 : phosphorylation, oxydation, méthylation, acétylation, PARylation, protéolyse, ubiquitination ou encore O-GlcNAc-glycosylation. Pour chacune des MPT, les enzymes ainsi que les acides aminés concernés sont indiqués. Les groupements chimiques ajoutés lors du processus de MPT est également indiqué autour du cercle. **D'après:** Sternburg, Erin L et al. "Post-translational modifications on RNA-binding proteins: accelerators, brakes, or passengers in neurodegeneration?" *Trends in biochemical sciences* vol. 47,1 (2022): 6-22. doi:10.1016/j.tibs.2021.07.004.

Nous verrons dans le **chapitre IV**, le rôle précis de la phosphorylation de TDP-43 dans la pathologie. L'ubiquitination est une autre MPT importante de TDP-43 dans la SLA, et qui consiste à ajouter une petite protéine appelée ubiquitine à la protéine cible, ce qui peut réguler la dégradation de la protéine ou son interaction avec d'autres protéines (Burrati, 2018). Des études ont montré que TDP-43 est ubiquitinylée de manière anormale dans les neurones de patients SLA, ce qui peut conduire à sa dégradation ou à son agrégation dans le cytoplasme. Plusieurs enzymes ubiquitine-ligases, notamment l'UCLH1 et l'ITCH, ont été impliquées dans l'ubiquitination de TDP-43 dans la SLA (Sato et al., 2018). Des fragments C-terminaux de TDP-43 (CTF) ont

également été retrouvés dans les agrégats pathologiques observés dans les neurones de patients atteints de SLA et dans d'autres maladies neurodégénératives (Arseni et al., 2022). Le clivage protéolytique de TDP-43 forme généralement des CTF de 25 kDa et 35 kDa, qui sont d'ailleurs les espèces les plus couramment retrouvées dans les inclusions insolubles (Igaz et al., 2008). En plus de subir une protéolyse, les CTF agrégés sont hyperphosphorylés et ubiquitinylés avec une forte propension à l'agrégation dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Igaz et al., 2008 ; Chou et al., 2018 ; Riemenschneider et al., 2021). Une étude a montré que les CTF de TDP-43 sont cytotoxiques pour les neurones (Nonaka et al., 2013). Une autre étude récente a démontré que les CTF de TDP-43 induisent l'apoptose par l'intermédiaire de l'activation de la caspase 3, une enzyme impliquée dans le processus de mort cellulaire programmée (Wang et al., 2021). En dehors de ces principales MPT observées dans les maladies neurodégénératives telles que la SLA, il existe des études qui montrent que d'autres MPT sont impliquées dans la maladie. Par exemple, l'acétylation de TDP-43 qui consiste en l'ajout d'un groupement acétyle sur un résidu lysine de la protéine, a été identifiée dans les tissus de patients SLA (Cohen et al., 2015 ; Wang et al., 2017). Une étude a également montré que l'acétylation des lysines dans les domaines RRM de TDP-43 (K136, K145 et K192) réduit sa capacité à se lier à l'ARN ce qui perturbe l'épissage alternatif de ses ARN cibles et entraîne une augmentation de l'agrégation par séparation de phase (Cohen et al., 2015 ; Wang et al., 2017 ; Morato et al., 2022). L'étude récente de Morato et ses collègues (2022) révèle également que l'acétylation de la lysine K84 située dans la séquence NLS de TDP-43 perturbe l'import nucléaire ce qui conduit à la mauvaise localisation de la protéine. En outre, l'oxydation des cystéines de TDP-43 peut représenter une voie pathologique cruciale dans la SLA. Par des études *in cellulo* et *in vitro*, Cohen et ses collègues (2012) ont rapporté que le stress oxydatif favorise la réticulation de TDP-43 via l'oxydation de la cystéine et la formation de ponts disulfures. Une étude récente menée par Han et ses collègues (2021) a révélé que l'oxydation de la cystéine 173 de TDP-43 conduit à l'agrégation de TDP-43. De plus, une autre étude montre que l'oxydation des cystéines des domaines RRM de TDP-43 entraîne une perte de liaison de TDP-43 à l'ARN et une

diminution dans la fonction d'épissage des ARN cibles. Cette même étude a révélé que la surexpression d'une forme mutante de TDP-43 avec des cystéines oxydées augmente la toxicité cellulaire (Jia et al., 2021). De plus, il a été récemment montré que la protéine TDP-43, est une cible de la SUMOylation, une MPT qui crée une liaison covalente entre une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) sur une lysine de la protéine cible (Maurel et al., 2019). Les auteurs de cette étude ont démontré que l'inhibition de la SUMOylation par l'acide anacardique, réduit significativement la présence d'agrégats cytoplasmiques de TDP-43 et améliore la neuritogénèse et la viabilité cellulaire *in vitro* (Maurel et al., 2019). De surcroît, la PARylation de TDP-43 est une MPT récemment identifiée dans la SLA, elle consiste en l'ajout d'un groupe d'ADP-ribose à une protéine par des enzymes poly(ADP-ribose) polymérases (PARP). Une étude a constaté que la liaison de TDP-43 à PAR, favoriserait la séparation de phase de TDP-43 *in vitro*, et son accumulation dans les granules de stress des cellules de mammifères et des neurones (Mcgurk et al., 2018). Néanmoins, les mécanismes exacts de la PARylation de TDP-43 dans la SLA restent flous. Enfin, des MPT moins connues comme la O-GlcNAcylation et la méthylation sont encore peu étudiées et leur rôle dans la SLA n'est pas encore établi.

En résumé, il existe un large panel de mécanismes physiopathologiques responsables du développement de la SLA. Néanmoins, il reste encore à déterminer si la maladie est principalement due à une perte de fonction ou à un gain de fonction de TDP-43. Dans la section suivante, nous chercherons à répondre à cette question.

1.1.7.4 Mécanismes de perte ou de gain de fonction

Dans la SLA, la protéine TDP-43 présente une altération de sa fonction normale dans le noyau des cellules. Cette perte de fonction nucléaire se traduit par des dysfonctionnements au niveau du métabolisme de l'ARN et de l'épissage des gènes. Parallèlement, on observe un gain de fonction toxique de TDP-43 dans le cytoplasme des cellules, où la protéine s'accumule et forme des agrégats (Hergersheimer et al., 2019). Ces agrégats cytoplasmiques de TDP-43 sont caractéristiques des tissus *post-mortem*

des patients atteints de SLA. (Ling et al., 2013). Une question très débattue concerne la dégénérescence causée par les agrégats pathologiques de TDP-43, et il n'est pas encore clairement établi s'il s'agit d'une perte ou d'un gain de fonction toxique de TDP-43 (**Figure 15**).

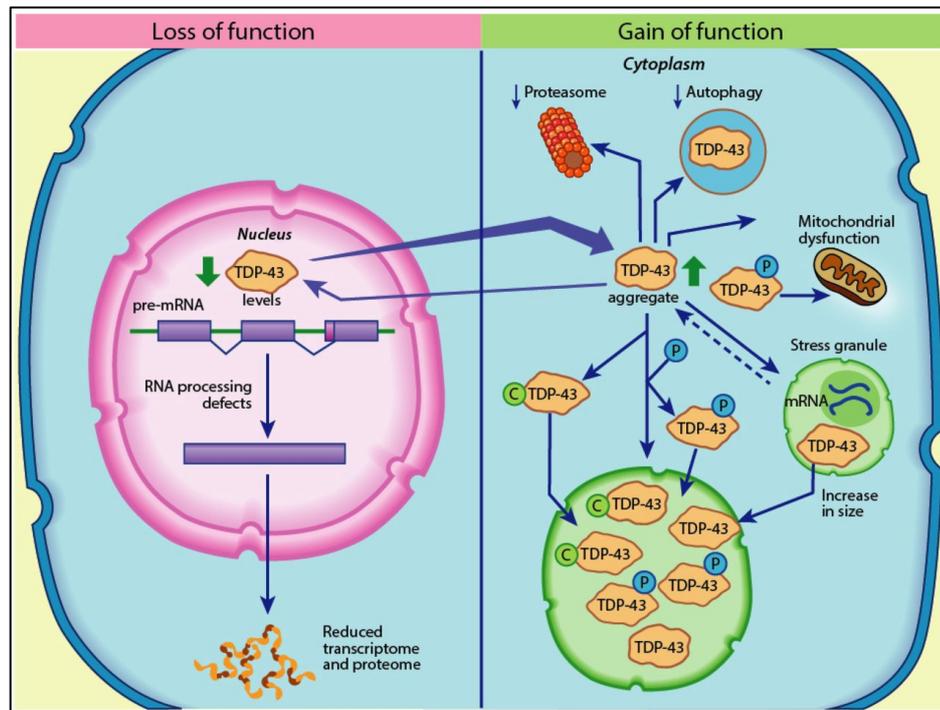


Figure 15- Mécanismes de perte et de gain de fonction (LOF/GOF) de la protéine TDP-43 dans les protéinopathies associées à TDP-43.

A gauche, la déplétion nucléaire de TDP-43 (LOF pour « Loss of Function ») entraîne une perturbation du métabolisme des ARN conduisant à la réduction de la production des protéines. A droite, l'accumulation et la formation d'agrégats cytoplasmiques hyper-phosphorylés de la protéine TDP-43 (GOF pour « Gain of Function »), entraînent des dysfonctionnements biologiques : formation anormale des granules de stress, dysfonctionnement mitochondrial, réduction de l'autophagie et du protéasome. **D'après: Boer EMJ et al., 2020. TDP-43 proteinopathies: a new wave of neurodegenerative diseases. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2020 Nov 11;92(1):86–95. doi: 10.1136/jnnp-2020-322983.**

La recherche en cours vise à mieux comprendre la relation entre la localisation de TDP-43 et les altérations fonctionnelles associées à la SLA, afin d'apporter plus de clarté à ce mécanisme. L'hypothèse d'un gain de fonction toxique de la protéine TDP-43 suggère que les agrégats cytoplasmiques de TDP-43 ou la présence de mutations pourraient être toxiques (Zhang et al., 2009 ; Johnson et al., 2009). Les effets de gain de fonction pourraient également provenir de la séquestration anormale d'ARNm ou de

protéines généralement partenaires de TDP-43, ce qui affecterait leurs fonctions. C'est notamment le cas pour les RBPs telles que RBM14 (*RNA binding motif protein 14*) ou NonO (*Non-POU domain-containing octamer-binding protein*), qui jouent un rôle dans l'épissage des ARN pré-messagers ainsi que la répression transcriptionnelle et qui sont retrouvées enrichies dans la fraction insoluble de TDP-43 sur-exprimée (Dammer et al., 2012).

En lien avec cette hypothèse, il a également été montré une mauvaise localisation d'un facteur de transport nucléaire THOC2 (*THO Complex Subunit 2*) dans le cytoplasme des cellules HEK-293T transfectées avec une forme C-terminale tronquée de TDP-43 (CTF) (Woerner et al., 2016). L'agrégation cytoplasmique de TDP-43 hyper-phosphorylée est une caractéristique des protéinopathies TDP-43 et peut entraîner un stress cellulaire, une formation anormale de granules de stress, un dysfonctionnement mitochondrial, une réduction de l'autophagie et un dysfonctionnement des processus protéosomiaux. En outre, l'inhibition de l'endocytose et l'expression réduite des protéines de choc thermique ont également été signalées, ainsi qu'un comportement de type prion (propagation d'une cellule à l'autre) (**Figure 15**). Une étude a également démontré que l'agrégation cytosolique de TDP-43 séquestre sa propre contrepartie nucléaire (Casella et al., 2016). Cette déplétion nucléaire empêcherait alors TDP-43 de remplir ses fonctions dans le noyau, provoquant ainsi une perte de fonction simultanée. La deuxième hypothèse de perte de fonction de TDP-43 suggère une déplétion nucléaire de la protéine, suite à son agrégation irréversible dans le cytoplasme, ce qui altère le métabolisme de l'ARN (épissage des ARNm, transcription, transport des ARNm) médié par TDP-43 et se traduit par une production réduite de protéines. Dans ce cas, les agrégats retiennent TDP-43 dans le cytoplasme et provoquent une perte de fonction (Winton et al., 2008 ; Nishimoto et al., 2010 ; Budini et al., 2012). Certaines études montrent que la déplétion nucléaire de TDP-43 précéderait la formation des corps d'inclusions (Lee et al., 2011 ; Xu, 2012). A l'heure actuelle, il semblerait que ce soit une combinaison des deux mécanismes (Sun et Chakrabarty, 2017), ils ne s'excluent pas mais

peuvent s'additionner et ainsi fonctionner ensemble pour affecter la viabilité des motoneurones.

Nous venons de voir dans le chapitre II, la structure en multi-domaine de TDP-43 qui lui permet de réguler de nombreux processus cellulaires, qui peuvent être à leur tour dérégulés et provoquer la maladie. En plus de réguler principalement le métabolisme des ARN, TDP-43 a la capacité de subir un mécanisme d'auto-association réversible, appelé séparation de phase liquide-liquide (LLPS), un processus biophysique qui a récemment suscité un intérêt considérable dans la recherche sur les maladies neurodégénératives. Nous allons maintenant décrire les caractéristiques générales des LLPS, puis nous étudierons les condensats spécifiques de TDP-43, leurs fonctions biologiques ainsi que leurs régulateurs dans le chapitre suivant.

Chapitre III- Auto-association de TDP-43 et le processus de séparation de phase liquide-liquide (LLPS)

1.1.8 Découverte des LLPS

Le mécanisme de séparation de phase liquide-liquide (LLPS) a été introduit dès le début du 20^{ème} siècle lorsque Edmund Beecher Wilsonin a proposé le concept du « cytoplasme à émulsion liquide ». Le cytoplasme des cellules eucaryotes se comporterait comme un mélange de différentes gouttes chimiquement en suspension (Wilson et al., 1899). Néanmoins, ce n'est qu'en 2009, lorsque Tony Hyman et Cliff Brangwynne ont découvert que les granules P sont des structures qui ont des comportements classiques de type liquide et que leur localisation est entraînée par une dissolution ou une condensation rapide, que les biologistes ont commencé à réaliser que les LLPS pouvaient être à l'origine de la formation des différents organites sans membrane dans les cellules (Brangwynne et al., 2009). Deux ans plus tard, il a été montré que le nucléole, autre organite sans membrane, contenant du matériel génétique et des protéines, présente aussi des propriétés de type liquide qui semblent dépendre de l'activité ATPase (Brangwynne et al., 2011). En 2012, il a été démontré que lorsque des protéines multivalentes interagissent, elles subissent une transition de phase rapide (Li et al., 2012). Brièvement, les protéines passent de petits complexes à de grands assemblages polymériques concomitant avec une augmentation de la concentration des protéines et la formation de LLPS macroscopiques. La même année, une étude a montré que les LLPS déterminaient l'architecture des granules d'ARN dans une réaction *in vitro* (Kato et al., 2012). Ces deux études majeures ont permis de montrer la facilité avec laquelle les LLPS peuvent être reproduites en utilisant seulement des tubes à essais ce qui a conduit à l'émergence d'un nouveau domaine scientifique LLPS. Le processus LLPS est un mécanisme de formation de compartiments intracellulaires qui est maintenant reconnu comme un processus fondamental dans la régulation de nombreux processus cellulaires, tels que la régulation de la transcription (Sabari et al., 2018), la régulation de la signalisation immunitaire (Su et al., 2016) et la formation de ribonucléoprotéines (RNP) (Molliex et al., 2015). Cependant, des preuves récentes ont suggéré que la LLPS peut

également être associée à la formation d'agrégats de protéines dans les maladies neurodégénératives (Babinchak et al., 2020).

Nous avons examiné précédemment la présence d'organites non membranaires ou de condensats au sein des cellules eucaryotes, qui se forment par un processus connu sous le nom de séparation de phase liquide-liquide (LLPS). Ces structures présentent des propriétés liquides, que nous allons maintenant examiner en détail.

1.1.9 Caractéristiques générales des LLPS

1.1.9.1 Diagramme de phase

Nous venons de voir que la séparation de phase liquide-liquide (LLPS) est le principe biophysique qui régit la formation de condensats sans membrane. Par comparaison avec les organites comme le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, les condensats sans membrane formés par le processus LLPS possèdent des propriétés liquides. Ils peuvent assembler des protéines et/ou des acides nucléiques afin de déclencher des réactions biochimiques ou séquestrer des biomolécules par le biais de l'augmentation de la concentration en protéine ou en ARN (Woodruff et al., 2017). A l'intérieur de ces condensats, les différents composants peuvent facilement se mélanger et rapidement échanger des composants avec l'environnement. En biologie, les réactions chimiques ont tendance à se produire dans les liquides d'où l'importance des condensats dans le fonctionnement normal de la cellule (Hyman et al., 2014). Ces liquides sont plus communément appelés des granules ribonucléoprotéiques (RNP) car ils sont principalement enrichis en protéines et en ARN à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules (Tauber et al., 2020). La transition de phase liquide suit un diagramme de phase (**Figure 16A**) conduisant à la démixtion des biomolécules dans des gouttelettes liquides très concentrées, un peu comme une séparation de phase de l'huile dans l'eau (démixtion), avec des caractéristiques de liquide (Portz et al., 2021). On peut retrouver des solutions composées d'une seule protéine auto-interagissant avec elle-

même (interaction homotypique) et dans ce cas un seuil de concentration est nécessaire pour que la séparation de phase se produise (**Figure 16A**).

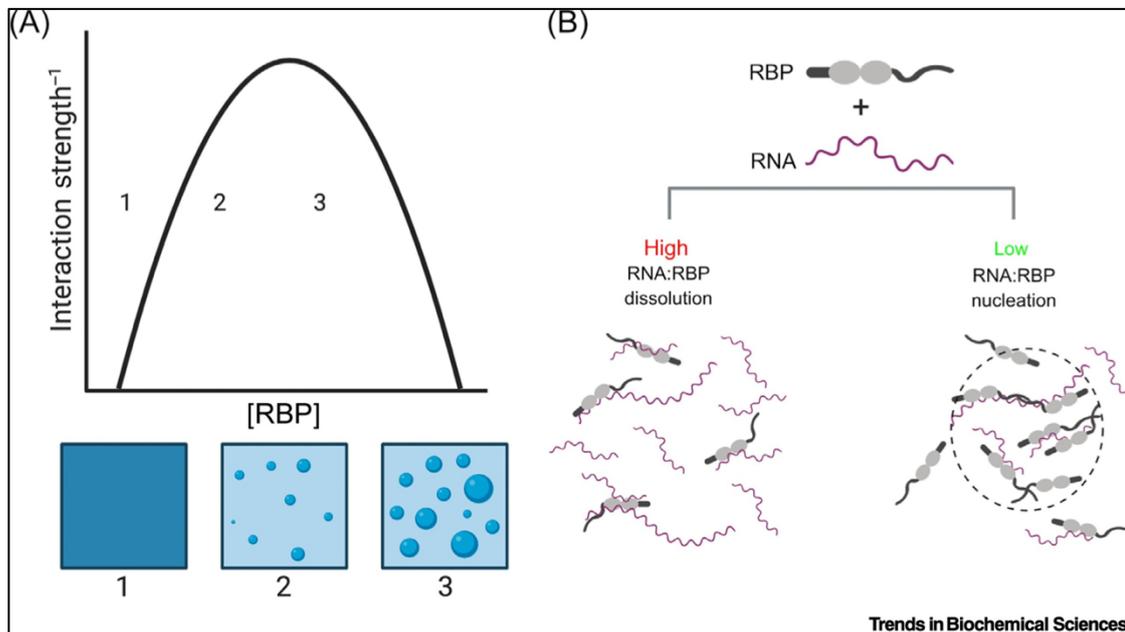


Figure 16- Les conditions favorisant les transitions de phases liquides (LLPS).

Les condensats formés par les LLPS suivent un diagramme de phase (A). Lors d'une séparation homotypique (interaction d'une protéine avec d'autres copies d'elle-même), une concentration critique des biomolécules provoque la transition d'une phase homogène [1] à une phase dense biphasique [2] qui ressemble à des gouttelettes de liquide. Cette phase dense coexiste avec une phase diluée. Plus la concentration des biomolécules à l'intérieur de ces condensats augmente plus la taille des gouttelettes augmente [3]. Souvent, les condensats produits par LLPS dans les cellules sont issus d'interactions hétérotypiques (une protéine interagissant avec d'autres partenaires protéiques ou avec de l'ARN) (B). Ainsi, la transition de phase peut être régulée par les concentrations locales d'ARN. Un ratio faible ARN:protéine permet la formation d'assemblages très denses favorisant les interactions protéine-protéine autour de l'ARN formant ainsi des complexes sans membrane tandis qu'un ratio élevé ARN:protéine dissout les condensats. **D'après :** Portz B, Lee BL, Shorter J. *FUS and TDP-43 Phases in Health and Disease. Trends Biochem Sci. 2021 Jul;46(7):550-563. doi: 10.1016/j.tibs.2020.12.005.*

Plus complexe pour les solutions hétérogènes composées de différentes protéines et/ou d'acides nucléiques (interaction hétérotypique), la séparation en phase liquide ne dépendra plus d'une concentration seuil mais de plusieurs stimuli tels que les conditions environnementales (concentration en sel, co-solutés, pH) et surtout du type de composant et de la quantité d'ARN. L'ARN est un régulateur des phases, à faible ratio d'ARN, la nucléation des complexes sous formes d'organelles sans membrane est possible tandis qu'un ratio d'ARN élevé les dissout (**Figure 16B**) (Franzmann et Alberti, 2018 ; Portz et al., 2021). Il a également été démontré que l'ARN agit comme un élément

structurant en se liant aux protéines et en facilitant la formation de liaisons entre les protéines (GJ Navarro et al., 2019). Cela conduit à la formation de condensats plus étendus et plus cohésifs. Il est intéressant de noter que ces résultats révèlent que la composition des condensats dépend également de l'ARN présent. Différents types d'ARN peuvent recruter des protéines spécifiques, ce qui entraîne une ségrégation des protéines spécifiques et une organisation spécifique au sein du condensat.

Pour approfondir notre compréhension des propriétés et des mécanismes des séparations de phase liquide-liquide (LLPS), il est crucial d'examiner leur diagramme de phase, qui décrit les conditions dans lesquelles ce processus se produit. De plus, des méthodes d'observation et d'étude spécifiques ont été développées pour obtenir une vision plus concrète de ces structures.

1.1.9.2 Méthodes d'observation et d'étude des LLPS

Plusieurs méthodes sont disponibles pour observer et étudier l'auto-association réversible des RBPs dans les condensats liquides (LLPS). Parmi celles-ci, on retrouve des tests classiques *in vitro* réalisés dans des tubes à essais à l'aide de protéines purifiées, l'utilisation d'outils bio-informatiques ou de bases de données, des techniques de microscopie à haute résolution telles que la microscopie confocale ou électronique, ainsi que la méthode FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Chu et al., 2022). En particulier, la méthode FRET utilise le transfert d'énergie à courte distance pour détecter les interactions entre deux fluorophores (un donneur et un accepteur). Lorsque les deux protéines sont très proches (distance inférieure à 10 nm), l'énergie absorbée lors de l'excitation du fluorophore porté une protéine (donneuse) est en partie transmise à l'autre protéine (accepteur), ce qui induit une émission lumineuse à une longueur d'onde plus élevée qui peut être détectée au microscope de fluorescence (Wan et al., 2022). Cependant, cette technique comporte des limites, notamment l'équipement spécifique pour analyser le signal FRET, la distance ou l'orientation du donneur et de l'accepteur peuvent influencer le résultat, ainsi que le ratio signal sur bruit faible. Une autre technique appelée le Microtubule Bench (MT bench), développée dans le laboratoire

SABNP, permet de reconstituer artificiellement les LLPS *in cellulo* à l'aide des microtubules comme nanoplatforme, dans les cellules HeLa (Maucuer et al., 2018). Le but étant d'étudier les autoassemblages réversibles d'ordre supérieur de TDP-43 ou d'autres RBPs dans des conditions physiologiques ou pathologiques (en présence de mutations dans les protéines étudiées). Cette méthode présente de nombreux avantages qui sont expliqués dans le chapitre Matériels et Méthodes du présent manuscrit. Pour nos études, nous avons combiné la méthode du MT bench à celle de la microscopie à haut contenu (HCS, « *High-content screening* »).

1.1.9.3 Diversité des condensats

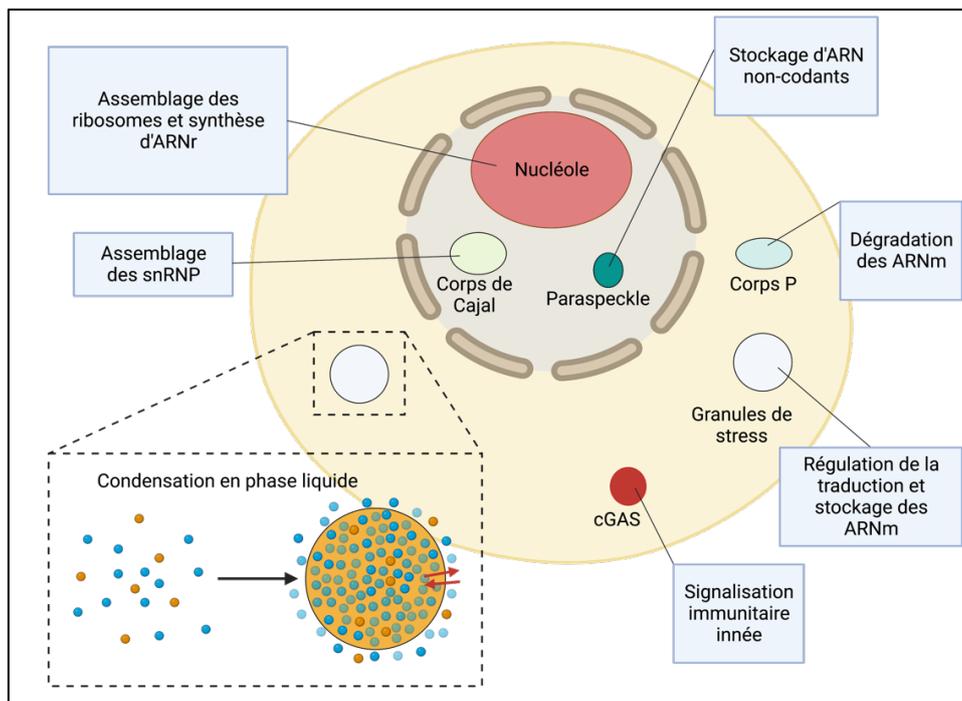


Figure 17- La diversité des condensats biomoléculaires et leurs principales fonctions.

Une liste non-exhaustive d'organites sans membrane est représentée sur la figure. Dans le noyau, on retrouve le nucléole (rouge), les corps de Cajal (jaune) ou encore le paraspeckle (vert). Dans le cytoplasme, on peut apercevoir des corps P (bleu), des granules de stress (gris) et des granules cGAS (rouge). Leurs principales fonctions sont indiquées dans un encadré en gris. Dans l'encadré en pointillé, chaque condensat est enrichi en biomolécules spécifiques qui s'assemblent par le processus LLPS en une phase dense (orange) hyper concentrée tout en excluant d'autres molécules de la phase. **Adapté de:** *Gomes, Edward, and James Shorter. "The molecular language of membraneless organelles." The Journal of biological chemistry vol. 294,18 (2019): 7115-7127. doi:10.1074/jbc.TM118.001192. Créé avec BioRender.com.*

Les méthodes et outils, décrites précédemment (cf. 1.1.9.2), ont permis de caractériser ces structures. En effet, les LLPS génèrent des condensats cellulaires et des organites sans membrane (MLO) dotés de fonctions biologiques (**Figure 17**). Les MLO sont composés de macromolécules, telles que des protéines et des acides nucléiques et sont localisés dans le cytoplasme et le noyau (Wang et al., 2021). Par exemple, ils comprennent le nucléole, les paraspeckles, les corps de Cajal, les corps P, les speckles nucléaires et les corps de la leucémie promyélocytaire dans le noyau, les granules de stress ou encore les granules cGAS dans le cytoplasme (Choi et al., 2023). Nous venons de voir que les propriétés physicochimiques des LLPS permettent aux MLO de présenter des propriétés de type liquide, telles que la fluidité, la dynamique de formation ou bien la dissolution. Ces différentes propriétés soutiennent les différentes fonctions cellulaires des MLO, notamment le métabolisme de l'ARN, la régulation de l'expression des gènes, la stabilité cellulaire ou encore la signalisation immunitaire (Wang et al., 2021).

1.1.9.4 Fonctions physiologiques des LLPS

Les fonctions physiologiques des LLPS sont vastes et comprennent entre autres la régulation de la transcription, l'organisation du génome, les réponses immunitaires et la signalisation neuronale synaptique. En effet, une étude montre que la transcription, étape essentielle de l'expression des gènes médiée par l'ARN Pol II, a lieu dans des condensats nucléaires ayant des propriétés liquides. Ces structures sont formées par la LLPS de Pol II et de divers facteurs hébergeant des IDR (régions intrinsèquement désordonnées), tels que des facteurs de transcription et des coactivateurs (Chong et al., 2018). Aujourd'hui, de plus en plus d'études montrent qu'il existe un nombre croissant de facteurs de transcription notamment OCT4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) et GCN4 (*Activating transcription factor-4*), qui peuvent se séparer en phase et former des condensats liquides avec leurs partenaires protéiques (Boija et al., 2018). Outre les facteurs de transcription, l'ARN peut également réguler la formation des condensats de transcription (Henninger et al., 2021). Les structures LLPS interviennent aussi dans la régulation du génome. L'ADN génomique des eucaryotes existe sous forme de

chromatine dans le noyau, et est composé de protéines appelées les histones. Il a récemment été démontré que la chromatine subit le processus LLPS, piloté par les queues d'histones chargées positivement (Gibson et al., 2019). Plusieurs facteurs peuvent réguler la formation des condensats de la chromatine. Par exemple, il a été constaté que la protéine 1 de l'hétérochromatine (HP1) favorise le processus LLPS de la chromatine et réduit la dynamique des condensats, en accord avec son rôle de facteur architectural répressif de la chromatine dans les cellules (Gibson et al., 2019). Les LLPS peuvent également être un médiateur de la transduction du signal des réponses immunitaires innées. Par exemple, des condensats de cGAS-ADN sont formés via LLPS afin de produire efficacement un messager, le cGAMP, qui active à son tour la réponse immunitaire antivirale. G3BP1 (*Ras GTPase-activating protein-binding protein 1*), outre sa fonction de marqueur dans les GS, est aussi un régulateur positif de la réponse immunitaire innée, et la protéine N du virus SARS-CoV-2 peut supprimer la réponse immunitaire en formant des condensats avec l'ARN et G3BP1 (Lu et al., 2021). De même, le processus LLPS joue également un rôle important dans la transduction du signal des réponses immunitaires adaptatives. En particulier le récepteur des cellules T (TCR) peut se séparer en phase dans un condensat, tout en excluant l'inhibiteur de la transduction du signal, CD45, afin de garantir l'activation des cellules T (Courtney et al., 2018). Enfin, le processus LLPS joue un rôle crucial dans les assemblages de signalisation de densité présynaptique, où il peut contribuer à la formation de condensats constitués de protéines d'échafaudages RIM/RIM-BPs (Rab-interacting molecule (RIM)-binding proteins (RIM-BPs), entraînant une forte concentration de canaux calciques à voltage dépendant (Wu et al., 2019). Les protéines associées aux vésicules synaptiques comme la synapsine peuvent également organiser la formation de groupes de vésicules par LLPS, ce qui est important pour le maintien de la stabilité de la réserve de vésicules synaptiques (Milovanovic et al., 2018).

Nous venons de voir que les condensats formés par LLPS sont nombreux et ont des fonctions essentielles dans l'expression des gènes, le métabolisme de l'ARN, les réponses immunitaires et la signalisation neuronale. Nous allons maintenant voir quels sont les condensats spécifiques à TDP-43 et leurs fonctions biologiques.

1.1.9.5 Les interactions multivalentes

Lorsque des protéines et/ou des acides nucléiques subissent le processus LLPS, elles se condensent en une phase dense. Le maintien de cette phase va être régulé par des interactions multivalentes entre les protéines et les ARN qui permettent la formation de réseaux tridimensionnels de molécules qui s'étendent sur le volume des gouttelettes liquides (Li et al., 2012). La multivalence qui est un paramètre clé dans les LLPS fait référence au nombre de domaines ou motifs avec lesquels une seule espèce de biomolécule peut interagir simultanément (Alberti et al, 2019 ; Martin et Holehouse, 2020). Les forces qui animent les LLPS peuvent être distinguées en deux types d'interactions multivalentes : les interactions classiques comprenant les interactions protéine-protéine, protéine-ARN et ARN-ARN et puis les interactions faibles entre les IDR (régions intrinsèquement désordonnées) dont les interactions π - π , cation-anion, dipôle-dipôle et les interactions π -cation (**Figure 18**) (Wang et al., 2021). Chacune de ces forces est soumise à une régulation d'ordre supérieur, par exemple par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation.

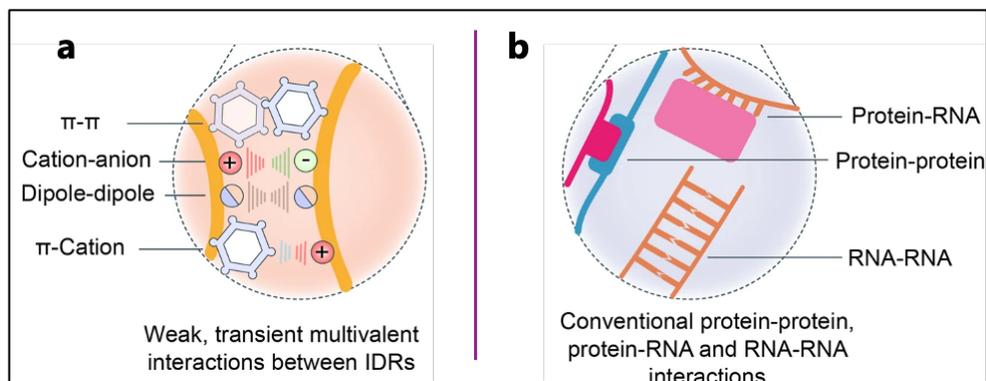


Figure 18- Les interactions multivalentes pilotent la séparation de phase.

Les condensats séquestrent des protéines et acides nucléiques spécifiques pour inhiber ou favoriser une réaction. Ce sont majoritairement des interactions multivalentes qui contribuent aux structures LLPS et elles sont de deux types : la première plus classique est composée d'interactions multivalentes de type protéine-protéine, protéine-ARN et ARN-ARN (**a**), la deuxième étant plutôt des interactions multivalentes faibles et transitoires entre les régions intrinsèquement désordonnées (IDR) dont les interactions π - π , cation-anion, dipôle-dipôle et les interactions π -cation (**b**). **Adapté de:** Wang, Bin et al. "Liquid-liquid phase separation in human health and diseases." *Signal transduction and targeted therapy* vol. 6,1 290. 2 Aug. 2021, doi:10.1038/s41392-021-00678-1.

1.1.9.6 Les régions IDR sont suffisantes pour l'organisation des structures LLPS

Les condensats sont fortement enrichis en protéines possédant des domaines intrinsèquement désordonnés (IDR) comme les RBPs ce qui suggère un rôle important des IDR dans le recrutement des protéines et potentiellement dans les propriétés du condensat (Shin et Brangwynne, 2017). Le terme « IDR » est un terme général qui désigne un ensemble d'acides aminés dont la séquence est peu complexe, qui contient peu d'acides aminés hydrophobes et qui n'a pas de structure tridimensionnelle bien définie (Tompa et al., 2009). Les IDR et les domaines de faibles complexités (LCD) sont deux types de structures protéiques qui partagent plusieurs caractéristiques communes. Tout d'abord, ils sont tous deux dépourvus d'une structure tertiaire bien définie et présentent une grande flexibilité conformationnelle (Van der Lee et al., 2014 ; Nedelsky et Taylor, 2019). De plus, ils sont souvent impliqués dans des interactions avec d'autres molécules, tels que les acides nucléiques ou les protéines, et sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires.

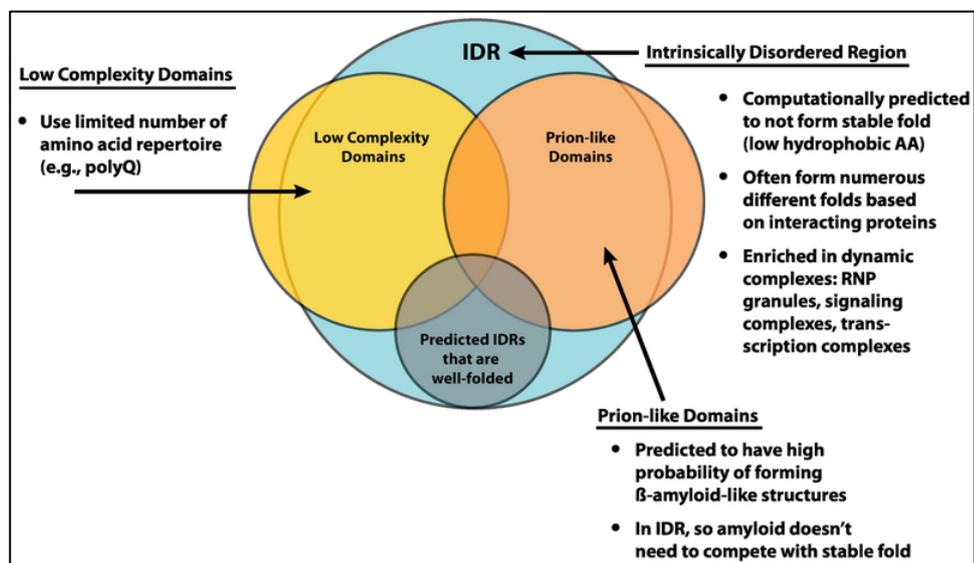


Figure 19- Les régions intrinsèquement désordonnées et les domaines de faible complexité se chevauchent.

Les IDR (bleu) et les LCD (jaune) sont deux régions qui se chevauchent. Ils se chevauchent aussi avec les domaines de type prion qui sont un sous-groupe des IDR. Les LCD sont définis en fonction de leur composition en acides aminés. Les domaines de type prion sont caractérisés par leur plus grande tendance à former des structures en feuillet- β similaires aux domaines prion de la levure. A noter que les dimensions des cercles et les régions ne sont pas réelles. **D'après :** Mittag, Tanja, and Roy Parker. "Multiple Modes of Protein-Protein Interactions Promote RNP Granule Assembly." *Journal of molecular biology* vol. 430,23 (2018): 4636-4649. doi:10.1016/j.jmb.2018.08.005.

Les régions IDR des RBPs peuvent contenir des LCD, qui sont de courtes séquences riches en acides aminés tels que la sérine, la glycine et la proline (Mittag et al., 2018). Cependant, il est important de noter que tous les LCD ne sont pas nécessairement intrinsèquement désordonnés et que toutes les IDR ne contiennent pas obligatoirement de LCD (**Figure 19**). Il existe un chevauchement entre les IDR et les LCD, et cette superposition peut jouer un rôle essentiel dans les processus LLPS des RBPs. Les IDR peuvent interagir de manière multivalente avec les acides nucléiques, tandis que les LCD peuvent favoriser la formation de groupes de protéines. L'interaction entre ces deux types de régions peut faciliter la formation de condensats liquides, ainsi que de structures solides similaires à des agrégats. Un type particulier d'IDR souvent présent dans les RBPs est le domaine de type prion (PrLD), qui peut adopter des structures en fibrilles amyloïdes similaires aux protéines prion de la levure (**Figure 19**) (Franzmann et al., 2018). Plusieurs études ont démontré que les IDR sont nécessaires et suffisantes pour la séparation de phase des protéines (Lin et al., 2015 ; Molliex et al., 2015).

En plus des IDR et des LCD des RBPs, les modifications post-traductionnelles (MPT) telles que la phosphorylation, peuvent renforcer ou affaiblir ces interactions, influençant ainsi la capacité de la protéine à subir une séparation de phase.

Dans le cas de la protéine TDP-43, il a été constaté que le domaine C-terminal (CTD), qui est de faible complexité (LCD) et intrinsèquement désordonné (IDR) joue un rôle central dans le processus de séparation de phase appelé LLPS (Conicella et al., 2016). En particulier, il a été démontré que la présence d'une structure en hélice- α dans le domaine CTD de TDP-43 (aa 321-340) est essentielle pour la séparation de phase de cette protéine (Conicella et al., 2016,2020). Les interactions intermoléculaires qui se produisent au niveau de cette structure en hélice- α conservée et d'une région adjacente riche en acides aminés aromatiques dans le CTD de TDP-43 sont d'une importance cruciale pour le processus LLPS (**Figure 20**).

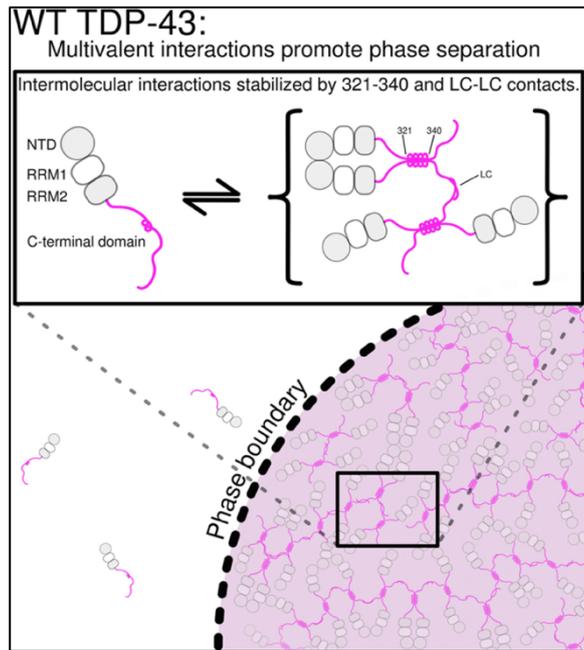


Figure 20- La séparation de phase liquide-liquide (LLPS) de TDP-43 est pilotée par son domaine C-terminal, de faible complexité et intrinsèquement désordonnée.

D'après : Conicella, Alexander E et al. "ALS Mutations Disrupt Phase Separation Mediated by α -Helical Structure in the TDP-43 Low-Complexity C-Terminal Domain." Structure (London, England: 1993) vol. 24,9 (2016): 1537-49. doi:10.1016/j.str.2016.07.007.

De plus, les interactions supplémentaires qui se produisent via le domaine N-terminal (Wang et al., 2013), ainsi que la liaison de cette protéine à l'ARN grâce à ses domaines RRM contribuent à rapprocher les domaines CTD de TDP-43, augmentant ainsi la concentration effective et donc la probabilité des contacts C-terminaux (**Figure 20**). Les mutations associées à la SLA qui surviennent dans cette région spécifique de TDP-43 affectent la structure ou les contacts intermoléculaires, perturbant ainsi les interactions multivalentes et entraînant une diminution du processus LLPS de TDP-43. Ces études suggèrent un mécanisme moléculaire expliquant la perte de fonction observée dans cette pathologie (Arnold et al., 2013) ainsi que l'altération de l'assemblage des granules ribonucléoprotéiques (RNP) (Alami et al., 2014). En somme, les régions IDR et LCD favorisent la formation des structures LLPS des RBPs. Dans le cas de la protéine TDP-43, le domaine CTD qui est à la fois un LCD et une IDR, joue un rôle central dans le processus LLPS. Les mutations associées à la SLA dans ce domaine peuvent perturber les interactions intermoléculaires, entraînant une diminution du processus LLPS et des dysfonctionnements pathologiques.

Je vais maintenant vous présenter les condensats liquides spécifiques à TDP-43, qui sont formés par le processus LLPS.

1.1.10 Condensats spécifiques à TDP-43

Nous avons vu précédemment que les RBP possèdent des domaines de faible complexité qui leur permettent de former des organites sans membrane que l'on trouve dans toutes les cellules eucaryotes, par le processus de séparation de phase liquide-liquide (LLPS). En particulier, la protéine TDP-43 a été identifiée dans de nombreux condensats et la séparation de phase de TDP-43 est importante pour la formation et la fonction de ces condensats (**Figure 21**).

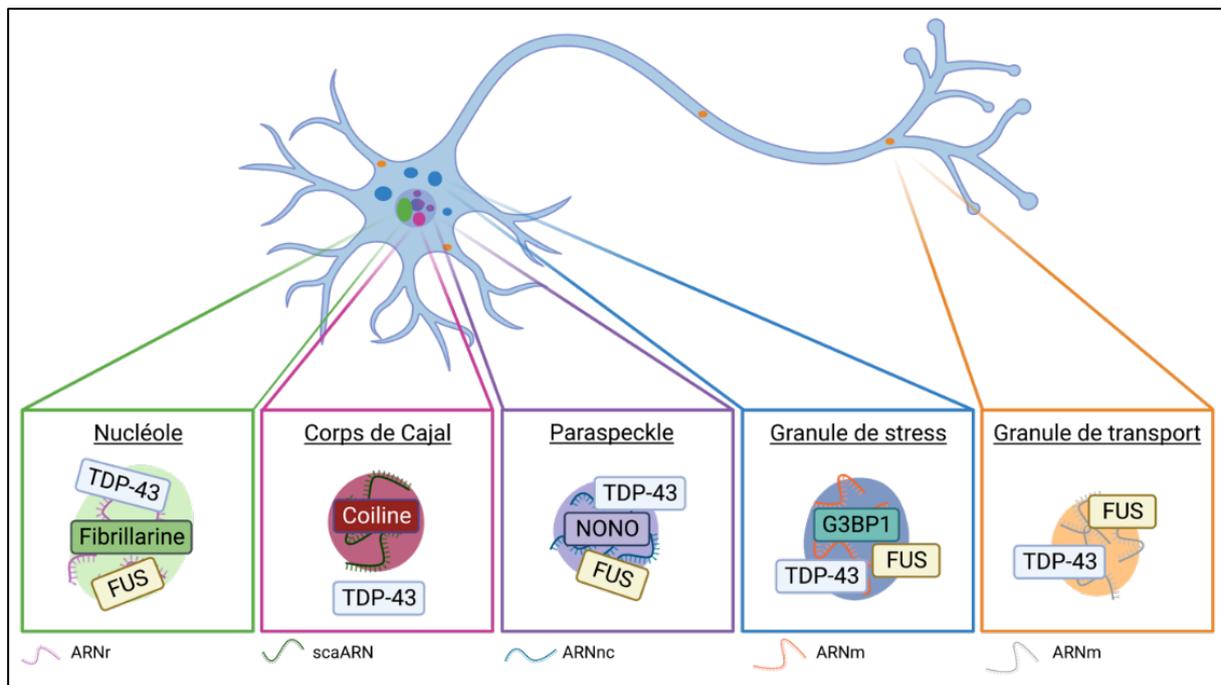


Figure 21- TDP-43 est impliquée dans la formation et la régulation de plusieurs condensats biomoléculaires.

TDP-43, une protéine majoritairement nucléaire, participe à la formation des nucléoles (vert), des corps de Cajal (rose), des paraspeckles (violet). Elle peut aussi être recrutée dans les granules de stress cytoplasmiques (bleu) et transporter les ARNm loin du soma au travers des granules de transport (orange). Les marqueurs de chacun des condensats sont indiqués dans la structure ainsi que le type d'ARN recruté. ARNr (ARN ribosomal), scaARN (petit ARN), ARNnc (ARN non-codant). *Adapté de: Carey, Jenny L, and Lin Guo. "Liquid-Liquid Phase Separation of TDP-43 and FUS in Physiology and Pathology of Neurodegenerative Diseases." Frontiers in molecular biosciences vol. 9 826719. 2 Feb. 2022, doi:10.3389/fmolb.2022.826719. Créé avec BioRender.*

On retrouve notamment TDP-43 dans les nucléoles, les paraspeckles, les granules de stress et les granules de transport. Cependant, TDP-43 est aussi impliquée dans la formation et la régulation des corps de Cajal (CBs) même si la co-localisation de TDP-43 dans ces structures n'a toujours pas été confirmée. Les cellules contiennent dans leur noyau des nucléoles, qui sont des condensats associés à la synthèse de l'ARN ribosomique et à la biogénèse des ribosomes (Lafontaine et al., 2021). Il a été montré dans une étude que TDP-43 se localise dans le nucléole en réponse aux lésions de l'ADN et au stress transcriptionnel (Martinez-Macias et al., 2019). Un autre compartiment nucléaire est le paraspeckle dans lequel TDP-43 interagit directement avec NEAT1 (Nuclear enriched abundant transcript-1), un ARN non codant essentiel dans ces structures (An et al., 2018). Il est démontré que TDP-43 est un important régulateur des paraspeckles et la relation croisée entre NEAT1 et TDP-43 est essentielle dans la promotion des états de pluripotence et de différenciation des cellules souches (Modic et al., 2019). Un autre exemple de condensat nucléaire régulé par TDP-43 est celui des corps de Cajal. L'absence de TDP-43 dans ces structures est l'une de leurs particularités, néanmoins une étude récente suggère que TDP-43 joue un rôle dans leur formation et leur régulation via le transport de petits ARN spécifiques (ARNsca) vers les corps de Cajal (Izumikawa et al., 2019). En outre, TDP-43 est aussi capable de former des condensats cytoplasmiques pour transporter des ARNm cible vers les compartiments neuronaux distaux (Alami et al., 2014). En effet, la traduction localisée de l'ARNm près des synapses neuronales est importante pour le bon fonctionnement des neurones d'où la nécessité de transporter l'ARNm loin du soma. Fait important, la mauvaise localisation de TDP-43 dans la SLA peut affecter la traduction locale dans les axones limitant ainsi la synthèse locale des protéines (Altman et al., 2021). Enfin, TDP-43 se lie aux ARNm naissants pour former des granules ribonucléoprotéiques cytoplasmiques, appelés granules de stress (GS) composés de complexes translationnels réprimés et qui sont générés en cas de stress cellulaire. Ce processus permet de protéger les ARNm, les facteurs de traduction et les RBP du stress et l'un des principaux marqueurs des GS est G3BP1. Ces structures sont intrinsèquement dynamiques et réversibles et se dissolvent à nouveau lorsque le

stress disparaît (Colombrita et al., 2009). Les GS sont devenus les principaux suspects dans la nucléation de l'agrégation de protéines telles que TDP-43 dans la SLA (Patel et al., 2015). Le rôle joué par les GS dans l'agrégation des RBPs telle que TDP-43 sera examiné plus en détails dans la **section 1.1.12**.

De manière intéressante, une récente étude a mis en lumière la structure des états assemblés de TDP-43 au cours du processus LLPS. En utilisant une combinaison de techniques (spectrométrie de masse par mobilité ionique native, ingénierie des protéines et simulations de dynamique moléculaire), ils ont découvert que la protéine TDP-43 s'oligomérisait en dimères et trimères partiellement désordonnés. En revanche, les monomères de FUS, une autre RBP, subissent une transition de la forme dépliée à la forme globulaire. Ces mécanismes d'assemblages divergents suggèrent l'existence de complexes structurellement distincts à l'intérieur des gouttelettes liquides, ce qui pourrait avoir un impact sur le traitement de l'ARN en fonction du contexte biologique (Sahin et al., 2023).

Nous venons de voir que TDP-43 régule un grand nombre de condensats biomoléculaires formés par le processus LLPS, et qui exercent des fonctions essentielles pour le fonctionnement normal de la cellule. Néanmoins, en cas de perturbation, TDP-43 peut être à l'origine de la formation des inclusions cytoplasmiques caractéristiques de la SLA. Ce processus anormal qui est appelé transition de phase liquide à solide sera présenté dans la section suivante.

1.1.11 Le modèle de l'agrégation de TDP-43 : « la transition de phase liquide à solide »

Des preuves croissantes suggèrent que le processus LLPS peut être dérégulé dans les maladies neurodégénératives. Le modèle couramment adopté est celui d'une transition des condensats liquides fonctionnels hautement dynamique vers des assemblages moins dynamiques ou statiques, similaires à un gel, puis une solidification, telle que l'agrégation (Wegmann et al., 2018 ; Boeynaems et al., 2018) (**Figure 22**).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la relation entre les séparations de phase liquide-liquide (LLPS) et l'agrégation des protéines RBPs. On pense tout d'abord que la formation de gouttelettes liquides crée un environnement favorable aux interactions entre les protéines, facilitant ainsi leur regroupement. De plus, la formation de ces gouttelettes peut favoriser l'adoption d'une conformation spécifique des protéines, qui serait propice à la formation d'agrégats solides. En effet, les gouttelettes liquides limitent la mobilité des protéines, favorisant ainsi la stabilité des conformations propices à l'agrégation (Babinchak et al., 2019 ; Pakravan et al., 2021). Enfin, il a été proposé que la formation de gouttelettes liquides peut favoriser la formation de conditions défavorables pour la solubilité des protéines, telles que des conditions ioniques, de pH et de température. Ces conditions peuvent favoriser la formation d'agrégats solides de protéines (Babinchak et Surewicz, 2020).

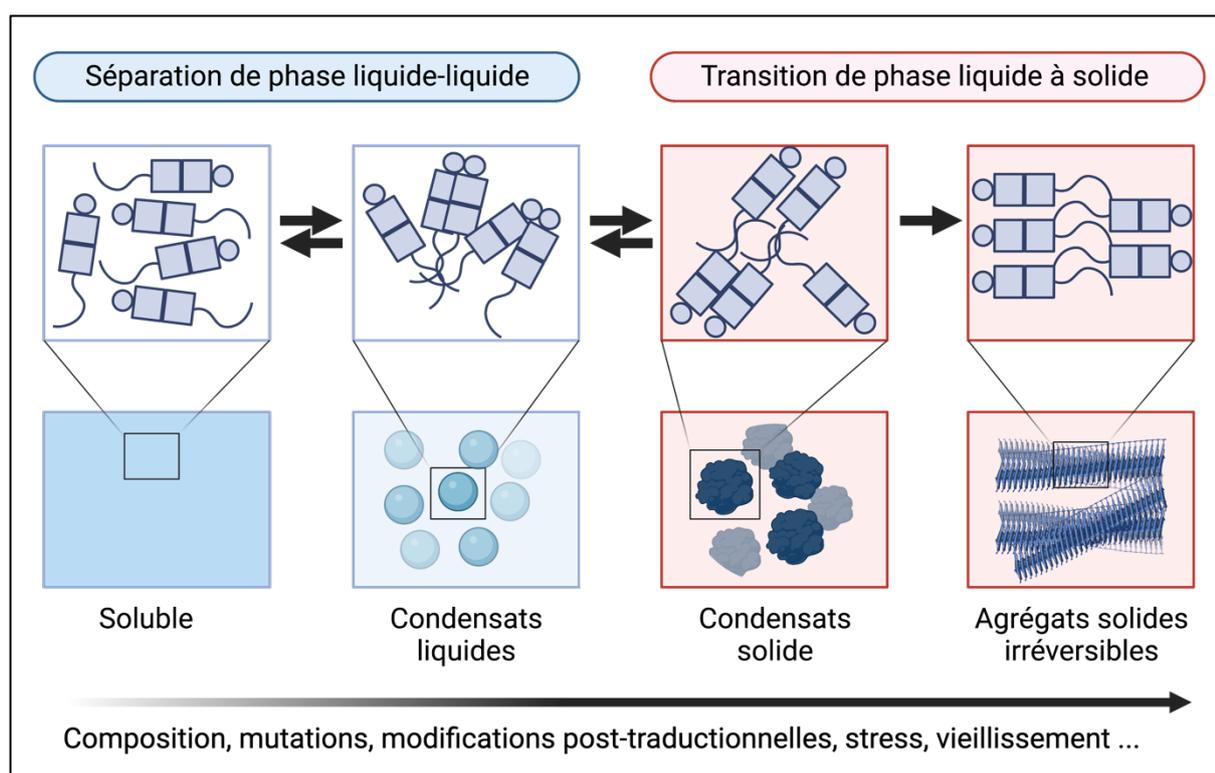


Figure 22- La transition de phase liquide à solide.

Le CTD de TDP-43 contient une structure en hélice- α (aa 321-343) favorisant la dimérisation de TDP-43 et sa séparation en phase dans des gouttelettes liquides. Ensuite, la conversion en fibrilles amyloïdes rigides et irréversibles, organisées en feuillets- β a été suggérée comme étant un mécanisme pathologique dans la SLA. En effet, des mutations de TDP-43, des MPT, le vieillissement cellulaire ou le stress peuvent accélérer ce processus. **Adapté de:** Choi, Hyun-Jun et al. "Glutathionylation on RNA-binding proteins: a regulator of liquid-liquid phase separation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis." *Experimental & molecular medicine* vol. 55,4 (2023): 735-744. doi:10.1038/s12276-023-00978-2. **Créé avec BioRender.**

Plusieurs études ont montré que la formation d'agrégats de TDP-43 est étroitement liée à la perturbation du processus LLPS. Des études récentes montrent que le NTD de TDP-43 est un domaine clé, impliqué dans la régulation du processus LLPS et dans la formation d'agrégats (Conicella et al., 2016 ; Afroz et al., 2017 ; Li et al., 2018 ; Wang et al., 2018 ; Babinchak et al., 2017). Pour rappel, le domaine LCD de TDP-43 est intrinsèquement désordonné et en raison de sa nature multivalente, il contribue à la formation des structures LLPS. Presque toutes les mutations de TDP-43 qui sont associées à la SLA se situent dans sa partie IDR. Ces mutations perturbent le comportement des LLPS et renforcent l'agrégation (Johnson et al., 2009 ; Conicella et al., 2016 ; Schmidt et Rohatgi, 2016). Le même constat a été rapporté pour d'autres RBPs impliquées dans la neurodégénérescence, où des mutations dans le domaine LCD associées à des maladies ou le vieillissement des condensats favorisent la maturation et la fibrillation d'assemblages de protéines initialement réversibles (Harrison et Shorter, 2017). D'autres études ont montré que des modifications post-traductionnelles de la protéine telles que la phosphorylation et l'acétylation peuvent affecter les propriétés physiques de TDP-43 et favoriser son agrégation (Li et al., 2022) (**Figure 22**).

1.1.12 Les granules de stress comme interface à l'agrégation des protéines

Plusieurs études ont montré que des RBPs telles que TDP-43 et FUS associées à des maladies sont recrutées au sein des granules ribonucléoprotéiques (RNP), ou granules de stress (GS) lorsqu'une cellule est soumise à un stress (Dormann et al., 2010 ; Bentmann et al., 2012). De plus, il a été observé une co-localisation de TDP-43 et FUS avec des marqueurs des GS, notamment G3BP1 et TIA-1 dans les tissus cérébraux des patients atteints de SLA (Bentmann et al., 2012). Des mutations dans les RBP associées à la SLA ou l'échec de l'élimination des granules de stress ont été proposés comme étant un point de départ à la transition de phase anormale des granules de stress qui conduit à l'agrégation de ces RBP (Patel et al., 2015 ; Elbaum-Garfinkle et Brangwynne, 2015 ;

Mackenzie et al., 2017). Ces études montrent aussi qu'avec le temps, ces structures insolubles qui étaient initialement liquides, peuvent piéger les RBPs de type normal qui peuvent par la suite se séparer à leur tour et former des inclusions irréversibles toxiques. Ces résultats suggèrent ainsi que les granules de stress peuvent être les sites initiaux de la biogenèse de la maladie. L'étude la plus solide qui renforce cette hypothèse est celle de Taylor et ses collègues (2019) qui grâce au système de granules de stress inductibles à la lumière appelé OptoGranules, ont montré que la formation répétitive ou persistante des GS conduit directement à l'agrégation de TDP-43 (Zhang et al., 2019). Ainsi, la déstabilisation des granules de stress peut favoriser la formation d'agrégats de TDP-43 en perturbant la régulation des structures LLPS. En revanche, le rôle des GS en tant que « creusets » favorisant l'agrégation de TDP-43 est encore débattu. Ainsi, d'autres voies de formation des agrégats de TDP-43 indépendamment des GS ont été par la suite proposées. Une étude récente a démontré que des niveaux accrus de TDP-43 sont suffisants pour induire des LLPS de longue durée et des inclusions toxiques. En conséquence, le transport nucléaire est perturbé ce qui épuise lentement la protéine TDP-43 dans le noyau et conduit à la mort cellulaire (Gasset-Rosa et al., 2019).

Également, l'association initiale de TDP-43 avec les GS a été signalée comme étant neuroprotectrice. En cas de stress, TDP-43 se co-localise d'abord dans les GS, où elle est protégée de l'hyper-phosphorylation et de l'agrégation excessive par la charge d'ARN plus élevée (McGurk et al., 2018). Conformément à ces données, il a été récemment constaté que la liaison à l'ARN dans les granules de stress antagonise la transition de phase anormale de TDP-43 et permet d'augmenter la solubilité de TDP-43 ce qui étaye davantage le rôle protecteur des GS (Mann et al., 2019 ; Rengifo et al., 2021). Il a également été observé à l'aide de la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH), l'absence d'ARNm dans de nombreuses inclusions pathologiques de TDP-43. Toutefois, la neuroprotection de l'ARN vis-à-vis de TDP-43 dépend de la durée du stress cellulaire. De plus, ces études indiquent que l'association à court terme avec les GS est bénéfique pour TDP-43 en raison de la disponibilité élevée d'ARN, tandis qu'une formation répétée et à long terme des GS est préjudiciable à la viabilité neuronale et perturbe la dynamique

des GS (McGurk et al., 2018 ; Mann et al., 2019). En conséquence, cela conduit à la conversion des GS en granules persistants qui favorisent l'agrégation des protéines et l'accumulation d'agrégats insolubles. Dans l'ensemble, l'association de TDP-43 aux GS semble être à la fois toxique et protectrice selon le modèle expérimental, le type de stress et la durée (transitoire ou chronique) et nécessite encore des études plus approfondies. En somme, les LLPS et l'agrégation sont étroitement liées dans le contexte de TDP-43. La perturbation des condensats liquides formés par LLPS peut conduire à la formation d'agrégats toxiques irréversibles, qui sont associés à de nombreuses maladies neurodégénératives. Outre la concentration élevée des RBPs, un stress persistant, des mutations génétiques et des défauts de transport nucléaire, la phosphorylation est aussi un facteur déclencheur potentiel des structures LLPS anormales.

Enfin, une récente proposition de modèle en deux étapes a été avancée pour expliquer les mécanismes de transition de phase liquide à solide (**Figure 23**).

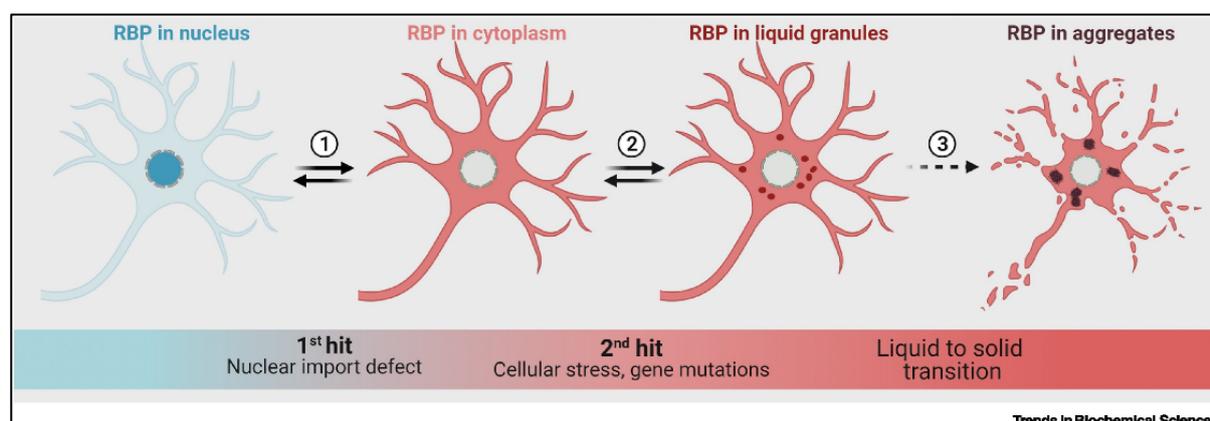


Figure 23- Les granules de stress seraient à l'origine de l'agrégation des protéines de liaison à l'ARN.

Ce modèle en 2 phases tente de présenter comment l'agrégation des protéines RBPs intervient dans les maladies. La première phase est un défaut d'importation nucléaire induisant une délocalisation cytosolique de la protéine RBP, causé par des mutations ou des perturbations dans la machinerie de transport. La deuxième est la présence d'un stress cellulaire induisant la formation de GS par LLPS. Avec le temps et des altérations dans leur dynamique, les GS peuvent subir une transition de phase liquide à solide, conduisant à l'agrégation pathologique. **D'après :** Sternburg, Erin L et al. "Post-translational modifications on RNA-binding proteins: accelerators, brakes, or passengers in neurodegeneration?" *Trends in biochemical sciences vol. 47,1 (2022): 6-22. doi:10.1016/j.tibs.2021.07.004.*

La première étape correspond à un défaut d'importation nucléaire, entraînant une accumulation des RBPs dans le cytoplasme. Dans la deuxième étape, un stress cellulaire et/ou des mutations dans les RBPs conduisent à la formation de granules de stress (GS)

par le processus de séparation de phase liquide-liquide (LLPS) dans le cytoplasme. Au fil du temps, la dynamique des GS serait perturbée, entraînant une transition des GS de l'état liquide à l'état solide. Ce modèle suggérerait que la transition de phase liquide-solide se déroule en deux temps distincts. (Sternburg et al., 2021).

1.1.13 Stratégie de modulation des phases anormales de TDP-43

Nous venons de voir que les RBPs peuvent subir une transition de phase liquide à solide qui serait à l'origine de la formation des agrégats cytoplasmiques observés dans la SLA. Plusieurs méthodes originales ont été développées afin d'empêcher cette transition anormale (**Figure 24**). Actuellement, trois principales stratégies prometteuses ont été développées pour cibler différents aspects de la pathologie de la SLA. Ces approches se concentrent sur les récepteurs d'import nucléaire, les protéines de choc thermique et l'ARN. Ces quatre approches seront présentées en détails dans les prochaines sections.

Comme de nombreuses RBP, TDP-43 transloque du noyau vers le cytoplasme (Ayala et al., 2008). L'importation nucléaire active de TDP-43 est régulée par les gradients Ran et se produit via la liaison des Importines α et β , des protéines de transport appartenant à la famille des karyophérines, aux séquences NLS (Ayala et al., 2008 ; Nishimura et al., 2010). Une étude récente a permis de montrer que la liaison aux ARN nucléaires riches en GU limite la disponibilité de TDP-43 pour l'exportation nucléaire (Duan et al., 2022). La plupart des protéines sont exportées du noyau par l'intermédiaire de l'Exportine-1 (Crm1) hormis TDP-43 et FUS qui sont exportés par diffusion passive (Ederle et al., 2018 ; Pinarbasi et al., 2018). Plusieurs groupes ont déjà montré que les récepteurs d'importation nucléaire (NIR) peuvent prévenir et inverser la transition de phase anormale des RBPs TDP-43, FUS, hnRNPA1 et hnRNPA2/B1 (Yoshizawa et al., 2018 ; Guo et al., 2019). L'Importine α et la Karyophérine- β 1 (Kap β 1) empêchent la fibrillation de TDP-43 tandis que la Karyophérine- β 2 (Kap β 2) inhibe la fibrillation de FUS, TAF15, EWSR1, hnRNPA1 et hnRNPA2 (Guo et al., 2019). De plus, Kap β 2 dissocie également les fibrilles préformées, les condensats liquides et les hydrogels composés de

protéines pathologiques via sa liaison aux NLS (Yoshizawa et al., 2018 ; Guo et al., 2019). Encore peu d'études portent sur la capacité des récepteurs NIR à restaurer l'homéostasie de TDP-43 dans la SLA mais l'ensemble de ces études sont encourageantes et nécessite encore d'être explorées.

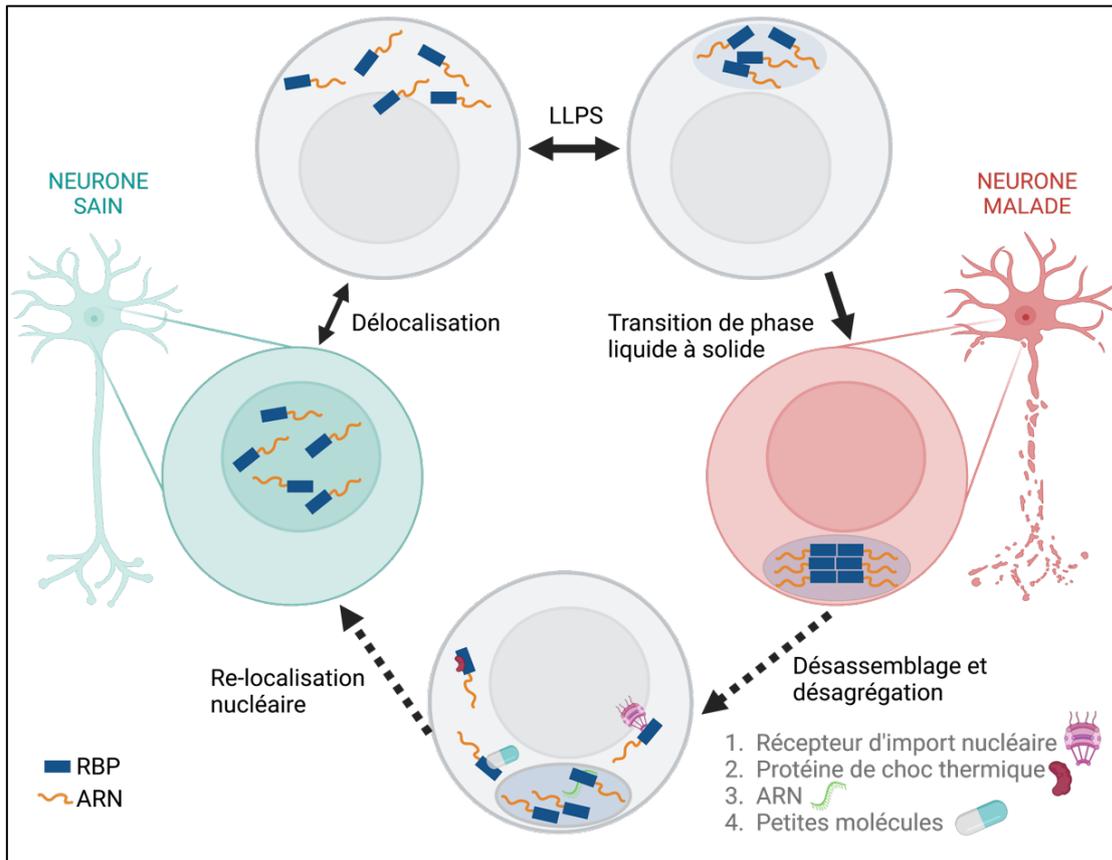


Figure 24- Les approches thérapeutiques existantes pour moduler les transitions de phase liquide à solide des protéines de liaison à l'ARN dans la pathologie.

Les RBPs peuvent subir une séparation de phase liquide-liquide (LLPS), un processus permettant de former des condensats liquides dépourvus de membrane. Dans la pathologie, il peut arriver que les RBPs subissent une transition de phase liquide à solide qui progresse vers la formation d'agrégats irréversibles. Des stratégies d'assemblage et de désassemblage des protéines sont développées notamment par l'utilisation des petites molécules, des protéines chaperonnes et de l'ARN. Leurs effets permettraient d'empêcher ou de reverser la transition de phase anormale des RBPs et de rétablir par la suite leur localisation nucléaire.

Adapté de: Carey JL, Guo L. Liquid-Liquid Phase Separation of TDP-43 and FUS in Physiology and Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Biosci.* 2022 Feb 2;9:826719. doi: 10.3389/fmolb.2022.826719.

Créé à partir de BioRender.com.

Une autre stratégie consiste à utiliser des protéines de choc thermique (HSP). Ces protéines sont des chaperons moléculaires, agissant sur le mauvais repliement des protéines, une des caractéristiques de l'agrégation des protéines. Des études ont montré que les protéines HSP ont la capacité de réguler la séparation de phase des RBPs. Par

exemple, il a été constaté que la protéine chaperonne Hsp70 est impliquée dans la régulation de la maturation des GS et dans la transition anormale vers une phase solide (Mateju et al., 2017). Plus spécifiquement, la protéine Hsp70 peut recruter la protéine TDP-43 cytoplasmique, exempte d'ARN, dans des condensats appelés anisosomes qui sont formés après l'inhibition du protéasome. Il a également été démontré que la protéine Hsp70 empêche l'agrégation des anisosomes de TDP-43 dans les cellules U2OS (lignée cellulaire dérivée de l'ostéosarcome humain) de manière dépendante de l'ATP (Yu et al., 2021). Une autre étude a identifié la petite chaperonne HSPB1 (Heat Shock Protein Family B) comme un régulateur de phase et de l'agrégation cytoplasmique de TDP-43 (Lu et al., 2022). Par ailleurs, la déplétion de HSPB1 a été observée dans les tissus des patients atteints de SLA. Une activité de désagrégation a aussi été observée pour la protéine chaperonne dérivée de la levure, la Hsp104, dans la réversion de l'agrégation de TDP-43 dans plusieurs modèles *in vitro* (Jackrel et al., 2014 ; Tariq et al., 2019). Ils existent de nombreuses autres protéines de choc thermique présentes dans les populations neuronales et leur potentiel en tant que désagrégases de RBP est discuté en détails par Shorter (Shorter, 2017).

Outre les NIR et les chaperonnes, les ARN sont des partenaires évidents des RBPs qui ont à la fois un effet protecteur et toxique dans la séparation de phase. Il semble logique qu'ils soient ciblés et représentent donc une autre voie thérapeutique à explorer. TDP-43 se lierait aux ARN riches en GU par l'intermédiaire de ses domaines RRM afin de s'oligomériser ce qui empêcherait la séparation de phase *in vitro* de TDP-43 (Rengifo-Gonzalez et al., 2021). L'ARN modulerait les structures LLPS de TDP-43 *in vitro* et l'augmentation de la concentration d'ARN augmenterait la solubilité de TDP-43 (Maharana et al., 2018). Des études ont utilisé la technique CLIP (Cross-Linking Immunoprecipitation) pour examiner les interactions entre les ARN et les protéines. Ils ont découvert que la séquence d'ARN spécifique, Clip_34, liée à TDP-43, pouvait influencer la solubilité de cette protéine. (Ayala et al., 2008). Il a aussi été constaté que la séquence Clip_34 empêche la séparation de phase de TDP-43 dans les cellules HEK293T et augmente la survie des cellules et la localisation nucléaire de TDP-43 dans les lignées

neuronales (Mann et al., 2019). Dans l'ensemble, ces résultats nous indiquent que les ARN sont capables de prévenir et de reverser la phase anormale de TDP-43 et peuvent être utilisés davantage en tant qu'agent thérapeutique. Les trois stratégies évoquées ci-dessus sont très prometteuses mais il existe également une autre approche, utilisant des médicaments issus d'une librairie de composés FDA, afin de moduler les interactions protéine-ARN des RBPs dans les condensats cytoplasmiques. Un criblage *in cellulo* à haut débit avec des milliers de molécules FDA a été réalisée dans une étude afin de moduler la dynamique des granules de stress (GS) (Fang et al., 2019). Les auteurs de l'étude sont parvenus à identifier une centaine de hits, principalement des composés planaires ayant une structure apparentée à celle des molécules intercalantes de l'ADN, dont la molécule Mitoxantrone, qui diminue significativement l'accumulation de TDP-43, dépendante de l'ARN, dans les GS des cellules iPSC provenant de patients atteints de SLA (Fang et al., 2019). L'inhibition de l'accumulation persistante de TDP-43 dans le cytoplasme durant un stress transitoire, a permis de diminuer significativement la formation d'agrégats de la protéine TDP-43. Ainsi, la perturbation des condensats liquides et plus particulièrement de l'interaction RBP-ARN par des molécules est maintenant considérée comme une stratégie thérapeutique intéressante pour la SLA.

En outre, une des caractéristiques de la SLA est la présence d'agrégats de TDP-43 hyper-phosphorylés (Neumann et al., 2009) et la phosphorylation est une modification post-traductionnelle qui régule les LLPS (Nardozi et al., 2010). Les kinases sont les enzymes responsables de la phosphorylation des protéines, et les inhibiteurs de kinase pourraient diminuer la phosphorylation et potentiellement moduler les LLPS anormales des RBPs. Cette autre classe de molécules mérite d'être étudiée de manière plus approfondie. L'exemple le plus prometteur est celui de la *casein kinase 1-a* (CK-1a), une kinase associée à la phosphorylation et à l'agrégation de TDP-43 (Nonaka et al., 2016 ; Hicks et al., 2020). Il a été montré que des inhibiteurs de la CK-1a dont IGS-2.7 a permis d'augmenter la viabilité des motoneurones (Martinez-Gonzalez et al., 2020). D'autres kinases notamment CDC7 (Cell division cycle 7-related protein kinase) et TTBK1/2 (Tau tubulin kinases 1 and 2) sont également impliquées dans la phosphorylation de TDP-43

et peuvent représenter des cibles alternatives (Liachko et al., 2013, 2014). Des informations plus détaillées sur la régulation de la phosphorylation de TDP-43 seront présentées dans le chapitre suivant.

Dans l'ensemble, ces stratégies offrent des opportunités de prévenir et de reverser l'assemblage anormale des RBPs dans les maladies neurodégénératives telles que la SLA. Néanmoins, une compréhension plus approfondie des mécanismes par lesquels la séparation de phase contribue à leur fonction cellulaire et les facteurs qui médient les LLPS de TDP-43 et d'autres RBP permettra de concevoir des thérapies plus ciblées pour restaurer l'homéostasie protéique.

1.1.14 Régulation des phases liquides de TDP-43

Nous avons vu précédemment que la protéine TDP-43 contient une région IDR prédite, de type PrLD, qui est cruciale pour son auto-association réversible et irréversible impliquée dans la formation des LLPS (Li et al., 2018). La région LCD de TDP-43 (qui correspond aussi au domaine CTD) est principalement composée d'acides aminés hydrophobes aromatiques dispersés (Y,F) entrecoupés de segments hydrophiles de résidus polaires (Q,S,N) et de glycines (G) (Li et al., 2018). Des études antérieures ont mis en évidence que les segments hydrophobes riches en résidus aromatiques (FYW) et qui sont adjacents à des segments flexibles et hydrophiles jouent un rôle crucial dans la condensation des domaines CTD de TDP-43. Cette condensation est facilitée par des interactions intermoléculaires π - π (Schmidt et al., 2019a, 2019b ; Vernon et al., 2018). Outre la composition en acides aminés, la courte région du CTD (aa 321-340) peut également s'auto-interagir et former une hélice- α transitoire *in vitro* lors de l'autoassemblage (Conicella et al., 2016). La perturbation de cette structure en hélice- α par l'introduction de mutations, telles que W334G ou les mutations de TDP-43 associées à la SLA (A321G, Q331K et M337V), entrave les interactions multivalentes et perturbe la séparation en phase de TDP-43 (Conicella et al., 2016 ; Hallegger et al., 2021). Également, les domaines d'oligomérisation peuvent contribuer à la multivalence qui entraîne la séparation des phases. En effet, une étude a montré que l'oligomérisation du domaine

NTD de TDP-43 peut améliorer la multivalence et, par conséquent, la séparation de phase de TDP-43 (Wang et al., 2018). Cette amélioration est compromise lorsque l'oligomérisation du domaine NTD est perturbée par une seule substitution phosphomimétique S48E dans le NTD. Récemment, un autre motif structural court, appelé LARKS (*Low-complexity, Aromatic-rich, Kinked segments*) a été identifié dans le PrLD de TDP-43 (Hughes et al., 2021). Contrairement aux structures de type fermeture stérique ou fibrilles amyloïdes, les LARKS interagissent faiblement par l'intermédiaire de résidus polaires et de chaînes latérales aromatiques. Les interactions faibles permettent la formation de structure en feuillets- β croisés, facilitant l'interaction de plusieurs protéines de TDP-43 entre elles ou bien avec d'autres partenaires protéiques (Hughes et al., 2021). En résumé, il existe une multitude de régulateurs de l'auto-association réversible de TDP-43. Néanmoins, il existe un autre régulateur important, à savoir les modifications post-traductionnelles (MPT).

1.1.15 Les modifications post-traductionnelles

Comme nous l'avons vu précédemment, les MPT jouent un rôle essentiel dans la formation des condensats sans membrane. En particulier, l'acétylation peut réguler la séparation de phase de TDP-43. Par exemple, de multiples sites d'acétylation des résidus lysines dans les domaines RRM de TDP-43 diminuent la liaison à l'ARN et perturbent la régulation des cibles d'ARN de TDP-43 (Cohen et al., 2015). La perte des interactions avec l'ARN peut déclencher la séparation en phases de TDP-43 et conduire à l'agrégation (Mann et al., 2019). Outre l'acétylation des lysines, la phosphorylation est une MPT qui influence aussi la capacité de TDP-43 à s'auto-associer. La substitution phosphomimétique S48E dans le domaine NTD de TDP-43 a eu un impact significatif sur la séparation en phases de TDP-43 *in vitro*. Cela suggère que la phosphorylation de ce résidu perturbe les interactions intermoléculaires faibles, ce qui pourrait favoriser l'adoption d'une conformation plus rigide et structurée de la protéine (Wang et al., 2018). Par ailleurs, une étude a démontré que les structures désordonnées ont tendance à être davantage phosphorylées en raison de leur plus grande proportion en résidus

phosphorylables. Cela s'applique notamment à TDP-43, qui contient plusieurs de ces résidus phosphorylables (Iakoucheva et al., 2004). Cependant, le lien entre la phosphorylation de TDP-43, en particulier dans le domaine CTD, et son auto-association n'est pas pleinement compris et nécessite une investigation approfondie. Dans le Chapitre IV de cette thèse, nous aborderons le rôle de la phosphorylation de TDP-43 dans la physiopathologie de la SLA, ainsi que son impact sur les fonctions biologiques de la protéine. Ce chapitre mettra en lumière l'importance de cette modification post-traductionnelle dans le contexte de la SLA et fournira de nouvelles perspectives pour une meilleure compréhension de la maladie.

Chapitre IV- La phosphorylation de TDP-43

1.1.16 Le rôle de la phosphorylation dans la pathologie

Dans la SLA, TDP-43 agrégée présente plusieurs MPT notamment l'ubiquitination, l'acétylation, la SUMOylation et la phosphorylation (**Cf section 1.1.7.3**). Parmi ces modifications, la phosphorylation anormale du domaine C-terminal de TDP-43 est un marqueur cohérent de la maladie et est utilisée à des fins diagnostiques pour identifier les inclusions protéiques positives à TDP-43 dans le cerveau et la moelle épinière (Hasegawa et al., 2008). L'événement de phosphorylation le mieux caractérisé se produit sur les sérines 375/409/410, qui sont systématiquement phosphorylées dans la SLA (**Figure 25**). En plus d'être un marqueur pathologique robuste et cohérent des inclusions positives à TDP-43, TDP-43 phosphorylée se manifeste aussi dans d'autres maladies neurodégénératives telles que la FTLN associée à TDP-43 (Neumann et al., 2009). Ainsi, nous nous intéresserons dans la section suivante aux sites de phosphorylation potentiels de TDP-43 ainsi que leur impact fonctionnel.

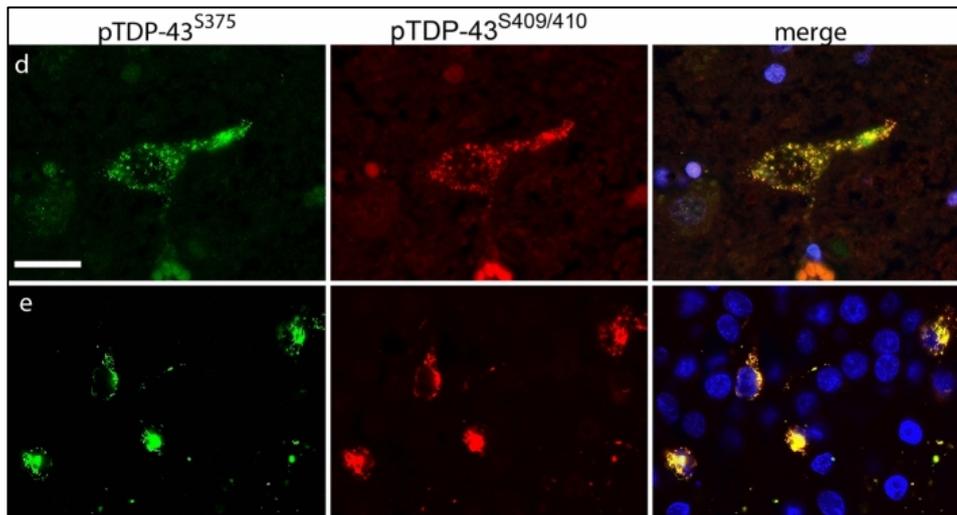


Figure 25- Co-marquage des anticorps pTDP-43^{S375} et pTDP-43^{S409/410} dans les tissus de patients atteints de SLA.

Échantillons de moelle épinière (d) et de cerveau (e) d'un patient atteint de SLA marqués par immunofluorescence et observés au microscope confocal. Les cellules du patient sont positives à pTDP-43^{S375} en vert et à pTDP-43^{S409-410} en rouge, la superposition des canaux (merge) met en évidence la co-localisation des deux anticorps. **D'après:** Neumann, Manuela et al. "Antibody against TDP-43 phosphorylated at serine 375 suggests conformational differences of TDP-43 aggregates among FTLN-TDP subtypes." *Acta neuropathologica* vol. 140,5 (2020): 645-658. doi:10.1007/s00401-020-02207-w.

1.1.17 Les sites de phosphorylation de TDP-43

La protéine TDP-43 possède 64 sites de phosphorylation potentiels : 41 résidus de sérine (Ser), 15 de thréonine (Thr) et 8 de tyrosine (Tyr). La spectrométrie de masse de la fraction agrégée de TDP-43 provenant de tissu cérébral de patients atteints de SLA a montré que TDP-43 était phosphorylé sur 17 sites, dont 16 se trouvent majoritairement localisés dans le domaine C-terminal riche en glycines (Kametani et al., 2016). En plus de ces 17 sites, deux autres sites S369 et S410 sont connus pour être phosphorylés chez les patients atteints de SLA (Hasegawa et al., 2008 ; Neumann et al., 2009, 2020). Sur ces 19 sites, la phosphorylation aux résidus S369, S379, S403/404 et S409/410 se produit systématiquement dans la maladie ce qui suggère un rôle potentiel important dans la pathologie (**Figure 26**). L'implication des 13 sites restants dans la maladie n'a pas encore été confirmée par immunohistochimie (IHC) ou d'autres moyens en raison du manque d'anticorps spécifiques pour ces sites de phosphorylation (**Figure 26**). Un sous-ensemble de mutations faux-sens de TDP-43 pathogènes ont la capacité de supprimer ou d'introduire des sites de phosphorylation (Buratti et al., 2015). Une vingtaine de ces mutations sont susceptibles d'induire dans un contexte pathologique une mauvaise localisation cytoplasmique de TDP-43, une modification des interactions protéine-protéine, une augmentation de l'agrégation et/ou une augmentation de la demi-vie de la protéine (**Figure 26**). Ces mutations peuvent également favoriser la phosphorylation au niveau des sites de phosphorylation proches (Buratti et al., 2015). Puisque la phosphorylation est impliquée dans ces maladies, il sera primordial de comprendre l'impact fonctionnel précis des sites de phosphorylation spécifiques afin de fournir des informations importantes sur les mécanismes régissant la pathologie. Nous venons de voir qu'il existe plusieurs sites de phosphorylation potentiels dans la maladie, nous allons maintenant voir quelles sont les kinases et les phosphatases qui régulent cette activité de phosphorylation de TDP-43.

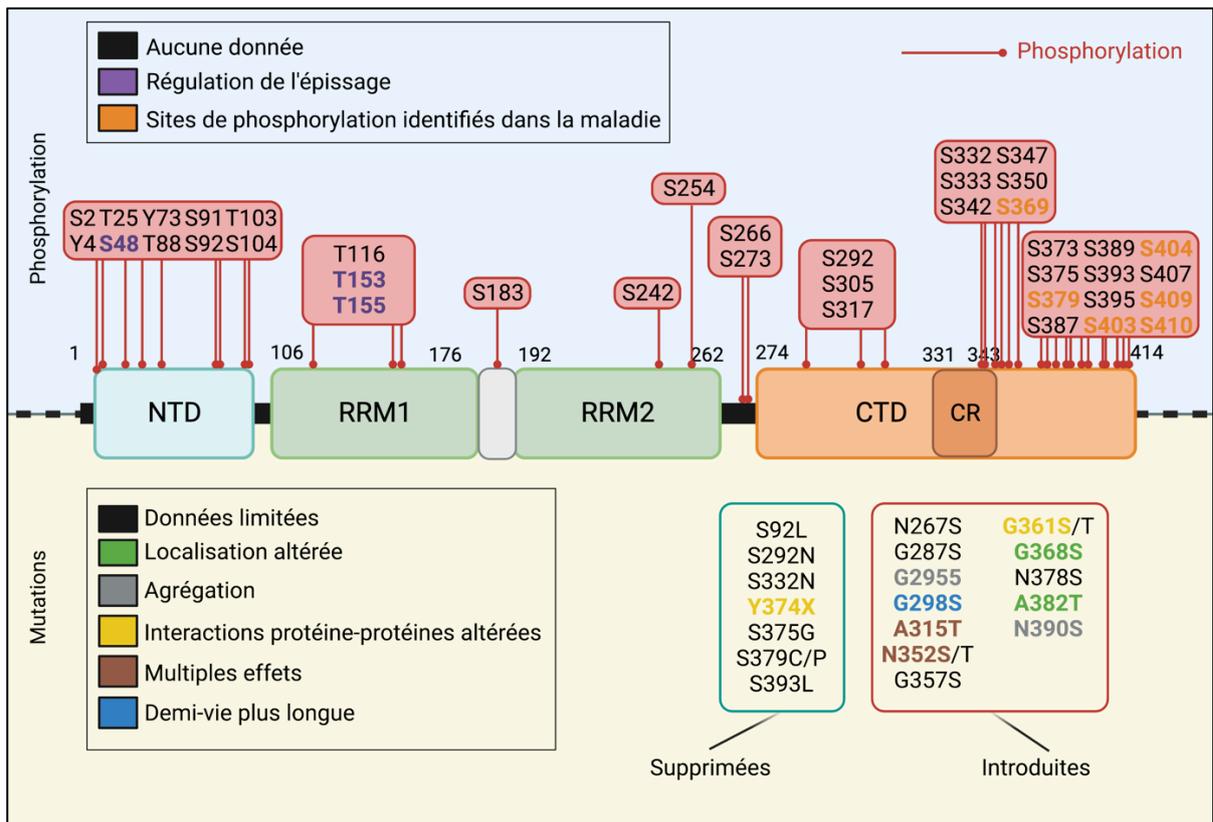


Figure 26- Les sites de phosphorylation de TDP-43 et leur impact fonctionnel.

Le panel du haut représente les sites de phosphorylation de TDP-43 sur ses différents domaines, on note un plus grand regroupement de phospho-sites dans le domaine CTD (rouge). Les sites de phosphorylation identifiés dans la SLA se localisent majoritairement dans le domaine CTD (orange). En violet, sont représentés les résidus impliqués dans la régulation de l'épissage. Dans le panel du bas, est représenté des mutations faux-sens pathogènes capables de supprimer (carré vert) ou introduire (carré rouge) des sites de phosphorylation. Ces mutations peuvent altérer la localisation subcellulaire (vert), augmenter l'agrégation (gris), perturber les interactions protéine-protéine (jaune) ou induire une demi-vie plus longue (bleu) de la protéine TDP-43. D'autres mutations n'ont toujours pas été caractérisées (noir). *Adapté de: Eck, Randall J et al. "Regulation of TDP-43 phosphorylation in aging and disease." GeroScience vol. 43,4 (2021): 1605-1614. doi:10.1007/s11357-021-00383-5. Créé avec BioRender.com.*

1.1.18 Régulation de la phosphorylation de TDP-43

1.1.18.1 Les kinases

Les kinases sont des enzymes du groupe des transférases qui catalysent une phosphorylation par le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP vers une cible spécifique. Souvent considéré à tort comme un processus cellulaire aberrant, la phosphorylation pourrait être au contraire un événement régulé selon plusieurs études.

À ce jour, on compte cinq kinases qui sont capable de phosphoryler TDP-43 de manière directe *in vitro* et *in vivo* : les caséines kinases 1 et 2 (CK1 et CK2), le cycle de division cellulaire 7 (CDC7) et les tubulines kinases tau 1 et 2 (TTBK1 et TTBK2) (**Figure 27**).

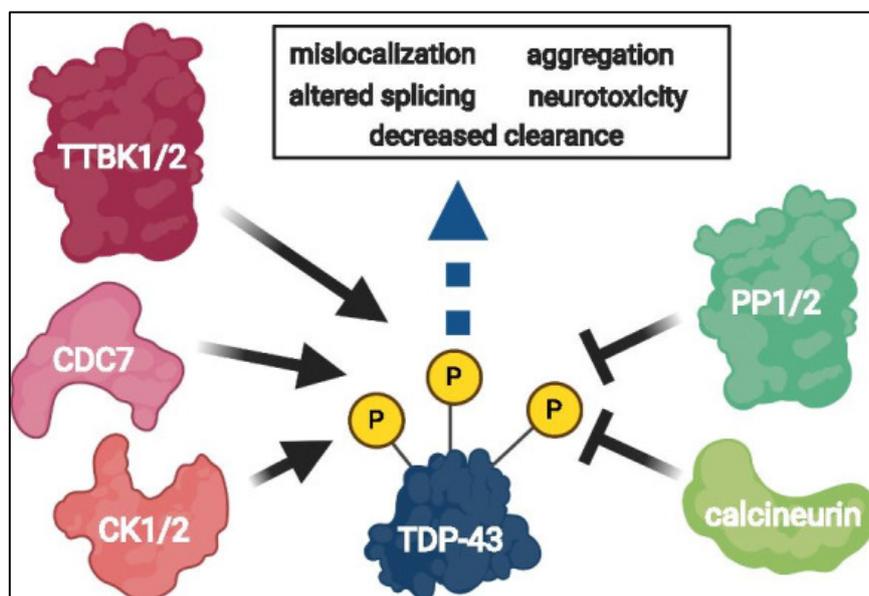


Figure 27- Kinases et phosphatases ciblant TDP-43 et leurs conséquences biologiques.

Une phosphorylation anormale de TDP-43 liée au vieillissement cellulaire et/ou à la maladie altèrent de nombreux mécanismes fonctionnels biologiques : la localisation subcellulaire, l'épissage des ARNm, la solubilité protéique, le taux de renouvellement et engendre une neurotoxicité accrue. Cinq kinases phosphorylent directement TDP-43 notamment les caséines kinase 1 et 2 (CK1 et CK2), le cycle de division cellulaire 7 (CDC7) et les tubulines kinases tau 1 et 2 (TTBK1 et TTBK2). Quant aux phosphatases qui déphosphorylent TDP-43, ils en existent deux types, les phosphatases PP1 et PP2 ainsi que la calcineurine. **D'après :** Eck RJ, Kraemer BC, Liachko NF. Regulation of TDP-43 phosphorylation in aging and disease. *Geroscience*. 2021 Aug;43(4):1605-1614. doi: 10.1007/s11357-021-00383-5. Epub 2021 May 25.

La fonction de TDP-43 est affectée par la modification de la phosphorylation (Kametani et al., 2009). En outre, différents signaux de stress entraînent une phosphorylation de TDP-43 dépendante de la CK1. Chez les mammifères, la CK1 possède environ 7 isoformes (α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 , δ , ϵ) (Li et al., 2004), parmi lesquelles CK1 δ et CK1 ϵ peuvent phosphoryler TDP-43 *in vitro* (Nonaka et al., 2016). Il a été récemment découvert qu'une forme tronquée de CK1 δ en C-terminal (CK1 δ 1-317), favorise la mauvaise localisation et l'accumulation cytoplasmique de TDP-43 phosphorylé dans les cellules SH-SY5Y (une lignée de neuroblastome) et dans des levures exprimant la forme tronquée (Nonaka et al., 2016). c'est ainsi qu'un lien a été établi entre la kinase CK1 et la pathogénèse de la maladie. En effet, il est connu que CK1 peut phosphoryler TDP-43 *in*

in vitro sur 29 sites dont 18 sont majoritairement localisés dans le domaine CTD (Kametani et al., 2009). De nombreuses sérines phosphorylées dans la SLA et la FTLD sont d'ailleurs ciblées par CK1, notamment les Ser379 ; Ser403/404 et Ser409/410 (Kametani et al., 2009). *In vitro*, les kinases CK1 et CK2 favorisent la conversion de TDP-43 en formes fibrillogènes, structures évaluées au microscope électronique qui rappellent celles de la FTLD-TDP (Carlomagno et al., 2014). Il a été récemment constaté que les niveaux d'ARNm de CK1 ϵ sont étroitement corrélés avec TDP-43 phosphorylée dans les tissus de patients SLA et la surexpression de CK1 ϵ dans les lignées de motoneurones dérivées d'iPSC favorise l'accumulation cytoplasmique de TDP-43 (Krach et al., 2018). Il a également été démontré que les kinases CDC7, TTBK1 et TTBK2 co-localisent avec la protéine TDP-43 agrégée et phosphorylée dans des tissus *post-mortem* de patients SLA et FTLD-TDP (Liachko et al., 2013, 2014). Ces résultats ont permis l'émergence d'inhibiteurs de kinases. Les inhibiteurs de CK-1 δ et de CDC7 ont montré leur capacité à prévenir l'accumulation de TDP-43 phosphorylée et ont démontré des effets neuroprotecteurs au niveau cellulaire. Cependant, il a été observé que la surexpression de CDC7, TTBK1 ou TTBK2 favorise la phosphorylation de TDP-43, entraînant sa mauvaise localisation et son agrégation (Liachko et al., 2013 ; Alquezar et al., 2016 ; Taylor et al., 2018). L'inhibition de CK-1 δ par le composé IGS-2.7 s'est aussi révélée être bénéfique *in vivo* dans un modèle transgénique de souris TDP-43 (A315T) (Martínez-González et al., 2020). Des stratégies d'inhibition de TTBK1 sont aussi en cours de développement et montrent que la phosphorylation et l'agrégation de TDP-43 sont considérablement atténuées ce qui a permis de sauver la dégénérescence des neurones GABAergiques dérivés d'iPSC (Tian et al., 2021).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la phosphorylation joue un rôle critique dans la pathologie et que moduler la phosphorylation de TDP-43 avec des inhibiteurs de kinase peut être une piste thérapeutique attractive pour le traitement des protéinopathies impliquant TDP-43. Néanmoins, la phosphorylation peut jouer un rôle protecteur et promouvoir une fonction normale au sein de la cellule. Par exemple, Li et ses collègues (2017) ont observé que la protéine kinase activée par les mitogènes (MEK)

phosphoryle TDP-43 aux résidus T153 et T155 situés dans son domaine RRM1 ce qui régule sa localisation dans le nucléole après un choc thermique. Ces résultats suggèrent un rôle de maintenance de la phosphorylation dans l'homéostasie de TDP-43 (Li et al., 2017). Il existe plusieurs autres kinases connues pour phosphoryler TDP-43 de manière indirecte, telles que GSK3- β , ERK, JNK (c-Jun N-terminal kinase) ou encore CDK6 (Cyclin-dependent kinase 6) (Buratti et al., 2010 ; Wang et al., 2012 ; Liachko et al., 2013). La phosphorylation de TDP-43 dépendante de GSK3- β a été associée à la formation de dépôts de TDP-43 dans les cellules des patients atteints de SLA (Neumann et al., 2006 ; Liachko et al., 2013). Également, la phosphorylation de TDP-43 par ERK et JNK contribue à l'accumulation de TDP-43 (Wang et al., 2012). Enfin, la phosphorylation de TDP-43 par CDK6 a été associée à une diminution de la solubilité de TDP-43, qui peut contribuer à la formation de condensats et à la pathogénèse de la SLA (Kampers et al., 2010). La phosphorylation de TDP-43 induit des modifications de la pathologie dans les modèles expérimentaux, ce qui suggère un rôle potentiellement régulateur de la phosphorylation dans l'activité de la protéine.

1.1.18.2 Les phosphatases

Les phosphatases catalysent la réaction inverse en enlevant les groupements phosphates des résidus phosphorylés d'une cible spécifique. Des études ont montré que les trois phosphatases PP1, PP2 et la calcineurine déphosphorylent TDP-43 (**Figure 27**). Des études ont montré que la calcineurine se lie à l'extrémité C-terminale de TDP-43 dans des modèles *in vitro* (Liachko et al., 2016) et co-immunoprécipite également avec TDP-43 dans des lysats de cerveau humain (David et al., 2017). Quant aux PP1/2, elles pourraient interagir directement avec TDP-43 et il a été montré que ces phosphatases co-immunoprécipitent avec TDP-43 dans des extraits de cellules HEK-293T (Gu et al., 2018). Concernant leurs sites de déphosphorylation, il a été démontré que la calcineurine déphosphoryle TDP-43 aux sérines 409 et 410 (S409/410) alors que les PP1/2 peuvent déphosphoryler *in vitro* TDP-43 aux sites S379, S403/404 et S409/410 (Liachko et al., 2016 ; Gu et al., 2018). Dans des cellules humaines en cultures, il a été constaté qu'un

traitement avec des inhibiteurs des PP1/2 (calyculine A) ou avec un inhibiteur de la calcineurine (tacrolimus), a tendance à accroître les niveaux de TDP-43 phosphorylé (Liachko et al., 2016 ; Gu et al., 2018). Dans des modèles transgéniques *C.elegans* exprimant TDP-43, la perte de l'homologue *tax-6* de la calcineurine, a eu pour effet de favoriser l'accumulation de TDP-43 phosphorylé, les altérations motrices et accélère la neurodégénérescence. Fait intéressant, l'accumulation de TDP-43 phosphorylée n'a pas eu d'effets majeurs sur les fonctions d'épissage de TDP-43. Autre point, la calcineurine co-localise avec la protéine TDP-43 phosphorylée dans les inclusions retrouvées chez les patients atteints de SLA et de FTLD-TDP ce qui pourrait suggérer que dans la pathologie, la calcineurine viendrait déphosphoryler TDP-43 afin de la protéger de l'agrégation toxique (Liachko et al., 2016). De plus, une altération de la calcineurine peut contribuer à la maladie puisque l'activité de la calcineurine est réduite chez les patients atteints de SLA (Ferri et al., 2004). Nous allons maintenant voir que le dérèglement de l'activité de phosphorylation de TDP-43 dans un contexte pathologique peut avoir des conséquences sur sa localisation subcellulaire, sa capacité à former des condensats biomoléculaires, sur sa solubilité et enfin sur sa fonction d'épissage des ARNm cibles.

1.1.19 Conséquences de la phosphorylation de TDP-43

1.1.19.1 Effet sur la localisation subcellulaire

Des études suggèrent que la phosphorylation de TDP-43 peut altérer la localisation subcellulaire de la protéine. Par exemple, il a été récemment montré dans une étude que la casein kinase 1 δ (CK1) peut induire la re-localisation, l'accumulation et l'agrégation toxique de TDP-43 dans le cytoplasme à la fois dans des modèles *in vivo* et *in vitro* (Nonaka et al., 2016). Une étude parue en 2020 a démontré dans des cellules NSC-34 qu'en conditions de stress du réticulum endoplasmique (RE), CK1 provoque l'accumulation de TDP-43 endogène dans des agrégats. Cette accumulation a pu être diminuée en présence d'un inhibiteur de kinase CK1 (Hicks et al., 2020). Dans certains modèles, des mutations phosphomimétiques imitant une phosphorylation de TDP-43 dans le domaine CTD au niveau de ses résidus sérines S387E, S389E, S393E et S395E

favorisent la localisation cytoplasmique de TDP-43 comparé à la forme sauvage de TDP-43 (Newell et al., 2019). Dans d'autres modèles, l'accumulation cytoplasmique de TDP-43 suffit pour former des agrégats et induire la phosphorylation (Gasset-Rosa et al., 2019). Cependant, une étude récente n'a montré aucun impact de mutations phosphomimétiques du domaine CTD de TDP-43 sur sa distribution subcellulaire dans des cellules en culture (Grujjs da Silva et al., 2022). En somme, ces différentes études ne permettent pas d'avoir une corrélation claire entre la phosphorylation et la localisation de TDP-43, et le lien entre ces deux mécanismes et l'agrégation reste encore peu étudiée.

1.1.19.2 Effet sur l'activité d'épissage des ARNm

Quelques études ont rapporté que la phosphorylation aux résidus T153/Y155 et S48 de TDP-43 a la capacité de moduler l'activité d'épissage. L'expression d'un double phosphomimétique T153E/Y155E potentiel dans des cellules en culture en combinaison avec un reporter d'épissage pour l'ARNm CFTR, a diminué de près de 30% l'inclusion de l'exon 9 de CFTR, comparé à TDP-43 normal. Ce résultat peut s'expliquer par une diminution de l'affinité de liaison de TDP-43 à l'ARN de 5 fois par rapport au contrôle sans pour autant modifier la solubilité ou la stabilité (Li et al., 2017). De même, une mutation phosphomimétique au niveau du résidu S48 (S48E) a réduit l'activité d'épissage du transcrit CFTR d'environ 40% dans les cellules HeLa (Wang et al., 2018). Ces données suggèrent un rôle spécifique de la phosphorylation dans la régulation de l'activité d'épissage.

1.1.19.3 Effet sur la solubilité et l'agrégation

La littérature scientifique présente des résultats contradictoires concernant la relation entre la phosphorylation et l'agrégation de protéine TDP-43. La phosphorylation, une modification post-traductionnelle essentielle, joue un rôle crucial dans la régulation des propriétés IDR de TDP-43 impliquées dans son auto-association (LLPS). Elle modifie la charge des chaînes latérales des acides aminés phosphorylés, introduisant ainsi des charges négatives qui modifient les propriétés des protéines, leur

offrant de nouvelles possibilités d'interactions intra- et intermoléculaires (Bah et al., 2016). On peut donc s'attendre à ce que cela ait un impact positif ou négatif sur l'auto-association réversible de TDP-43. Des études ont montré que l'introduction d'une substitution phosphomimétique (S48E) perturbe la dimérisation fonctionnelle médiée par le domaine NTD et réduit la formation du processus LLPS de TDP-43 *in vitro* (Wang et al., 2018). Une autre étude a également constaté que cette substitution perturbe la formation d'anisosomes, des compartiments nucléaires distincts formés par le processus LLPS et qui se forment lorsque TDP-43 polymérise indépendamment de sa liaison à l'ARN (Yu et al., 2021). Il a été également démontré que des substitutions phosphomimétiques (D) dans le domaine CTD de TDP-43 (visant des résidus phosphorylés chez les patients) inhibent la condensation de TDP-43 dans le cytoplasme, réduisent son agrégation et augmentent sa solubilité *in vitro* par rapport à la forme sauvage de TDP-43 (Grujic da Silva et al., 2022). Dans les cellules, les mutations phosphomimétiques réduisent également de manière significative le recrutement de TDP-43 dans les granules de stress, sans qu'aucune explication ne soit avancée (Li et al., 2011 ; Grujic da Silva et al., 2022). Cependant, d'autres études ont montré que la phosphorylation de TDP-43 par la kinase CK1δ aux résidus sérines S393/S395/S409/S410 entraîne une mauvaise localisation et une accumulation de la protéine dans le cytoplasme, suivie d'une agrégation dans les cellules SH-SY5Y et *in vitro* (Nonaka et al., 2016). En résumé, le lien entre l'auto-association de TDP-43 (LLPS) dépendante de la phosphorylation et son agrégation cytoplasmique nécessite des études plus poussées.

Objectifs de la thèse

La protéine de liaison à l'ARN, TDP-43 est le principal composant des inclusions cytoplasmiques, caractéristiques de la sclérose latérale amyotrophique (SLA), ce qui en fait un marqueur pathologique important de la maladie (Neumann et al., 2006). Une autre caractéristique majeure des inclusions cytoplasmiques dans la SLA, est la présence d'une hyper-phosphorylation des sérines de TDP-43 dans son domaine C-terminal, notamment la phosphorylation des sérines S409/410 qui est une signature importante de la pathologie (Hasegawa et al., 2008). Cette modification post-traductionnelle a été corrélée à une relocalisation de la protéine TDP-43, à son accumulation cytoplasmique et à la formation d'agrégats toxiques à la fois *in vitro* et *in vivo* (Taylor et al., 2018). Toutefois, les mécanismes précis à l'origine des modifications de TDP-43 et à son agrégation ne sont toujours pas clairs.

Une des hypothèses admises actuellement repose sur la perturbation du processus physiologique d'autoassociation de TDP-43 (LLPS). Ce mécanisme serait régulé en grande partie par le domaine de faible complexité (LCD) de TDP-43 ayant des propriétés de type prion (PrLD), domaine où se trouve la majorité des sérines retrouvées hyper-phosphorylées dans les inclusions cytoplasmiques des personnes atteintes de SLA (Conicella et al., 2016 ; Eck et al., 2021). Encore aujourd'hui, les effets de la phosphorylation sur le mécanisme d'auto-association réversible de TDP-43 (LLPS) et sur l'agrégation ainsi que sur les fonctions biologiques de TDP-43 restent peu approfondies.

Dans un premier temps, mon travail de thèse avait pour objectif d'étudier l'impact de la phosphorylation du domaine CTD de TDP-43 sur son autoassemblage (LLPS), sa distribution subcellulaire et sa fonction d'épissage des pré-ARNm cibles. Dans un second temps, l'objectif était d'identifier des composés ciblant les autoassemblages et certaines fonctions biologiques de TDP-43 afin de proposer un potentiel traitement thérapeutique pour les protéinopathies associées à TDP-43. Pour atteindre ces objectifs, j'ai défini les objectifs spécifiques suivants :

- **Objectif 1 : Développer une nouvelle approche in cellulo automatisée :**
 - Quantifier les autoassemblages de TDP-43 (LLPS) dépendants de la phosphorylation de son domaine CTD.

- **Objectif 2 : Caractériser les autoassemblages de TDP-43**
 - Notamment ceux liés à la phosphorylation

- **Objectif 3 : Déterminer l'impact de la phosphorylation de TDP-43**
 - Sur son recrutement dans les granules de stress, liaison à l'ARNm, sa distribution subcellulaire et l'épissage de son ARNm cible CFTR.

- **Objectif 4 : Identifier des composés**
 - Capables de cibler spécifiquement les autoassemblages de TDP-43 (LLPS) dans les cellules

- **Objectif 5 : Caractériser l'effet des composés identifiés**
 - Sur la localisation subcellulaire de TDP-43, son import nucléaire et son agrégation

Pour atteindre ces objectifs, nous avons utilisé une nouvelle technologie appelée *Microtubule bench* (MT bench), qui permet d'étudier le processus d'auto-association réversible de TDP-43 dans les cellules HeLa (LLPS), combinée avec des analyses d'imageries automatisées à haute résolution (HCS). Nous avons complété ces études avec des tests sur des cellules indépendant de la MT Bench. Nous avons également généré des mutants de TDP-43 mimant soit une déphosphorylation (en substituant des résidus sérine par des résidus alanine) soit une hyper-phosphorylation (en substituant des résidus sérine par des résidus glutamate ou aspartate) dans le domaine CTD de TDP-43 afin d'étudier leurs effets sur l'autoassemblage de TDP-43 et ses fonctions biologiques liées à la régulation de l'ARNm. Nous avons aussi réalisé un criblage de 134 molécules issues d'une librairie d'inhibiteurs de kinases (98 molécules) et d'inhibiteurs

de phosphatases (36 molécules) afin de cibler spécifiquement les autoassemblages de TDP-43 dans le cytoplasme à l'aide du MT bench.

En résumé, ces travaux de thèse avaient pour objectif de caractériser l'impact de la phosphorylation de TDP-43 sur son association réversible (LLPS), sur ses fonctions biologiques ainsi que sur son agrégation pathologique. Plus particulièrement, notre objectif était de rechercher des phénotypes liés à la phosphorylation de TDP-43 afin d'identifier dans un second temps des composés capables de cibler l'autoassociation de TDP-43 dépendante de la phosphorylation de son domaine C-terminal. Les résultats obtenus pourraient ouvrir de nouvelles perspectives pour la conception et le développement de traitements plus efficaces pour la SLA.

Matériel et méthodes

Plusieurs techniques à haute résolution ont été utilisées dont le microscope à haut contenu (HCS) et la méthode du Microtubule Bench (MTbench) pour les expériences de biologie cellulaire. Elles vous seront expliquées en détails dans la partie suivante.

- **Méthodes en Biologie Cellulaire**

- a) Microscope à haut contenu (HCS)

Pour toutes nos expériences, un microscope à haut contenu (*High-Content Screening*, HCS) de chez PerkinElmer (Opera Phenix) a été utilisé. Le microscope automatisé à fluorescence HCS est un système d'imagerie avancé conçu pour l'analyse automatisée et à haut débit de cellules et de tissus. Il permet l'acquisition rapide d'images de haute résolution et la collecte de données multiparamétriques à partir d'un grand nombre d'échantillons biologiques. Tous les avantages liés au microscope HCS sont listés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2- Description des avantages liés au microscope à haut contenu (HCS).

Principaux avantages	Détails
Analyse multiparamétrique	Le HCS permet l'acquisition simultanée de multiples paramètres d'imagerie (intensité de fluorescence, localisation subcellulaire, morphologie cellulaire etc...). Cela permet d'obtenir une vue d'ensemble plus complète des caractéristiques cellulaires et des interactions moléculaires, ce qui peut aider à comprendre les mécanismes biologiques complexes.
Haute résolution et imagerie en temps réel	Le HCS utilise des objectifs de haute qualité et des caméras sensibles pour capturer des images de résolution élevée. Cela permet une visualisation détaillée des structures cellulaires et des marqueurs spécifiques. De plus, le HCS permet l'imagerie en temps réel, ce qui permet d'observer les processus cellulaires dynamiques et les réponses en direct.

Criblage à haut débit	Le HCS est conçu pour le criblage à haut débit, ce qui signifie qu'il permet d'analyser de grandes quantités d'échantillons en peu de temps. Grâce à l'automatisation et à la robotique intégrées, il est possible de traiter des plaques multi-puits ou des échantillons en série de manière rapide et efficace.
Analyse quantitative et statistique	Le HCS est accompagné de logiciels d'analyse puissants qui permettent d'extraire des informations quantitatives à partir des images acquises. Ces logiciels peuvent effectuer des analyses statistiques, générer des profils de distribution, mesurer les intensités de fluorescence, quantifier les caractéristiques morphologiques, etc... Cela facilite l'analyse comparative, l'identification de phénotypes spécifiques et l'évaluation de l'efficacité des traitements.
Exploration de la diversité cellulaire	Le HCS permet d'étudier la diversité cellulaire au sein d'une population. Il peut être utilisé pour détecter les variations de réponses cellulaires, les sous-populations cellulaires spécifiques et les phénotypes rares. Cela peut être particulièrement utile dans le contexte de la recherche sur le cancer, la biologie du développement, la médecine régénérative etc...
Réduction des erreurs expérimentales	L'automatisation du HCS réduit la dépendance aux manipulations manuelles, ce qui minimise les erreurs expérimentales et améliore la reproductibilité des résultats. De plus, la possibilité de capturer des images en temps réel permet de suivre les réponses cellulaires en direct, réduisant ainsi les risques d'interprétation erronée ou de biais.

Ces avantages font du microscope HCS, une méthode précieuse pour la recherche biomédicale, le criblage de médicaments, la biologie cellulaire et de nombreux autres domaines de la science. Il permet une analyse minutieuse des échantillons biologiques, offrant ainsi une compréhension plus détaillée des mécanismes cellulaires.

b) Méthode du *Microtubule bench* (MT bench)

i. Description

La séparation de phase des RBPs est considérée comme le mécanisme à l'origine de la formation des MLO dans les cellules (Mitrea et Kriwacki, 2016). Cependant, il est nécessaire d'analyser leur distribution spatiale respective afin de décrypter les mécanismes sous-jacents à la compartimentation (Feric et al., 2016 ; West et al., 2016). La plupart des études récentes sont basées sur la reconstitution *in vitro* des LLPS, qui nécessite souvent des modifications substantielles des RBPs pour assurer leur solubilité. Par conséquent, il est nécessaire de développer de nouvelles approches pour sonder la compartimentation des protéines dans un contexte cellulaire. Pour y répondre, une technique innovante a été développée par le laboratoire SABNP (INSERM U1204). Il s'agit du Microtubule bench (MT bench), dont le brevet est actuellement détenu par la start-up SynSight (#EP17306008.8), une plateforme de criblage à haut débit automatisée. Cette méthode utilise le réseau de microtubules comme nanoplateforme pour détecter la séparation de phase de deux protéines dans les cellules (ou assemblages réversibles). Il s'agit donc d'une technique *in situ*, qui permet d'analyser des signaux de fluorescence en concentrant les protéines sur les microtubules. Le principe du MT bench est simple (**Figure 28**), une ou deux protéines sont confinées sur les microtubules des cellules par fusion à un domaine de liaison aux microtubules (*Microtubule Binding Domain*, MBD). De plus, les protéines sont étiquetées avec un tag fluorescent rouge (RFP) ou vert (GFP). À la suite de leur confinement sur les microtubules, le processus LLPS (ou la compartimentation) est visualisée et peut-être quantifiée en analysant la corrélation spatiale (R^2) entre les signaux de fluorescences le long des filaments de microtubules. On peut ainsi facilement observer l'auto-association réversible de la protéine TDP-43 avec une autre copie de TDP-43 comme ce qu'il se passe dans les condensats biomoléculaires. On peut éventuellement analyser le processus LLPS de TDP-43 en interaction avec des partenaires protéiques tels que G3BP1 ou HuR (ELAV-like protein 1).

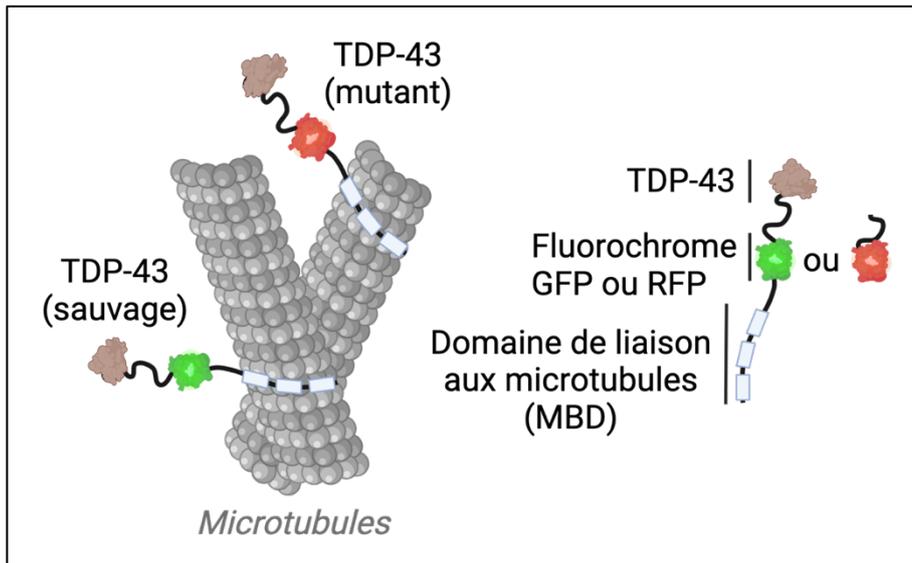


Figure 28- Schéma du principe de la méthode du Microtubule bench

Le MT bench est donc une méthode biophysique unique pour analyser la formation de compartiments de type liquide de TDP-43 et la miscibilité (auto-association) de la forme normale de TDP-43 avec une forme de TDP-43 portant des mutations afin de détecter si des mutations pathologiques altèrent les assemblages d'ordre supérieur de TDP-43. En plus de la visualisation de leur compartimentation sur les microtubules, des paramètres quantitatifs reflétant leur miscibilité relative peuvent être facilement obtenus en analysant la corrélation spatiale entre les signaux de fluorescence le long des filaments de microtubules (score d'auto-association R^2 ou « mixing score » en anglais)

Une autre version du MT bench appelée Proie/Appât (Bait/Prey) consiste en l'ajout d'une protéine proie conjuguée à un fluorochrome et à un MBD ainsi qu'une protéine appât libre conjuguée uniquement à la protéine fluorescente. Cette technique permet aussi de mettre en évidence une interaction entre les deux protéines. Par exemple, si les deux protéines interagissent, directement ou indirectement, la protéine libre co-localisera avec celle fixée sur les microtubules, montrant un signal de fluorescence jaune, dans le cas contraire, on aura des signaux distincts vert et rouge le long du réseau de microtubules avec un signal de fluorescence plus marquée pour la protéine possédant un MBD.

ii. Avantages et inconvénients

De nombreuses techniques existent pour explorer la condensation des RBPs afin de comprendre les mécanismes de la compartimentation, qui semblent être dérégulés dans la pathologie. Cependant, il existe de nombreux inconvénients. Pour le test PLA (*Proximity ligation assay*) par exemple, il est nécessaire que les cellules soient fixées pour détecter une colocalisation et il est important d'avoir des anticorps spécifiques des protéines d'intérêts. Pour le FRET (*Fluorescence Resonance Energy transfer*), un équipement spécifique est nécessaire et le signal FRET dépend fortement de la distance et de l'orientation entre les molécules donneuses et acceptrices. Quant au MT bench, il présente de nombreux avantages (**Tableau 3**). Les seuls points limitants de cette méthode que nous pouvons soulever, est qu'elle nécessite la production de plasmides et de grandes quantités de ces plasmides pour être compatible avec le microscope HCS. Une fois ce travail réalisé, le MT bench se révèle très efficace pour sonder des contacts protéine-protéine. De plus, la présence du MBD dans les protéines affectent leur localisation subcellulaire naturelle qui peut devenir un avantage. En effet, elle permet ainsi d'étudier des comportements dans le cytoplasme, qui est aussi le lieu de l'agrégation de TDP-43 dans la SLA.

Tableau 3- Avantages de la technique du Microtubule bench.

Avantages	Détails
La géométrie des microtubules	La surface offerte par les microtubules est très grande, ce qui empêche la saturation des protéines dans la plupart des cas. Ainsi, l'interaction des protéines sur ces structures peut être facilement distinguée dans le cytoplasme de la cellule et devrait permettre un schéma de détection très sensible.
Contexte physiologique et dynamique	Les interactions sont détectées <i>in situ</i> , ce qui permet de conserver un processus dynamique, qui est important pour les RBP qui possèdent elles-mêmes des propriétés liquides et dynamiques. Malgré leur confinement sur les microtubules, les protéines restent mobiles.

Détection sensible et spécifique des protéines	Les protéines étudiées sont étiquetées avec un fluorochrome GFP ou RFP et la structure des microtubules est favorable à une détection fine et très sensible de la fluorescence émise par ces protéines.
Analyse de la séparation de phase spatiale de n'importe quel couple de protéines	Le laboratoire SABNP a déjà démontré que cette méthode fonctionne avec des RBPs nucléaires et que leur fusion au MBD ne perturbe pas leur liaison à l'ARNm (Boca et al., 2016).
Détermination de l'impact de mutations sur l'autoassemblage de TDP-43	Permet de mesurer l'interaction entre les protéines indépendamment de leur localisation naturelle ou de leur abondance dans la cellule.
La présence d'ARNm et l'interaction avec l'ARNm peut être étudiée	Il suffit de réaliser une hybridation <i>in situ</i> sur les cellules
Méthode compatible avec le microscope HCS et automatisé	Les protéines étiquetées avec des fluorochromes sont facilement observables avec un microscope à fluorescence classique ou HCS. Des scripts automatiques peuvent être réalisés pour analyser le score de miscibilité et la colocalisation entre les 2 protéines. De plus, elle peut être compatible avec du criblage de molécules à haut débit.

Résultats

La rétention nucléaire de TDP-43 est antagonisée par son autoassemblage dans le cytoplasme, qui dépend de l'état de phosphorylation de son domaine C-terminal

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative grave caractérisée par la dégénérescence des motoneurones. Une caractéristique fréquemment observée dans la SLA est la formation d'agrégats de la protéine TDP-43, qui joue un rôle central dans la pathologie de la maladie. TDP-43 est une protéine essentielle impliquée dans la régulation de nombreux processus liés au métabolisme de l'ARN dans les cellules. Dans les régions cérébrales touchées par la SLA, TDP-43 subit une série de changements progressifs, notamment une déplétion nucléaire, une délocalisation dans le cytoplasme, une mauvaise conformation, des modifications post-traductionnelles (MPT), une auto-association aberrante (LLPS), et l'assemblage en structures pathologiques distinctes avant de former des inclusions. On pensait auparavant que l'accumulation de TDP-43 dans le cytoplasme était le principal facteur de toxicité neuronale et de dysfonctionnement dans la SLA. Cependant, il a été observé que la perte de TDP-43 normal dans le noyau des cellules pouvait également contribuer à la neurodégénérescence, même en l'absence d'inclusions de TDP-43 dans le cytoplasme. Parmi les modifications post-traductionnelles (MPT) pathologiques associées à la SLA, la phosphorylation de certaines sérines C-terminales de la protéine TDP-43, en particulier les sérines S409/410, est une signature significative de la maladie. Cette modification semble être associée à la mauvaise localisation de TDP-43 dans le cytoplasme et à la formation d'agrégats toxiques de la protéine TDP-43 dans les neurones. Cependant, les mécanismes précis à l'origine de ces modifications et de l'agrégation de TDP-43 restent encore mal compris.

Ainsi, mes travaux de recherche ont pour objectif d'élucider les mécanismes sous-jacents à l'autoassemblage de TDP-43 et à l'agrégation pathologique en relation avec sa phosphorylation, en vue d'identifier des inhibiteurs de kinases et de phosphatases pouvant moduler les autoassemblages cytoplasmiques de TDP-43.

Pour résoudre ces questions, nous avons développé une approche automatisée utilisant l'imagerie à haut contenu (HCS) que nous avons combiné avec la méthode du Microtubule Bench (MTbench) afin de quantifier les autoassemblages cytoplasmiques de TDP-43 en fonction de l'état de phosphorylation de son domaine CTD. Notre modèle scientifique montre que la forme hypo-phosphorylée de TDP-43 favorise son autoassemblage dans le cytoplasme, ce qui induit une perturbation de son import dans le noyau. Nous avons également identifié des inhibiteurs potentiels de kinases et de phosphatases qui modifient ces autoassemblages, de manière phospho-dépendante.

En résumé, nos résultats indiquent que les inhibiteurs de kinases sélectionnés ont un effet négatif sur l'importation nucléaire de TDP-43, conduisant à son accumulation dans le cytoplasme. Par conséquent, il semble que les inhibiteurs de phosphatases pourraient être plus pertinents du point de vue thérapeutique pour la SLA, en préservant la localisation nucléaire de TDP-43. Pour la présentation de mes travaux de thèse, j'ai subdivisé mes résultats de recherche en 7 parties. Ces travaux ont fait l'objet d'un article qui a été soumis pour publication (inséré à la fin de ce chapitre).

1. Développement d'une approche automatisée *in cellulo* afin de quantifier l'impact de la phosphorylation sur les autoassemblages de TDP-43

Dans cette étude, nous avons développé une nouvelle approche automatisée dans les cellules HeLa afin de quantifier les autoassemblages phospho-dépendants de TDP-43. Notre approche se base sur une technologie déjà brevetée par le laboratoire appelée le Microtubule Bench (MTbench), et qui permet de reconstituer *in cellulo* les autoassemblages réversibles de la protéine TDP-43, en utilisant le réseau de microtubules des cellules HeLa comme nanoplateformes. Cette technique repose sur la variation de miscibilité entre deux protéines sur les microtubules, par exemple une forme sauvage et une forme mutée de TDP-43 afin d'étudier l'impact de mutations sur les

autoassemblages de TDP-43. Afin d'automatiser notre approche, nous avons combiné le MTbench à de la microscopie à haute résolution HCS. Notre méthode est sensible, puisqu'elle permet de détecter des altérations dans la miscibilité de TDP-43 de type sauvage avec des mutants hypo- ou hyper-phosphomimétiques.

2. Impact de la phosphorylation sur l'autoassemblage de TDP-43

Afin de valider l'approche *in cellulo* automatisée, nous avons étudié l'effet des mutants phosphomimétiques sur les autoassemblages de TDP-43. Nous avons constaté que les formes hypo- et hyper-phosphorylées altèrent significativement les autoassemblages de TDP-43. Étant donné que nous n'avons pas observé de différence entre les deux formes, nous avons cherché des différences dans le profil de distribution/compartimentation des mutants le long des microtubules. Nous avons observé une diminution de la densité des compartiments pour la forme hyper-phosphorylée tandis que l'inverse a été observé pour la forme hypo-phosphorylée. Ces résultats suggèrent que l'hyper-phosphorylation C-terminale de TDP-43 diminue les autoassemblages cytoplasmiques alors que la forme hypo-phosphorylée augmentent les autoassemblages cytoplasmiques.

3. Effets de la phosphorylation sur la localisation subcellulaire de TDP-43 et l'épissage de son ARNm cible CFTR

Une fois notre approche automatisée validée, nous avons exploré l'impact de la phosphorylation C-terminale de TDP-43 sur sa distribution subcellulaire dans les cellules HeLa. Nos résultats indiquent une distribution subcellulaire différentielle selon la nature du mutant phosphomimétique utilisé. La forme hyper-phosphomimétique de TDP-43 est retenue dans le noyau tandis que la forme hypo-phosphomimétique de TDP-43 s'accumule dans le cytoplasme. Nous avons également examiné l'effet de la phosphorylation de TDP-43 sur l'activité d'épissage de son pré-ARNm cible CFTR. Nos résultats montrent que les mutants phosphomimétiques n'ont pas restauré complètement l'excision de l'exon 9 de CFTR par rapport à la forme sauvage de TDP-43. Ces données suggèrent que les événements d'hypo et d'hyper-phosphorylation dans le

domaine C-terminal de TDP-43 peuvent influencer la régulation de l'épissage de l'ARNm CFTR dans le noyau.

4. Impact de la phosphorylation sur la formation d'agrégats de TDP-43 en réponse au stress oxydatif

Nous avons ensuite étudié l'impact de la phosphorylation sur le recrutement de TDP-43 (sauvage ou mutée) dans les GS en réponse à différents types de stress (stress oxydant léger ou aigu). Nos résultats indiquent que sous des conditions de stress oxydatif léger, les mutants hypo- et hyper-phosphorylés sont efficacement recrutés dans les GS. Cependant, en présence d'un stress oxydant aigu de type arsénite, seul le mutant hyper-phosphorylé n'est plus recruté dans les GS. Pour expliquer ces résultats, nous avons constaté une perte drastique de la liaison entre la forme hyper-phosphorylée et l'ARNm en conditions de stress aigu, alors que la forme hypo-phosphorylée maintient sa liaison avec l'ARNm. Ces données supportent l'hypothèse selon laquelle le mutant hyper-phosphorylé favorise les contacts intermoléculaires entre les domaines RRM et ainsi la perte de liaison avec l'ARNm et le non-recrutement du mutant dans les GS. Ces résultats montrent que l'état de phosphorylation du domaine C-terminal influence le recrutement de TDP-43 dans les GS en fonction du type de stress oxydant.

5. Identification d'inhibiteurs de kinases et de phosphatases ciblant spécifiquement les autoassemblages cytoplasmiques de TDP-43, dépendant de la phosphorylation de son domaine C-terminal

Une fois que nous avons caractérisé des phénotypes associés à la phosphorylation de TDP-43, nous avons entrepris de corriger l'impact négatif de la phosphorylation avec des petites molécules. Pour cela, nous avons choisi à partir d'une librairie commerciale, 134 composés dont 99 inhibiteurs de kinases et 36 inhibiteurs de phosphatases. Notre premier objectif était d'étudier l'effet des 134 inhibiteurs sur les autoassemblages phospho-dépendants de TDP-43 (le couple mutant hyper-phosphorylé/forme sauvage de TDP-43), en utilisant l'approche automatisée précédemment validée. Ce premier test de criblage nous a permis d'identifier 16 composés hits dont 14 inhibiteurs de kinases et

2 inhibiteurs de phosphatases. On a observé des effets opposés pour les deux types d'inhibiteurs : les inhibiteurs de kinases identifiés ont significativement réduit l'autoassociation entre la forme sauvage et la forme mutée de TDP-43 tandis que les inhibiteurs de phosphatases identifiés ont eu l'effet inverse.

6. Effets des inhibiteurs identifiés sur la distribution subcellulaire de TDP-43 sauvage

Nous avons ensuite entrepris d'explorer l'effet des composés identifiés sur la distribution subcellulaire de la forme sauvage de TDP-43. Pour cela, nous avons réalisé un autre test de criblage avec 11 inhibiteurs de kinases et 2 inhibiteurs de phosphatases. Nos résultats montrent que 7 des 11 inhibiteurs de kinases ont significativement augmenté les niveaux cytoplasmiques de la protéine TDP-43. En revanche, les inhibiteurs de phosphatases ont augmenté les niveaux nucléaires de TDP-43. Ces résultats ont également été observés dans une lignée de type neuronale NSC-34. Ils suggèrent que les inhibiteurs de kinases identifiés, qui diminuent les autoassemblages phospho-dépendants de TDP-43, ont également tendance à augmenter les niveaux cytoplasmiques de TDP-43. Ce phénotype est d'ailleurs similaire à celui obtenu pour la forme hypo-phosphorylée de TDP-43 qui a tendance à être accumulée dans le cytoplasme. En revanche, les inhibiteurs de phosphatases ont été soit inactifs ou soit régulé négativement le niveau cytoplasmique de TDP-43. Ces résultats reproduisent le phénotype observé pour la forme hyper-phosphorylée de TDP-43.

7. Effets des inhibiteurs identifiés sur la capacité de recrutement de TDP-43 sauvage dans les granules de stress et sur l'activité d'épissage de son ARNm cible *CFTR*

Nous avons ensuite analysé l'effet des composés identifiés sur la capacité de recrutement de la forme sauvage de TDP-43 dans les GS, en conditions de stress aigu ou de stress léger. Nous avons constaté des variations avec les inhibiteurs sélectionnés mais nous n'avons pas observé de corrélation claire avec les résultats obtenus correspondants à l'autoassociation de TDP-43 dans le cytoplasme. Ces variations

inattendues suggèrent que ces composés pourraient influencer le recrutement de TDP-43 dans les GS indépendamment des mécanismes liés à l'autoassemblage de TDP-43 contrôlé par l'état de phosphorylation de son domaine C-terminal dans le cytoplasme. Nous avons aussi recherché si les composés sélectionnés altéraient les fonctions nucléaires de TDP-43 notamment son activité d'épissage de l'ARNm cible CFTR. De manière similaire, certains composés ont affecté l'activité d'épissage contrôlé par la forme sauvage de TDP-43, mais nous n'avons pas obtenu de corrélation claire avec les résultats obtenus sur l'autoassociation de TDP-43. Ces résultats suggèrent que les composés sélectionnés pour leur capacité à moduler les autoassemblages cytoplasmiques de TDP-43 ne semblent pas montrer une corrélation claire avec les événements d'épissage de l'ARNm qui ont lieu dans le noyau.

8. Effets des inhibiteurs identifiés sur l'agrégation de la protéine mutante G146A

Nous avons ensuite exploré comment les molécules sélectionnées influençaient l'agrégation de TDP-43 en utilisant le mutant G146A de TDP-43 qui est affecté dans sa liaison coopérative à l'ARNm riche en GU (Rengifo-Gonzalez et al., 2021). Nos résultats démontrent que les deux inhibiteurs de phosphatases identifiés ont significativement diminué la formation d'agrégats du mutant G146A, l'inverse est observé avec les inhibiteurs de kinases identifiés. Il est intéressant de noter que certains inhibiteurs de kinases qui augmentent l'agrégation du G146A, augmentent aussi l'enrichissement en ARNm dans les agrégats riches en G146A, contrairement aux inhibiteurs de phosphatases. Ce résultat est en accord avec une plus grande affinité du mutant hypophosphomimétique pour l'ARNm, tel qu'observé précédemment.

9. Effets des inhibiteurs identifiés sur l'importation nucléaire de TDP-43 sauvage

Nous avons également examiné comment les composés identifiés affectaient la distribution de la protéine TDP-43 dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules.

Nous avons constaté que les inhibiteurs de kinases sélectionnés empêchaient l'importation nucléaire de TDP-43 cytoplasmique, suggérant un mécanisme potentiel de régulation de la localisation subcellulaire de TDP-43.

Résumé des résultats : Mes travaux de thèse ont permis l'élaboration d'un modèle dans lequel l'hypo-phosphorylation C-terminale de TDP-43 ou l'action des inhibiteurs de kinases favorisent les autoassemblages cytoplasmiques de la protéine perturbant ainsi son import nucléaire. L'inverse est observé avec la forme hyper-phosphorylée de TDP-43 et les inhibiteurs de phosphatases identifiés.

Conclusion : Cette étude met en évidence l'importance de la phosphorylation de TDP-43 dans son autoassemblage et suggère que la diminution de l'autoassemblage du domaine C-terminal de TDP-43 dans le cytoplasme par des approches thérapeutiques est à priori pertinente pour favoriser la localisation nucléaire de TDP-43 et limiter son agrégation toxique dans le cytoplasme.

TDP-43 nuclear retention is antagonized by phosphorylation dependent self- assembly of its C-terminus in the cytoplasm

Célia Rabhi^{1,2}, Nicolas Babault³, Céline Martin², Bénédicte Desforges¹, Alexandre Maucuer¹, Vandana Joshi¹, Guillaume Bollot³, Revital Rattenbach², David Pastré^{1,#}, Ahmed Bouhss^{1,#}

¹ Université Paris-Saclay, INSERM U1204, Univ Evry, Structure-Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques (SABNP), Evry-Courcouronnes, France.

² 4P-Pharma, campus Pasteur Lille, 59000 Lille, France.

³ SYNSIGHT, Evry, France.

Co-corresponding authors: david.pastre@univ-evry.fr and ahmed.bouhss@univ-evry.fr.

ABSTRACT

Protein aggregation is a hallmark of many neurodegenerative disorders, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS), in which TDP-43, a nuclear RNA-binding protein, forms cytoplasmic inclusions. Here, we have developed a robust and automated method to assess protein self-assembly in the cytoplasm using microtubules as nanoplateforms. Importantly, we have analyzed specifically the self-assembly of full-length TDP-43 and its mRNA binding that are regulated by the phosphorylation of its self-adhesive C-terminus, which is the recipient of many pathological mutations. We show that C-terminus phosphorylation prevents the recruitment of TDP-43 in mRNA-rich stress granules only under acute stress conditions because of a low affinity for mRNA but not in mild stress. In addition, the self-assembly of the C-terminus is negatively regulated by phosphorylation in the cytoplasm which in turn promotes TDP-43 nuclear import. We anticipate that reducing TDP-43 C-terminus self-assembly in the cytoplasm may be an interesting strategy to reverse TDP-43 nuclear depletion in neurodegenerative diseases.

INTRODUCTION:

TDP-43 is an RNA-binding protein expressed in all human tissues that mainly participates in nuclear functions associated with mRNA processing (1, 2). TDP-43 exhibits a long self-adhesive domain of low complexity (LCD) in its C-terminus that allows the formation of reversible cellular compartments with liquid-like properties (3-5). Additional contributions also come from its structured self-associating N-terminal domain (6) and the cooperative association of its two RNA-recognition Motifs (RRM-1 and -2) to GU-rich repeats (3, 7). TDP-43 is involved in certain neurodegenerative diseases such as ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis) and FTLN (Frontotemporal Lobar Degeneration) (8, 9). Indeed, both the identification of pathological mutations, notably in the unstructured C-terminal domain of TDP-43, and the occurrence with which TDP-43 forms cytoplasmic inclusions in the affected neurons explain the particular interest of the scientific community in this RNA-binding protein (7, 10). Accordingly, TDP-43 is considered a major target with the aim of preventing its cytoplasmic aggregation (11) or restoring its nuclear location (12-14). These two aims are intertwined since TDP-43-rich cytoplasmic inclusions deplete the pool of nuclear TDP-43, which in turn prevents TDP-43 self-regulation of its own expression (15, 16). A decreased concentration of nuclear TDP-43 may thus induce a toxic feedforward mechanism to generate additional TDP-43-rich cytoplasmic inclusions. TDP-43 aggregation is thought to take place after an aberrant transition from a liquid- to solid-like state in TDP-43 condensates (17), which is promoted by pathological mutations in the self-adhesive C-terminal domain of TDP-43 (18). The formation of solid-like TDP-43 aggregates can be prevented by the presence of RNA in the nucleus, which acts as a chaperone (17, 19), notably, in the case of TDP-43, by binding to GU-rich sequences (20). In addition, protein chaperones such as heat shock proteins can also contribute to preserve the reversibility of TDP-43 condensate (21-23). Besides RNA and protein chaperones, TDP-43 solubility may be preserved by posttranscriptional modifications, notably phosphorylation (24, 25). In this study, we focus our attention on multiple phosphorylation sites located in the C-terminal domain of TDP-43, which regulate the capacity of TDP-43 to form liquid-like compartments (26).

The role of TDP-43 phosphorylation in its cytoplasmic location and aggregation remains a matter of debate. TDP-43 phosphorylation has been associated with the presence of TDP-43 in the cytoplasm and the formation of inclusions (27-30), with the detection of phosphorylated TDP-43 in cytoplasmic aggregates identified in affected neurons (31, 32). Consistently, the activity of the kinase CK1 and phosphomimetic mutants were reported to increase the presence of TDP-43 in the cytoplasm (33, 34). Phosphorylation can thus be considered as a driver of TDP-43 nuclear translocation and of its cytoplasmic aggregation. However, in affected neurons, these phosphorylation events may occur downstream of TDP-43 aggregation and its truncation (35). In addition, in other studies, multiple TDP-43 phosphorylation sites in the C-terminal domain prevented TDP-43 to form aggregates (28). The formation of liquid droplet *in vitro* was also impaired with phosphomimetic mutants compared to wild-type TDP-43 (26). Therefore, TDP-43 C-terminus phosphorylation may as well antagonize TDP-43 aggregation by decreasing its propensity to form liquid droplets. In keeping with the latter hypothesis, the recruitment of TDP-43 in stress granules can be inhibited by the hyperphosphorylation of TDP-43 C-terminus (26), and/or TDP-43 phosphorylation can be prevented by the recruitment of TDP-43 in stress granules (36). Stress granules are cytoplasmic mRNA-rich liquid-like condensates that are formed in response to a large variety of cellular stress. The recruitment of TDP-43 into mRNA-rich stress granules may provide a mean to keep cytoplasmic TDP-43 soluble, notably by preserving TDP-43 interaction with mRNA (17, 36). However, this model is still debated since stress granules can be considered

as crucibles to promote TDP-43 aggregation (37-39). In summary, no real consensus has been reached on the consequences of TDP-43 phosphorylation on its subcellular distribution and the formation of TDP-43 cytoplasmic inclusions.

Here we develop a new approach based on an entirely automated analysis of single cells at high resolution using a confocal HCS imager. The HCS imager also operates in confocal mode at high-resolution with water immersed lenses. High resolution enabled us to score TDP-43 self-assemblies controlled by the phosphorylation of the C-terminal domain in the cytoplasm using microtubules as nanoplatforms (MT bench assay (7, 40)). After validation with phosphomimetic controls, we demonstrated the ability of our method to quantify TDP-43-specific assemblies by detecting the aggregation of TDP-43 under arsenite stress (41, 42). While TDP-43 hyper-phosphomimetic mutants are not recruited in stress granules during acute stress (26, 39), we did measure a significant recruitment of TDP-43 hyper-phosphomimetic mutants after mild stress. Our results indicate that intermolecular interactions involving RRM domains, most likely through disulfide cysteine bridges or acetylation of Lysine residues (41, 42), prevent the recruitment of TDP-43 hyper-phosphomimetic mutants in stress granules but only under acute stress conditions. Having demonstrated the potential of our approach, we screened and selected 14 out of 98 kinase inhibitors and 2 out of 36 phosphatase inhibitors that significantly modulate the phosphorylation-dependent TDP-43 self-assembly when comparing wild-type TDP-43 mixing with TDP-43 hyper- or hypo-phosphomimetic protein mutants. We then revealed that TDP-43 hypo-phosphomimetic mutants and selected kinase inhibitors negatively regulate TDP-43 nuclear retention, which may be considered as a negative contribution in TDP-43 pathologies (14, 43-45). Interestingly, kinase and phosphatase inhibitors, respectively, increase and decrease the cytoplasmic condensation of a TDP-43 mutant (G146A) which is defective in its cooperative association to GU-rich mRNA (42). Altogether, our stringent large-scale screen and functional cellular assays enabled the identification of three kinase and two phosphatase inhibitors that target phosphorylation-dependent TDP-43 self-assembly. We also established that the phosphorylation-dependent self-assembly of the C-terminal domain is critical to keep TDP-43 in the nucleus of HeLa cells and of a mouse motor neuron cell line (NCS-34). Together, our data provide the basis for further investigations into how TDP-43 phosphorylation may interfere with pathological mutations identified in the C-terminus of TDP-43 and whether interfering with TDP-43 self-assembly in the cytoplasm may correct the negative impact of TDP-43 pathological mutations.

RESULTS:

An automated pipeline to detect phosphorylation-dependent TDP-43 self-assembly in the cytoplasm.

Various screens have been implemented to detect how small molecules can interfere with liquid-liquid phase separation (LLPS) of RNA-binding proteins or stress granule formation (46, 47). In addition, TDP-43-centered studies have also focused on identifying small compounds to alter the recruitment of TDP-43 in stress granules (37) or RNA recognition (48). However, even if the role of TDP-43 phosphorylation is recognized as essential for its physiological mRNA-related functions or its pathological aggregation (35), though with opposite views, large-scale studies aiming at identifying kinase and phosphatase inhibitors are scarce (49). Here,

we opted for a screen based on the self-assembly of TDP-43 in the cytoplasm, whose loss of reversibility contributes to the formation of TDP-43-rich inclusions in the cytoplasm. It also promotes the loss of TDP-43 nuclear functions. To identify specific kinase or phosphatase inhibitors, our approach detects a variation of miscibility between wild-type TDP-43 and a hyper- or hypo-phosphomimetic mutant in the cytoplasm. To this end, we use a new technology, the MT bench (40), to measure the mixing/de-mixing of two proteins brought onto the microtubule network in cells by fusing them to a microtubule-binding domain (MBD). In addition, the two proteins are either RFP- or GFP-labeled to distinguish them from each other (Figure 1a, Table S1). The approach also utilizes fully automated robots for cell manipulation and drug molecule handling, as well as automatic acquisition/analysis of high-resolution images in confocal mode in 96-well plates (Figure 1c, Figure 2a and b and Materials and Methods). We have already validated this approach in the case of TDP-43 by detecting the formation of mRNA-rich reversible compartments along the microtubule network (40). The sensitivity of our method enables to detect whether single mutations interfere with the mixing of wild-type TDP-43 (7). To undertake our analysis, we measured the mixing/de-mixing of wild-type TDP-43 with hypo- or hyper-phosphomimetic mutants, which contain several serine substitutions for alanine or glutamic acid residues in the C-terminal domain of TDP-43 similar to those used in a previous study (26) (Figure 1b). However, though our assay is specific to C-terminus-dependent TDP-43 self-assembly, we cannot distinguish whether kinase inhibitors directly change the phosphorylation status of TDP-43 C-terminus or regulate the mixing with TDP-43 phosphomimetic by an indirect mechanism (for instance by acting on chaperone protein activity, RNA helicase activity, mRNA translation, etc.).

Both hyper- and hypo-phosphomimetic mutants significantly de-mix with wild-type TDP-43, but in different ways.

To explore whether TDP-43 phosphorylation interferes with self-assembly in the cytoplasm, we generated several full-length hyper- and hypo-phosphomimetic TDP-43 mutants (Figure 1b, Tables S2 to S4). Phosphomimetic mutants are useful for mimicking TDP-43 phosphorylation in the C-terminus, although multiple mutations can change the structure and behavior of the C-terminus compared to native phosphorylation. Nevertheless, these mutations modify the biophysical properties of the C-terminus and prevent its modification by kinases or phosphatases. Thus, phosphomimetic mutants can be used to screen kinase and phosphatase inhibitors that regulate the higher order assembly of TDP-43 through its unstructured self-adhesive C-terminus. To determine the extent to which phosphomimetic mutants can mimic native TDP-43 phosphorylation, HeLa cells expressing phosphomimetic mutants were stained with an anti-phospho TDP-43 antibody (Ser 409/410). In contrast with the hypo-phosphomimetic mutants, the anti-phospho TDP-43 antibody clearly recognizes hyper-phosphomimetic mutants (18E, 12E) when residues 409/410 were included among the mutated residues, but not when absent (5E) (Figure 2d and e, and Supplementary Figure 1c). This result suggests that the phospho-epitope is strongly mimicked by the hyper-phosphomimetic mutant, in agreement with a previous report (50). We also investigated whether the recognition of the phosphomimetics is still observed if serine residues were mutated into aspartate residues (D) instead of glutamic acid residues (E) (Supplementary Figure 1c).

Using the MT bench assay, we then explored whether phosphorylation in the C-terminus regulates TDP-43 self-assembly, as found *in vitro* (26). After confirming the mixing of wild-type TDP-43 with itself or its de-mixing with two RNA-binding proteins that do not interact with wild-type TDP-43 (HuR and G3BP1, Figure 2b and Supplementary Figure 5a), we measured the mixing of wild-type TDP-43 with several hypo- or hyper-phosphomimetics targeting the C-terminal domain in HeLa cells (Figure 2c). We observed a de-mixing of wild-type TDP-43 with both the hypo- and hyper-phosphomimetic mutants (Figure 2b, d). Importantly, the hyper- and hypo-phosphomimetic mutants generated two different compartments on microtubules that, accordingly, strongly de-mixes with each other (Supplementary Figure 2). The hyper-phosphomimetic mutant (18E) generated less dense compartments than those of the hypo-phosphomimetic mutant (18A) (Supplementary Figure 2), supporting the decrease in TDP-43 self-assemblies upon phosphorylation of the C-terminal domain (26). Additionally, we measured the de-mixing of different phosphomimetic mutants with wild-type TDP-43 (Figure 2d). As expected, the hyper- and hypo-phosphomimetic mutant containing the most mutations, 18E and 18A, respectively, induced the strongest de-mixing with wild-type TDP-43. Interestingly, hypo-phosphomimetic mutations downstream of the RRM2 (5A) did not induce any significant de-mixing with wild-type TDP-43, unlike the 5E mutant bearing the respective hyper-phosphomimetic mutations. It is possible that the serine residues mutated in 5A/5E proteins are dephosphorylated in wild type TDP-43 under our experimental conditions.

Hyper-phosphomimetic mutations hinder TDP-43 translocation and TDP-43-related mRNA splicing.

Having validated the use of phosphomimetic mutants for the MT bench assay, we considered functional assays as complementary screens to increase the stringency of compound selection. Using HA-tagged phosphomimetic mutants, we sought putative phenotypes that could be associated with TDP-43 phosphorylation, including TDP-43 translocation, recruitment in stress granules, condensation in the cytoplasm, and nuclear mRNA splicing in HeLa cells (Figure 1d). We noticed that 24 hours after transfection, hypo-phosphomimetic mutants strikingly accumulated in the cytoplasm, while hyper-phosphomimetic mutants remained in the nucleus"even more than wild-type TDP-43 (Figure 3a). The results were surprising since similar mutations did not affect the subcellular location of TDP-43 in a previous report(26). Puzzled about this discrepancy, we further tested the dynamics of the nucleocytoplasmic shuttling of wild-type and mutant TDP-43. To this end, we chose to use actinomycin D (ActD) to stop transcription and subsequently promote the translocation of TDP-43 in the cytoplasm (43), which may be less intrusive than using hormone-inducible nuclear export assay requiring TDP-43 fusion with a hormone-binding domain (26). We also increase the time after transfection prior to ActD treatment (48 hours instead of 24 hours) which led to an increased presence of wild-type TDP-43 in the cytoplasm (43). In contrast the subcellular distribution of the hyper- and hypo-phosphomimetics mutants (18E, 18A) remained unchanged (Figure 3b and c). As some of the phosphomimetic mutants tested also included mutations in a short conserved region (a.a. 316-346) that possibly adopts an α -helix secondary structure to form weak homo- oligomeric contacts that could promote TDP-43 condensation(18), we also tested whether mutants in which the putative short helix was not mutated behave similarly. Similar results were obtained regarding the subcellular location of TDP-43 mutant (Supplementary Figure 1b). Finally, we also probed whether mutations

into aspartate residues instead of glutamic acid residues would affect the results, but it was not the case (Supplementary Figure 1 b).

We then explored whether phosphomimetic mutations in the C-terminus domain also interfere with TDP-43 nuclear functions. To this end, we used a well characterized splicing reporter in which the presence of an intronic 12 GU repeats recognized by TDP-43 controls the excision of exon 9 in the CFTR gene (51, 52) (Figure 3d, Supplementary Figures 3a and b). We reported only splicing events occurring in a similar windows of mRNA reporter expression (GFP signal) for all the mutants and controls (Supplementary Figure 3c). Using shRNA-treated HEK cells that no longer express TDP-43, we found that expression of shRNA-resistant wild-type TDP-43-HA restored the skipping of exon 9 (Tables S5 and S6), as expected. However, the expression of either HA-tagged hypo- or hyper-phosphomimetic mutants failed to completely restore exon 9 excision, albeit to a greater extent than HuR, an RNA-binding protein used as a negative control (Figure 3d). However, a significant difference in the response of the splicing efficiency was observed in the presence of HA-tagged hypo- or hyper-phosphomimetic mutants (Figure 3d). Our results were consistent with a putative role of the TDP-43 C-terminal domain in CFTR gene splicing (52, 53). To ensure that differences in the subcellular location of TDP-43 mutants at the single-cell level did not bias the results, we also selected cells with very similar nuclear HA-tagged TDP-43 expression at the single-cell level (Figure 3d). Once again, the results suggest that, under our experimental conditions, phosphorylation/dephosphorylation events occurring in the TDP-43 C-terminus domain may contribute to the regulation of CFTR mRNA splicing in the nucleus by differentially regulating TDP-43 self-assembly or its interaction with mRNA splicing partners (53).

TDP-43 hyper-phosphomimetic mutant promotes RRM aggregation during acute oxidative stress, which prevents its recruitment in stress granules but only after acute stress.

To investigate whether TDP-43 phosphorylation controls its recruitment in mRNA-rich stress granules, HeLa cells expressing wild-type or mutated TDP-43 were subjected to arsenite (NaAsO₂) stress (54). Stress granules were detected using an automated pipeline using the HCS imager (Supplementary Figure 4a) and G3BP1-GFP as a marker (55). In our hands, 300 μ M was the lowest arsenite concentration that can induce a robust formation of stress granules in the cytoplasm of a large majority of HeLa cells. Our results showed that TDP-43 hyper-phosphomimetic mutants were not recruited to stress granules, in agreement with a previous report (26). The recruitment of wild-type TDP-43 in stress granules was also impaired, but to lesser extent than the hyper-phosphomimetic mutant (18E), while the recruitment of the hypo-phosphomimetic mutant remained significant (Figure 4a, Supplementary Figure 4b, c). However, under mild oxidative stress conditions such as exposing cells to 300 μ M hydrogen peroxide (H₂O₂) combined to puromycin (56) or simply overexpressing G3BP1 to trigger stress granule assembly (55), an efficient recruitment of TDP-43 hyper-phosphomimetics in stress granules was observed. This result questions whether the level of stress negatively regulates the recruitment of TDP-43 in stress granules. To address this point, we used an elevated concentration of H₂O₂ (1 mM) which nearly totally prevented the recruitment of TDP-43 hyper-phosphomimetic mutants in stress granules, but not that of TDP-43 hypo-phosphomimetic mutant (Supplementary Figure 4d). Of note, the results obtained were similar regardless of whether D or E residues were used to mimic phosphorylation and whether

serine residues in the C-terminus sequence (a. a. 316-346) that could form an α -helix (51) were mutated (Supplementary Figure 1a, mutants 12E and 12D). These data suggest that the non-recruitment of TDP-43 hyper-phosphomimetic mutants in stress granules relies on acute oxidative stress conditions rather than an inherent impossibility of phosphorylated TDP-43 to be recruited in stress granules.

Since stress granules contain non polysomal mRNAs, we considered whether the differential recruitment of TDP-43 mutants in stress granules relies on a differential affinity of TDP-43 mutants for mRNA, which could depend on stress level. To this end, we used an adapted version of the MT bench method, which enables us to detect the binding of endogenous mRNAs to RBPs (57). Briefly, a bait is brought onto microtubules, similar to our approach for measuring the mixing between two different proteins (Figure 1a). Next, we measured the amount of endogenous mRNA recruited onto microtubules by wild-type or mutant TDP-43 used as baits. The quantitative measurements indicate that the ability of TDP-43 hyper-phosphomimetic mutant (18E) to bind to mRNA is significant, though lower than that of wild-type TDP-43 and TDP-43 hypo-phosphomimetic mutant (18A) (Figure 4b). On the other hand, under arsenite stress, we observed a sharp decrease in the recruitment of mRNA with the hyper-phosphomimetic mutant in contrast to the hypo-phosphomimetic mutant, which may explain the non-recruitment of the hyper-phosphomimetic mutant in stress granules upon arsenite exposure. Based on literature, we noticed the possible aggregation of TDP-43 RRMs under oxidative stress conditions (42), which are highly conserved domains that target GU-rich RNA repeats. The aggregation occurs under acute oxidative stress, including arsenite stress, through disulfide cysteine bridges and/or acetylation of lysine residues (41, 42). Therefore, we utilized the MT bench assay to probe the TDP-43 aggregation process after arsenite stress (Supplementary Figure 5 a,b). The de-mixing of TDP-43 with G3BP1 and HuR strongly increased in the presence of arsenite, which may be due to TDP-43 aggregation separately from G3BP1 or HuR. Interestingly, both the hypo- or hyper-phosphomimetic mutants better mixed with wild-type TDP-43 in the presence of arsenite, compared to HuR and G3BP1, which should occur in the case of intermolecular TDP-43 RRM aggregation. Furthermore, we designed an experiment to investigate whether TDP-43 RRMs were specifically involved in this aggregation process. When TDP-43 RRM1/2 fragment were used as baits on microtubules, they failed to recruit TDP-43 hyper- and hypo-phosphomimetic mutants under normal conditions (Supplementary Figure 6a,b). However, under arsenite stress, the hyper-phosphomimetic mutant was recruited onto microtubules, but not the hypo-phosphomimetic mutant.

To further explore this hypothesis without using the MT bench assay, we examined whether GFP-tagged wild-type TDP-43 could be routed out of stress granules upon intermolecular RRM aggregation with a hyper-phosphomimetic mutant after arsenite stress (Figure 4c). In contrast with the hypo-phosphomimetic mutant (18A), GFP-tagged wild-type TDP-43 is indeed not recruited to stress granules in cells co-expressing GFP-tagged wild-type TDP-43 and the HA-tagged hyper-phosphomimetic mutant (18E) (Figure 4c).

Taken together, these results demonstrate the capability of the MT bench assay to evaluate TDP-43 self-assemblies and suggest a higher propensity of TDP-43 hyper- than hypo-phosphomimetic mutants for RRM-mediated aggregation under acute oxidative stress (Figure 4d, Supplementary Figure 6a,b). However, both hypo- and hyper-phosphomimetic mutants bind to mRNA and are recruited in stress granules without environmental oxidative stress (G3BP1 expression) or under mild oxidative stress conditions ($\text{H}_2\text{O}_2 \leq 300 \mu\text{M}$).

Identification of kinase and phosphatase inhibitors that can interfere specifically with TDP-43 self-assembly mediated by the C-terminal domain in the cytoplasm.

To identify inhibitors of kinases or phosphatases that modify the phosphorylation-dependent TDP-43 assembly, we chose to investigate the mixing of wild-type TDP-43 with a hyper-phosphomimetic mutant having the highest number of serine residues mutated into glutamic acid (18E) to cover the maximum range of phosphorylation events. To evaluate the robustness of the MT bench assay, we measured a statistical indicator, the Z' factor, in a 96-well plate (58). When positive and negative controls were set as the mixing between wild-type TDP-43/18E and 18E/18A, respectively, we obtained a Z' factor of 0.57 in our assay (Figure 5a). This value demonstrates that our assay is suitable for screening molecules in a robust manner ($Z' > 0.5$, indicating a very good assay (59); see Materials and Methods). However, when we used wild-type TDP-43/wild-type TDP-43 as a control instead of 18E/18A, we obtained a Z' factor of -0.80 (Supplementary Figure 7a). This result indicates that the detection scheme is more sensitive to compounds that decrease the mixing score of wild-type TDP-43 with 18E, likely kinase inhibitors, than those that increase the mixing score, likely phosphatase inhibitors. Using 18A rather than 18E as a mixing partner with wild-type TDP-43 may be a better option to detect potent phosphatase inhibitors with higher sensitivity. A large-scale primary screen was then performed in HeLa cells with 98 kinase and 36 phosphatase inhibitors at a compound concentration of 10 μ M after a 4-hour incubation period (Table S9). A short incubation time was preferred to limit toxicity but should be sufficient to induce changes in the mixing of wild-type TDP-43 with its phosphomimetic mutants. The results indicate that most of the kinase and phosphatase inhibitors do not significantly impact the mixing score ($p > 0.05$, ANOVA test with quadruplicates). Only 14 kinase inhibitors and 2 phosphatase inhibitors significantly modify the mixing of wild-type TDP-43 with the hyper-phosphomimetic mutant (18E) (Figure 5b,c,d and e). Importantly, kinase inhibitors tend to promote de-mixing with the hyper-phosphomimetic mutant, while phosphatase inhibitors promote mixing (Figure 5c, d and e, $p < 0.01$ for both kinase and phosphatase inhibitor versus control). A differential behavior is expected if the kinase/phosphatase inhibitors respectively decrease/increase the number of phosphorylated serine residues in the C-terminal region or if, on average, kinase and phosphatase inhibitors interfere differently with TDP-43 self-assemblies mediated by the C-terminal domain. Notably, IC261, a kinase inhibitor, was discarded due to a significant microtubule destabilization at 10 μ M (Supplementary Figure 7c). Staurosporine, hypericin and 9,10-Phenanthrenequinone induced significant morphological cellular changes at 10 μ M, indicating that their actions may be at least partly nonspecific (Supplementary Figure 7c). Additionally, among all the selected kinase inhibitors, hypericin unexpectedly decreased the mixing of wild-type TDP-43 with itself, which is unexpected unless changes in cell morphology biased the measurement of the mixing/de-mixing score (Supplementary Figure 7b).

After the primary screen, we studied in detail the 13 out of 14 selected kinase (IC261 was discarded, as indicated above) and the 2 phosphatase inhibitors. We then compared, in two different secondary screens, whether hypo- or hyper-phosphomimetic mutants (18A or 18E) differentially mix with wild-type TDP-43 (Figure 5f). In the case of kinase inhibitors, we observed a better mixing of wild-type TDP-43 with hypo-phosphomimetic than hyper-phosphomimetic mutants (4 kinase inhibitors with significant differences). In contrast, with the two selected phosphatase inhibitors, the mixing of wild-

type TDP-43 was significantly higher with the hyper-phosphomimetic mutant (Figure 5f). Such a differential pattern suggests that the selected kinase inhibitors directly decrease the number of phosphorylated residues in the C-terminus or indirectly interfere with the C-terminus of TDP-43 to better mix wild-type TDP-43 with TDP-43 hypo- than hyper-phosphomimetic mutant, while the trend is opposite in the case of the selected phosphatase inhibitors.

At 1 μM and again with a short incubation time (4 h), only 5 kinase inhibitors still significantly decreased the mixing of 18E with wild-type TDP-43: C16, Ro 31-8220 mesylate, 5-Iodotubercidin, Staurosporine and Hypericin (Supplementary Figure 7d). We also measured the IC₅₀ values of 4 kinase inhibitors with the MT bench assay (Figure 5g). IC₅₀ values ranged from 533 nM to 1279 nM for 3 compounds: 5-Iodotubercidin, C16 and Ro 31-8220 mesylate. JNJ-7706621 is only active at high concentrations with an IC₅₀ value of ~ 2.1 μM .

In contrast to phosphatase inhibitors, selected kinase inhibitors impaired TDP-43 nuclear retention.

To analyze whether the selected molecules interfere with TDP-43 subcellular distribution, we considered 11 kinase inhibitors in detail (ML-9 and BML-259 were no longer studied due to their weak effect on TDP-43 mixing compared to other kinase inhibitors (Figure 5c)) and 2 phosphatase inhibitors. After 4 hours of incubation, strikingly, 7 kinase inhibitors, including the 5 kinase inhibitors still efficient at a 1 μM concentration, significantly modified the subcellular distribution of wild-type HA-TDP-43 expressed in the HeLa cells by promoting the cytoplasmic accumulation of TDP-43. The remaining kinase inhibitors were passive (Figure 6a). In contrast, the 2 phosphatase inhibitors increased TDP-43 nuclear level. As a control, we observed that the 7 active kinase inhibitors that increased TDP-43 cytoplasmic level did not affect the subcellular distribution of the TDP-43 hyper-phosphomimetic mutant (18E) (Figures 6a). We repeated this experiment in a motor neuron cell line (NSC-34) and probe the subcellular distribution of endogenous TDP-43 with an anti-TDP-43 antibody. We also used a lower concentration (3 μM for 4 hours) to prevent cell toxicity. The 3 selected kinase inhibitors still efficient at 1 μM in HeLa cells (Supplementary Figure 7d), Ro 31-8220 mesylate, 5-Iodotubercidin and C16, significantly decreased the nuclear location of endogenous TDP-43 in NSC-34 cells (Figure 6b). On the other hand, Alexidine, one of the two phosphatase inhibitors selected tended to increase TDP-43 nuclear retention. Staurosporine, hypericin, and, 9,10-Phenanthrenequinone, have to be considered with caution for this analysis since they significantly affected NSC-34 cell morphology (Supplementary Figure 7c, d).

These results demonstrate that the kinase inhibitors promoting the de-mixing of wild-type TDP-43 with the hyper-phosphomimetic mutant tend to increase the cytoplasmic level of TDP-43. In contrast, the 2 phosphatase inhibitors were either passive or negatively regulated TDP-43 cytoplasmic level. Only 3 kinases inhibitors, Ro 31-8220 mesylate, 5-Iodotubercidin, and C16, were validated in all the screens (active at 1 μM in MT bench assay, translocation of HA-wild-type TDP-43 in HeLa cells, and translocation of endogenous TDP-43 in NSC-34 cells). However, since kinase inhibitors have broad target spectra, it is possible that alterations in the mixing of wild-type TDP-43 with hyper-phosphomimetics may result from indirect effects that impact TDP-43 C-terminus self-assembly.

Kinase inhibitors promote the formation of aggregates in an mRNA-binding deficient TDP-43 mutant.

We investigated whether the selected molecules interfere with the recruitment of TDP-43 into stress granules. We performed this screen in HeLa cells expressing wild-type HA-TDP-43 and G3BP1-GFP to form stress granules in the absence of additional oxidative stress (Figure 6c). Of the 11 kinase and 2 phosphatase inhibitors tested, we observe a poor correlation between the recruitment of TDP-43 into stress granules and changes in the mixing of wild-type TDP-43 with the hyper-phosphomimetic mutant in the cytoplasm (Figure 6c). Moreover, we observed unexpected variations in the recruitment of TDP-43 hyper-phosphomimetic mutant in stress granules. Therefore, the selected kinase/phosphatases inhibitors could alter the recruitment of TDP-43 into stress granules independently of mechanisms linked to TDP-43 self-assembly controlled by the phosphorylation state of its C-terminal domain in the cytoplasm. Consistent with the limited correlation between TDP-43 recruitment in stress granules and TDP-43 self-assembly orchestrated by the C-terminus, we found no overlap between the kinase inhibitors and those identified in a previous screen based on the enrichment of TDP-43 in stress granules (49) (Supplementary Figure 8a).

Next, we sought to investigate whether the selected molecules interfere with TDP-43 self-assembly by using a TDP-43 mutant, G146A, which strongly impairs the recruitment of TDP-43 in mRNA-rich stress granules. G146 residue is located in an unstructured loop of RRM1, which controls the cooperative binding of TDP-43 to GU-rich RNA repeats (7). When G146A is expressed in HeLa cells, it forms G146A-rich cytoplasmic condensates that are poorly enriched in mRNA, as previously reported(7). We measured the recruitment of G146A into condensates and their relative enrichment in mRNAs in HeLa cells treated with the selected compounds for 4 hours. The two phosphatase inhibitors clearly inhibited G146A condensation, whereas 4 out of the 11 tested kinase inhibitors, including the 3 hits identified from the MT bench assay that were still efficient at 1 μ M (Ro 31-8220 mesylate, 5-Iodotubercidin and C16) (Figure 6d, Supplementary Figure 7d), increased the recruitment of TDP-43 in aggregates, indicating a negative impact on G146A solubility (Figure 6d). Interestingly, Ro 31-8220 mesylate, 5-Iodotubercidin, and C16 also increased the content mRNA in G146A-rich condensates, unlike the 2 phosphatase inhibitors (Figure 6d). This result is in keeping with the stronger recruitment of mRNAs by hypo- than hyper-phosphomimetic mutants detected on microtubules (Figure 4b).

We also analyzed whether the selected compounds could interfere with the splicing events controlled by TDP-43 (Supplementary Figure 8b). Using the reporter of CFTR exon 9 excision controlled by TDP-43, we found that some compounds affected the skipping of exon 9, but we failed to find a clear trend with the mixing score. Notably, Ro 31-8220 mesylate but not 5-Iodotubercidin and C16 affected the skipping of exon 9. As the selected compounds were screened for their ability to interfere with cytoplasmic TDP-43 self-assemblies, a limited correlation with mRNA splicing taking place in the nucleus may be expected.

In summary, in contrast to translocation assays, neither the stress granule nor splicing assays revealed a clear correlation with the MT bench assays (Figure 5a). However, we notice that kinase inhibitors validated at low concentration (1 μ M) and the two phosphatase inhibitors promoted and inhibited cytoplasmic condensation of G146A mutant, respectively (Figure 5d).

Selected Kinase inhibitors prevent the import of cytoplasmic TDP-43 into the nucleus.

A correlation has been established between compounds that reduce the mixing of wild-type TDP-43 with the hyper-phosphomimetic mutant (18E) in the cytoplasm and an increased presence of wild-type TDP-43 in the cytoplasm, while the opposite trend is observed with phosphatase inhibitors (Figure 5f and Figure 6a). To explain the phenomena behind this correlation, we examined the nuclear levels of wild-type TDP-43 and TDP-43 hypo- and -hyper phosphomimetic mutants at the single-cell level compared to their respective levels of expression in HeLa cells. We observed a population of cells displaying a marked nuclear location for both wild-type TDP-43 and the hyper-phosphomimetic mutant, 18E (Supplementary figure 9a). This behavior is consistent with an active nuclear import of TDP-43 (44, 60) and/or a nuclear retention(43) based on the formation of TDP-43 higher-order assemblies in the nucleus (Figure 7a). In contrast, the hypo-phosphomimetic mutant (18A) displays a linear relationship between nuclear and cytoplasmic levels, with a higher R^2 value compared to wild-type TDP-43 or 18E, indicating that 18A's subcellular location is mainly governed by passive bi-directional diffusion through nuclear pores without active nuclear import (Figure 7a, Supplementary Figure 9a).

Interestingly, the same pattern was observed in HeLa cells expressing HA-TDP-43 treated with our three kinase inhibitor hits, Ro 31-8220 mesylate, 5-Iodotubercidin, and C16 (Supplementary Figure 9a). Based on these results, we investigated whether TDP-43 nuclear import is impaired or its nuclear retention is promoted after cell treatments with kinase inhibitors. We first noticed the presence of granular nuclear structures enriched in phosphorylated TDP-43 in HeLa cells or NSC-34 cells (anti-phospho TDP-43, serine residues 409/401) (Figure 7b, c). These nuclear granular-like structures may represent sites in which phosphorylated TDP-43 but also wild-type TDP-43 can be sequestered in the nucleus. Indeed, HA-TDP-43, HA-18E but not HA-18A were detected in the anti-phospho TDP-43-rich nuclear granules (Figure 2e). However, upon expression of hyper- but not hypo-phosphomimetic mutants, we observed that the recruitment of TDP-43 in these nuclear granules did not increase (Supplementary Figure 9b). Therefore, the expression of hyper-phosphomimetic TDP-43 mutants did not promote the assembly of the phospho-TDP-43-rich granular structures. More importantly, we also observed that the selected kinase inhibitors, which markedly increase TDP-43 cytoplasmic levels, promoted the formation of phospho-TDP-43 nuclear granules in both HeLa and NCS-34 cells (Figure 7b,c). Thus, the increased cytoplasmic TDP-43 level upon cell exposure to the selected kinase inhibitors is not due to the dissociation of phosphorylated TDP-43 nuclear granules.

As the experimental results do not support an increased sequestration of TDP-43 by phosphorylated TDP-43-rich structures in the nucleus, we investigated whether the nuclear import of TDP-43 is impaired. In a previous study (39), it was reported that cytoplasmic de-mixing of TDP-43 inhibits its nuclear transport, leading to depletion of nuclear TDP-43. We then examined whether TDP-43 self-assemblies in the cytoplasm increase when cells express a hypo- phosphomimetic mutant. While most cells showed a homogenous distribution for TDP-43 hyper- phosphomimetic mutant (18E), we observed an increase in the occurrence of TDP-43-rich granules in the cytoplasm of cells expressing the TDP-43 hyper-phosphomimetic mutant. Using the same window of TDP-43 expression in the cytoplasm, we also found that the enrichment of TDP-43 in the detected granules was highest with the hypo-phosphomimetic mutant (18A) and lowest with the hyper-phosphomimetic mutant (18E)

(Figure 7d). In addition, denser compartments were generated along microtubules by hyper-phosphomimetic mutants (Supplementary Figure 2).

DISCUSSION:

Deciphering the mechanisms that regulate TDP-43 cytoplasmic/nuclear levels is critical to defining therapeutic strategies since the presence of TDP-43 in cytoplasmic inclusions with less TDP-43 in the nucleus is a pathological hallmark of ALS and FTLN (61). In previous studies, passive diffusion of TDP-43 through nuclear pores associated with an active nuclear import have been proposed as the main determinants of TDP-43 sub-cellular distribution (44, 60). According to this model, an increased TDP-43 sequestration in nuclear structures/compartments promotes TDP-43 nuclear retention (43, 62). Alternatively, an increased occurrence of TDP-43 self-assemblies in the cytoplasm has also been reported as a factor that increases the cytoplasmic location of TDP-43 by reducing its nuclear import (39) (Figure 8). Consistent with the latter point, removing the C-terminus domain of TDP-43 promotes its cytoplasmic location (45). The TDP-43 cytoplasmic self-assembly hypothesis also makes sense because hypo-phosphorylation of the TDP-43 C-terminal promotes the formation of liquid droplet with reduced dynamics in vitro (26) (Figure 8 and Supplementary Figure 2). We thus considered whether the sub-cellular location of TDP-43 can be differentially regulated by kinase and phosphatase inhibitors that alter the phosphorylation state of the self-adhesive C-terminal domain of TDP-43 in the cytoplasmic. Here, we used the Microtubule Bench method to select kinase and phosphatase inhibitors that alter the phosphorylation-dependent self-assembly of TDP-43 mediated by the C-terminus domain in the cytoplasm (Figure 1a). Having identified kinase and phosphatase hits (Figure 5c), we found that both TDP-43 hypo-phosphorylation mimetics and, consistently, the 3 kinase inhibitor hits, Ro 31-8220 mesylate, 5-Iodotubercidin, and C16, negatively regulate the nuclear retention of TDP-43. In contrast, the hyper-phosphomimetic mutant and the selected phosphatase inhibitors increase TDP-43 nuclear levels (figure 6a, e). Therefore, there is a clear negative correlation between the strength of cytoplasmic TDP-43 self-assembly and the efficiency of TDP-43 nuclear retention (Figure 5a). In addition, when we used G146A, a TDP-43 mutant that no longer cooperatively binds to GU-rich sequence, to form cytoplasmic TDP-43 condensates, we found that the phosphatase inhibitors oppose the sequestration of G146A into cytoplasmic condensates (Figure 6e). On the other hand, the 3 kinase inhibitor hits increase the sequestration of G146A mutant into cytoplasmic condensates (Figure 6e, Supplementary Figure 8b).

Of note, phosphorylated TDP-43 recognized by anti-phospho TDP-43 antibodies (S409/410) is generally associated with a cytoplasmic location of TDP-43 and a positive regulation of TDP-43 self-assembly. These observations were often related to the aggregation of TDP-43 (28, 63-65), which occurs at the late stages of ALS or FTLN (66). Therefore, cytoplasmic TDP-43 phosphorylation in neurons affected by these diseases could also occur downstream of TDP-43 aggregation and truncation (35).

In addition to analyzing sub-cellular location of TDP-43, the results obtained with a CFTR exon 9 mini-gene reporter indicate a possible role of TDP-43 phosphorylation in splicing regulation (Figure 3d). However, there is no correlation between changes in cytoplasmic self-assembly of TDP-43 and the inclusion of exon 9 of the CFTR gene after treatment with the selected kinase and phosphatase inhibitors (Supplementary Figure 8b). TDP-43 control over nuclear splicing events may not be regulated by the same kinases, which makes sense as splicing takes place in the nucleus and not in the cytoplasm. "Another point is the recruitment of TDP-43 mutants in stress granules which can be impaired by TDP-43 hyper-phosphorylation of its C-terminus (26). Here we clarified that stress granules obtained after G3BP1 overexpression or after mild

oxidative stress (300 μ M H₂O₂) do recruit the hyper-phosphomimetic mutants (Figure 4a, Supplementary Figure 4b, c, d). The non-recruitment of the hyper-phosphomimetic mutants in stress granules occurs only after acute oxidative stress, such as arsenite treatment or elevated H₂O₂ concentration (1 mM). Acute oxidative stress promotes intermolecular RRM interactions (41,42), which strongly inhibit the binding of the hyper-phosphomimetic mutant TDP-43 to mRNA, but to a lesser extent for the hypo-phosphomimetic mutants (Figure 4b). Since stress granules are mRNA-rich compartments, an impaired affinity of TDP-43 for cytoplasmic mRNA may explain the non-recruitment of the hyper-phosphomimetic mutant in stress granules under acute oxidative stress (Figure 4b, Supplementary Figure 4b, c, d). Whether phosphorylation of TDP-43 C-terminus controls the binding of TDP-43 to mRNA under acute stress and whether this behavior is only observed in artificial phosphomimetic mutants remain open questions.

In summary, TDP-43 self-assembly in the cytoplasm, promoted by the hypo-phosphorylation of the C-terminal domains, antagonizes TDP-43 nuclear import. As already proposed (39), with the objective of defining a therapeutic strategy, decreasing TDP-43 C-terminus self-assembly in the cytoplasm is a priori relevant to promote the nuclear localization of TDP-43 and limit TDP-43 cytoplasmic aggregation. Given that many pathological mutations occur in the C-terminal domain, it is important to investigate whether phosphorylation or dephosphorylation events can correct the deregulation in TDP-43 self-assembly and TDP-43 functions in mRNA processing, especially splicing. Conversely, it is also important to investigate whether pathological mutations alter the phosphorylation status of the C-terminal domain. These are crucial issues that require further investigation in order to better understand the mechanism underlying TDP-43-related neurodegenerative diseases and to develop potential therapeutic strategies.

Materials and Methods

MT bench experiments

Plasmid preparation. Plasmids harboring the full length TDP-43, HuR and G3BP1 genes fused with RFP-MBD (Microtubule-Binding Domain of Tau) and/or GFP-MBD were obtained previously (7, 40). Plasmids used for the MT bench technique are listed in Table S1. Constructed Hypo- and hyper-phosphomimetic mutations are located in the C-terminal domain of TDP43, and DNA sequence encoding for this part is located between NdeI and AscI restriction sites in the plasmid TDP43-RFP-MBD. Hypo- and hyper-phosphomimetic constructs were amplified by PCR using a synthetic DNA template bearing the desired mutations (purchased from Eurofins Genomics) and primers containing NdeI and AscI restriction sites. Then, they inserted into the plasmid TDP43-RFP-MBD digested with NdeI and AscI restriction enzymes. The introduced mutations were checked by DNA sequencing (Eurofins Genomics). All the DNA oligos used for constructing TDP43 hypo- and hyper-phosphomimetic mutants are indicated in Table S2.

Cell culture and plasmid co-transfection. HeLa cells were obtained from ATCC and cultured at 37°C, 5% CO₂ in high-glucose DMEM medium (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 1x MEM non-essential amino acids solution and 1% penicillin-streptomycin (GIBCO Life Technologies). Cells at confluence were plated at a density of 18 000 cells per well of 96-well plates and co-transfected with the indicated plasmids using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) as vehicle. Co-transfected cells were incubated during 24 h at 37°C in 5% of CO₂. Cells were washed with PBS, then fixed with ice-cold methanol for 10 min at -20°C and washed with PBS. Cells were further fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in PBS during 10 min at RT. This double methanol/PFA fixation is performed to improve the microtubule structure visualization. After final washing with PBS, 96-well plates were ready for image acquisition with the Opera Phenix® Plus High-Content Screening (HCS) System.

Image acquisition and mixing score (R-squared) measurement. All image acquisition was carried out with Opera Phenix® Plus High Content Screening System (PerkinElmer) in confocal mode on 40x magnification. To assess sub-compartmentalization in the system with both proteins fused to GFP/RFP-MBD, the cell image analysis was performed using the PerkinElmer Harmony v4.8 software, and we have defined an analysis pipeline by applying several parameters defining spatial segregation of two proteins such as RFP/GFP fluorescence intensity in the spot, number of spots, width to length ratio of the spot and RFP/GFP fluorescence intensity in the cytoplasm. Briefly, we selected the population of interest i.e. the co-transfected cells harboring both red and green cells. Nuclei, cytoplasm, and spots of proteins fused to GFP/RFP-MBD along the microtubule network were automatically detected. We identified clusters of microtubules (spots) along the microtubules of the cells, and we applied thresholds to filter them. The spots were selected according to their area ($30 < \text{spot area} < 200 \text{ px}^2$), the width to length spot ratio (< 0.2) in order to remove all non-tubular spots. In each selected "microtubule" spots, the intensity of RFP and GFP was measured as well as in the surrounding cytoplasm. The mixing score (R-squared) was obtained by plotting the mean intensity values (IRFP-TDP43/IGFP-TDP43) having previously subtracted the RFP and GFP intensities in the cytoplasm to eliminate the background. A linear regression has been used to automatically determine R² values.

Cellular functional bioassay

Plasmid preparation. Hypo- and hyper-phosphomimetic constructs harboring HA-tag (YPYDVPDYA) were amplified by PCR using a synthetic DNA template bearing the desired mutations (purchased from Eurofins Genomics) and primers containing NdeI and AscI restriction sites. Plasmids harboring the full length TDP-43, HuR and G3BP1 genes fused with HA-tag were obtained previously (7). In order to construct the plasmids encoding the full length TDP43 Hypo- and hyper-phosphomimetic fused to HA-tag, similar procedure as described above for plasmids used in MT bench assay. The corresponding insert amplified by PCR using primers containing NdeI and XhoI restriction sites and inserted into HA-TDP43-pcDNA3.1 plasmid digested with NdeI and XhoI restriction sites (7). Phosphorylation status. After transfection with the indicated plasmid and fixation with 4% PFA, IF was realized by using anti-HA (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) and anti-phospho-TDP43Ser409/410 (1:3000, PAB Proteintech) primary antibodies diluted in blocking buffer. The phosphorylation level was quantified by measuring the pTDP43:anti-HA fluorescence ratio.

Subcellular localization assay. HeLa cells were transfected 24 h with indicated HA-tagged phosphomimetic mutants or 48 h post transfection followed by DMSO or 300 μ M actinomycin D (ActD) treatment during 1 h 30 at 37°C. After treatment, cells were fixed with 4% PFA for 30 min 37°C. The staining was performed using anti-HA (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) primary antibodies. mRNA was visualized by in situ hybridization with Cyn3 or Cyn2-labelled poly(dT) probes. Quantifications were performed with HCS confocal mode. The HCS software was used to automatically detect the fluorescence intensity of HA in cells. Cytoplasm was revealed by the mRNA fluorescence. We measured the cytoplasmic: nuclear fluorescence ratio by using the anti-HA fluorescence signal.

Splicing reporter analysis. To generate stable HEK-293T cell lines for splicing reporter analysis, 50.000 HEK-293T cells from ATCC were plated in 6-well plates using standard conditions (DMEM, 10% FBS, penicillin-streptomycin). The indicated lentiviral plasmid targeting TARDBP (AM21) or negative control TRS-NS (See Table S5) were packaged using second generation packaging plasmids (pGIPZ, pMD2.G, psPAX2) (Addgene) and transfected into HEK-293T target cells with Effectene transfection reagent (Qiagen) to produce lentiviral particles for transduction. Viral supernatants were collected at 48 h post transfection, pooled, filtered through non-binding 0.45 μ m syringe filters and 40 μ L was used to transduce HEK-293T cells with 8 μ g/ μ L polybrene (Sigma-Aldrich). After 24 h, the virus-containing medium was removed and replaced with selection medium containing Puromycin 8 μ g/ μ L (Sigma-Aldrich). After 7 days of selection, cells were stored at -80°C. Stable inhibition of TDP43 was verified by immunofluorescence and western blot and stable HEK-293T line AM21 was selected to use for splicing reporter analysis experiments. The AM21 shRNA targets a coding sequence of TDP43 gene in the 3' part. Therefore, to avoid off-target effects we synthesized oligonucleotides in order to introduce mismatch with silent mutations without altering the functionality of TDP43 protein. Table S6 shows for each plasmid, the corresponding primers used to introduce the mismatch mutations. TDP43 functional activity was assessed using a transfection CFTR splicing reporter from Rajat Rohatgi lab (pHBS956 IBB-GFP-mCherry3E; Plasmid #107859; Addgene). The corresponding HA plasmids were co-transfected with CFTR splicing reporter into shRNA stable cell line-HEK293T using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) following the standard manufacturer's protocols. After 24 h, cells were fixed and stained with anti-HA antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). Splicing activity was then evaluated by IF in nucleus using HCS imaging. The fluorescence intensity of GFP and mCherry in

cells was detected in the nucleus and we measured the mean intensity ratio of mCherry:GFP for each condition.

Stress granules assay. HeLa cells were co-transfected with corresponding HA plasmid for indicated times.

For stress granules induced with Arsenite, cells were treated with DMSO or 300 μ M Arsenite during 1 h at 37°C. After treatment, cells were washed with PBS and fixed with 4 % PFA during 30 min at 37°C. The staining was performed using anti-HA (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) primary antibody (Table S7-S8). To visualize mRNA in HeLa cells, mRNA in situ hybridization was performed. Briefly, cells were fixed with 4% PFA as explained above. Cells were then incubated with ethanol 70% during 10 min at RT and then with 1 M Tris-HCl pH 8.0 solution during 5 min. Poly-dT oligonucleotide coupled with Cyn-2 1 μ g/ μ L (Molecular Probed Life Tech) in the hybridization buffer (0.005% BSA, 1 mg/mL yeast RNA, 10% dextran sulfate, 25% formamide in 2X SSC buffer) was then used to reveal mRNAs. DAPI (0.66mg/mL) was used to visualize nuclei. Quantifications were performed with HCS imaging in confocal mode. The HCS software was used to assess the anti-HA fluorescence intensity in SGs and in cytoplasm for background (Supplementary Figure S4). The HA protein enrichment in G3BP1-GFP or mRNA- rich granules was assessed by dividing the mean anti-HA fluorescence intensity value in granules with the mean G3BP1-GFP or mRNA abundance in the cytoplasm.

For stress granules formation with hydrogen peroxyde (H2O2), cells were first pre-treated with puromycin (2.5 μ g/ml) during 20 min and then with H2O2 (300 μ M or 1 mM) during 30 min at 37°C. Cells were fixed as mentioned above and subjected to IF by using anti-HA antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). mRNA was visualized by in situ hybridization as described above.

For Bait/Prey assay, cells were co-transfected with corresponding plasmid and were treated with DMSO or Arsenite (300 μ M) during 1 h at 37°C. After 4% PFA fixation, the staining was performed using anti-HA antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology).

To investigate TDP43-GFP and HA protein recruitment in SGs following arsenite stress, cells were co-transfected with the corresponding plasmid and were treated with 300 μ M Arsenite during 1 h at 37°C. The staining was done with anti-HA antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). mRNA was detected by *in situ* hybridization as above-mentioned. Quantification of HA and TDP43-GFP protein relative recruitment in SGs versus cytoplasm was performed.

RNA interaction assay. Cells were transfected with a single bait plasmid bearing point mutations (18E-RFP-MBD, 18A-RFP-MBD or the wild-type TDP43-RFP-MBD plasmid) and treated with DMSO or Arsenite (300 μ M) during 1 h at 37°C. After cell treatment, cells were fixed and mRNA *in situ* hybridization was performed to assess mRNAs in cells as mentioned above. The bait and mRNA fluorescence were detected automatically and the ratio $I_{\text{bait}}/I_{\text{mRNA}}$ was measured to evaluate the interaction of the bait protein with mRNA.

MT bench screen

Compounds. We selected a phosphatase and kinase inhibitors libraries (ENZO) and others known phosphatase and kinase inhibitors (Table S9-S10). Compounds were provided and prepared (10 mM in a 96-well plate) by Mcule company.

Assay validation and hit screen. The assay was validated using the Z' factor measure. For this, a series of negative (screening system) and positive controls (de-mixing) were measured using the MT bench assay. Briefly, HeLa cells were plated on 96-well plates (CellCarrier Ultra microplates, PerkinElmer) at a density of 18.000 cells per well. After overnight incubation, cells were co-transfected for each condition in 48 wells with the following couple of plasmids based on the optimization of the transfection conditions: 18E-RFP-MBD/wtTDP43-GFP-MBD for the screening system and the couple 18A-RFP-MBD/18E-GFP-MBD for the de-mixing control by using 0.4 μ L lipofectamine 2000TM reagent (Invitrogen). DNA concentrations used for this screen are 0.4 μ g/0.1 μ g per well for RFP-MBD/GFP-MBD plasmids respectively since GFP fusion is better expressed in HeLa cells. After 24 h co-transfection, cells were fixed with methanol/4% PFA. The plate was analyzed, and the Z' factor was measured. To validate the degree of separation, the Z' factor was determined using the formula:

$$Z' \text{ factor} = 1 - \frac{3(\sigma_{SS} + \sigma_{DS})}{(\mu_{SS} - \mu_{DS})}$$

where σ_{SS} and σ_{DS} are the standard deviations of the screening system (SS) and de-mixing system (DS) respectively and μ_{SS} and μ_{DS} are the corresponding mean values. A Z' factor between 0.5 and 1.0 indicates an excellent assay and statistically reliable separation between the screening system and de-mixing system. Using a BRAVO liquid handler (Agilent), HeLa cells were seeded and were co-transfected in quadruplicate with the screening system (wtTDP43- GFP-MBD/18E-RFP-MBD) or the de-mixing control (18A-RFP-MBD/18E-GFP-MBD) to performed quality control (Z' factor measurements for each screen plate) with the same DNA concentrations as those used for assay validation. Cells were treated in quadruplicate with DMSO or drug compounds at desired concentrations. Only data at 10 μ M will be shown. Then cells were exposed to compounds during 4 h at 37°C. After compound treatment, cells were fixed. Nuclei were stained with 1 mg/ml DAPI. Image acquisition was performed automatically with the Opera Phenix® Plus High-Content Screening System. Details on image acquisition and statistical analysis are provided in Figure 2a, b.

Determination of IC50 of hit compounds. HeLa cells were co-transfected with wtTDP43-GFP-MBD/18E-RFP-MBD plasmids and treated with hit compounds. 10 concentrations of drugs were tested. Experiments were done in quadruplicates for each concentration. IC50 values were determined by plotting the % inhibition versus the log of the concentration of the inhibitor. The inhibitor concentrations used are: 39.063 nM, 78.125 nM, 156.250 nM, 312.500 nM, 625.000 nM, 1250.000 nM, 2500.000 nM, 5000.000 nM, 1000.000 nM, 2000.000 nM. After 4 h of incubation, cells were fixed and the quantification was performed as described above.

Cell-based bioassay screen

HeLa cells were transfected with the indicated plasmid and then treated with the 13 hit compounds (10 μ M) during 4 h at 37°C.

Subcellular localization screen. After incubation of molecules, HeLa cells were washed and fixed as already mentioned above. mRNA was visualized by in situ hybridization. The staining was performed using anti-HA primary antibody. The same experiment was carried

out using NSC-34 cell line. NSC-34 cells were purchased from ATCC and maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin and streptomycin antibiotics (pen/strep). NSC-43 cells were seeded in 96-well plates and treated with DMSO or hit compounds. Immunostaining was performed with anti-TDP43 (1:1000, Proteintech) and anti- α -Tubulin (1:1000, Sigma-Aldrich) primary antibodies. Quantifications are already mentioned above in the subcellular localization assay section.

Stress granule screen. After hit compounds treatment, the cells were fixed as mentioned above. The staining was performed using anti-HA primary antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology).

HA-G146A condensates screen. HeLa cells were transfected with the indicated plasmid (TDP43 G146A mutant) and then treated with hit compounds during 4 h at 37°C. IF was performed with anti-HA antibody and mRNAs were stained by in situ hybridization as described above. We measured the aggregates to cytoplasmic fluorescence ratio by using anti-HA fluorescence and the mRNA enrichment in cytoplasmic aggregates by using the mRNA fluorescence assessment.

Phosphorylation screen. After drug treatment, IF was performed with the following primary antibodies: anti-TDP43 (1:1000, ABnova) and anti-pTDP43 (1:3000, Proteintech). The same experiment was carried out with NSC-34 cell line. NSC-34 cells were treated with the indicated compounds and IF was performed with anti- α -Tubulin (1:1000, Sigma-Aldrich) and anti-TDP43 (1:1000, Proteintech) primary antibodies. We quantified the fluorescence ratio of anti-pTDP43 inside versus outside nuclear granules by the nuclear granule:nucleoplasm pTDP43 fluorescence ratio.

Splicing screen. HEK-293T stable lines were transfected with the indicated plasmid and *CFTR* minigene reporter assay following by hit compounds treatment. Splicing analysis is already explained in “Splicing reporter analysis” section.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare between more than two groups. *p* values <0.05 were considered to be statistically significant. Data were normally distributed with similar variance between the groups. All data described in graphical representations are mean \pm standard error of the mean (SEM). The IC₅₀ values were determined by analysis of dose-response inhibition using GraphPad prism.

Acknowledgments

This work was supported by a CIFRE grant from the ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) and 4P-PHARMA. This work was also supported by U1204 INSERM, SABNP lab (Laboratoire Structure et Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques) and SYNSIGHT.

Figure 1

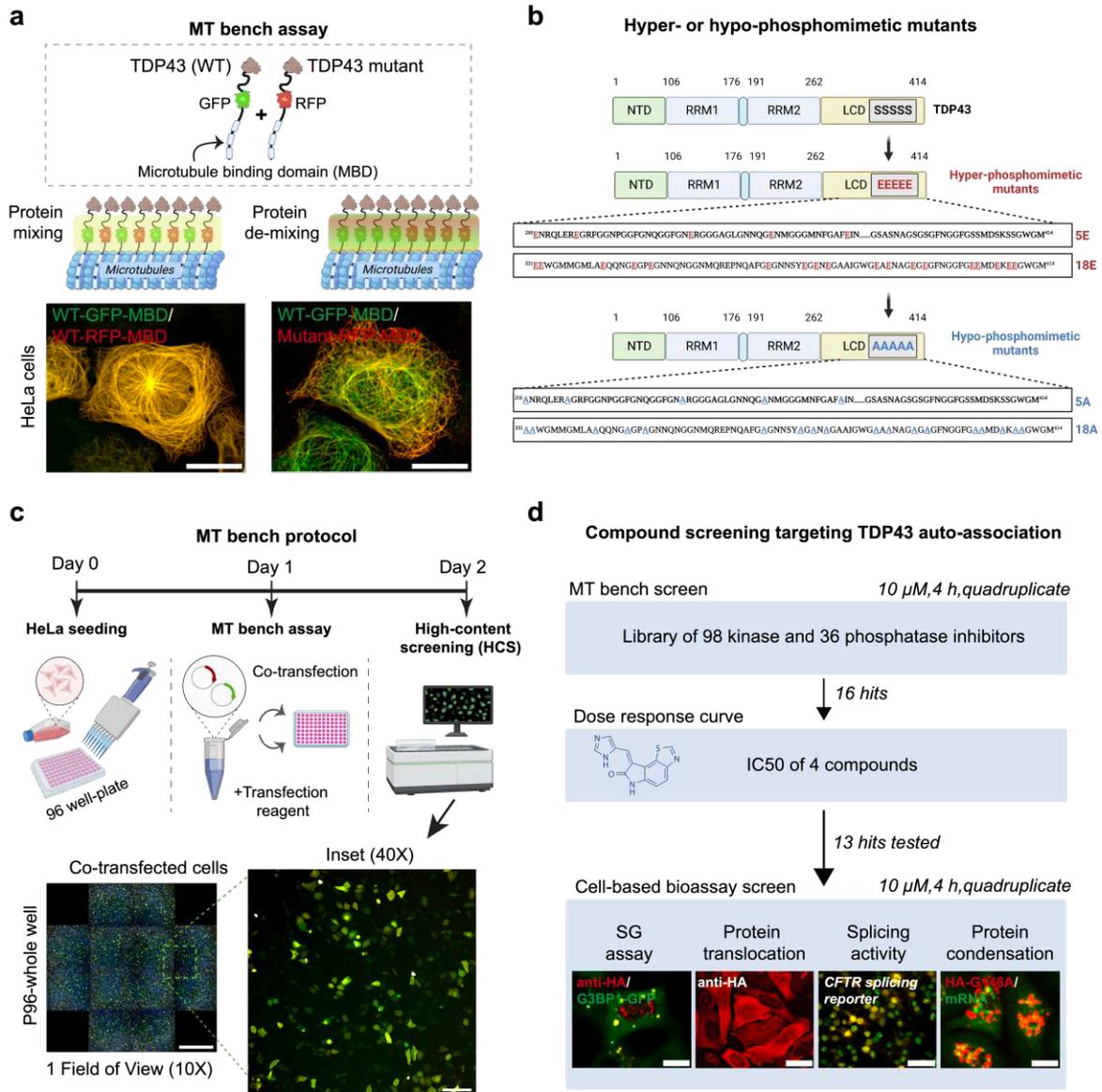


Figure 1: Schematic representation of the experimental approach for identifying kinase and phosphatase inhibitors targeting the TDP-43 C-terminus self-assembly in the cytoplasm.

a. Description of the MT bench technology which is designed to probe the mixing between wild type and mutant TDP-43 along microtubules in HeLa cells co-expressing the indicated protein fusions. Scale bar: 20 μm .

b. Schematic representation of TDP-43 hyper- or hypo-phosphomimetic mutants.

c. Automatic detection of single cell fluorescence via an automatic HCS imager in 96-well plates for measuring the mixing/de-mixing between two proteins along the microtubule network. Scale bar: 50 μm . Zoom scale bar: 100 μm .

d. Screening strategy for identifying kinase/phosphatase inhibitors which significantly interfere with the phosphorylation-dependent self-assembly of TDP-43 C-terminus in the cytoplasm. 98 kinase and 36 phosphatase inhibitors were tested in a primary screen. Then, in secondary screens, the capacity of the selected compounds to alter the recruitment of TDP-43 in stress granules, its subcellular distribution, TDP-43-related mRNA splicing events and the cytoplasmic condensation of an mRNA-binding deficient TDP-43 mutant, G146A, was subsequently analyzed. Scale bar: 20 μm

Figure 2

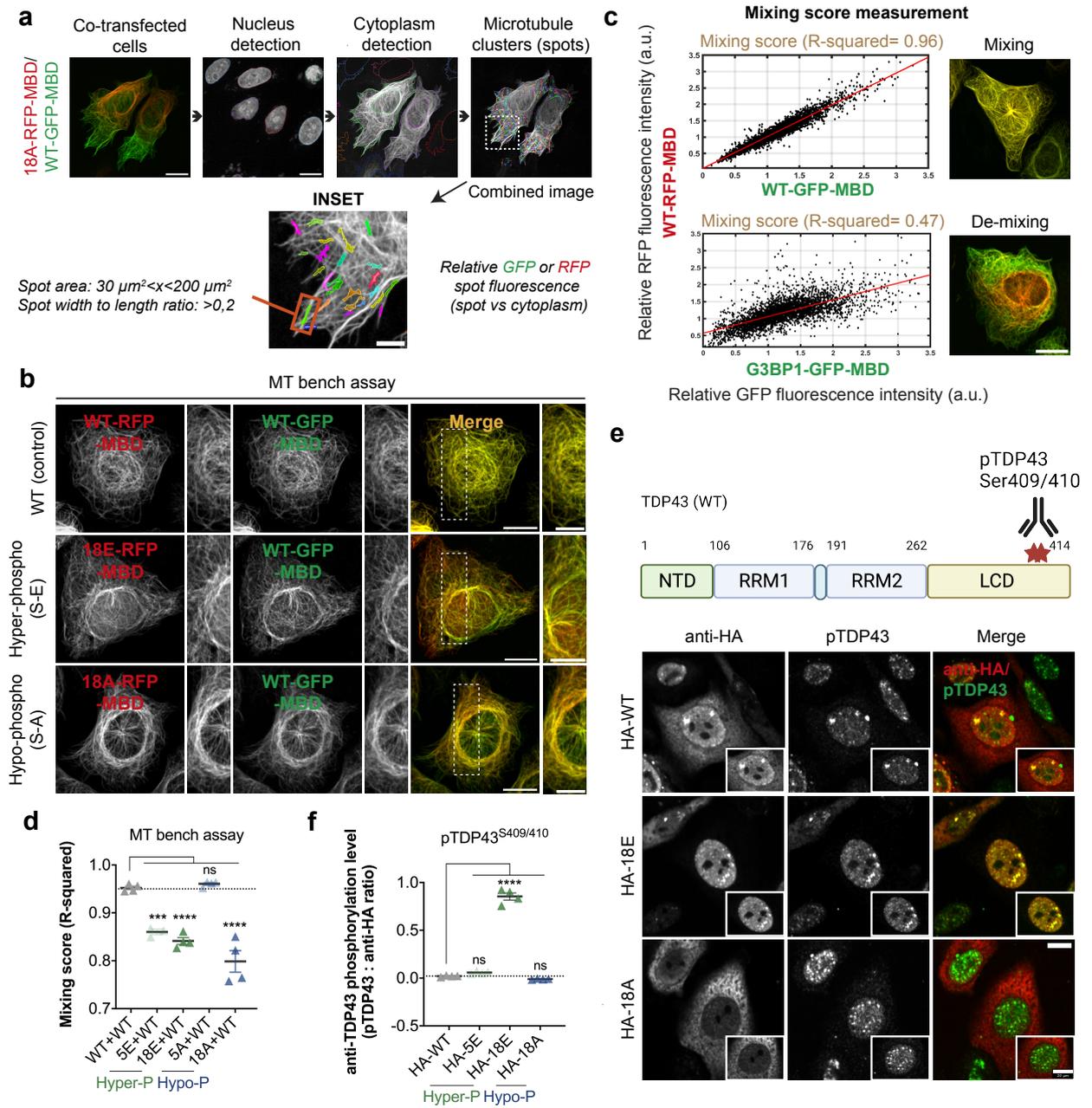


Figure 2: Hypo- and hyper phosphomimetic mutants significantly demix with wild type TDP-43 but differently.

a. Presentation of the automatic detection scheme allowing to measure fluorescence intensities in spots along the microtubules network in HeLa cells co-expressing wild type and mutant TDP-43 fused to a microtubule binding-domain (MBD) by using the Harmony software. In each “microtubule” spots, the intensity of RFP and GFP was measured as well as in the surrounding cytoplasm. Scale bar: 50 μm . Zoom scale bar: 20 μm .

b. Representative images of HeLa cell co-expressing indicated proteins used to measure their mixing along the microtubule network. Scale bar: 50 μm . Zoom scale bar: 30 μm

c. Left panel: Scatter plot of the relative GFP and RFP fluorescence intensity (spots versus cytoplasm) detected in all HeLa cells present in a single well under indicated conditions. The R-squared (R^2) value indicates to which extent the scatter plot distribution can be fitted using a linear regression ($R^2=1$: perfect mixing between the two proteins). Right panel: images of HeLa cells showing that TDP-43 is well mixed with itself ($R^2= 0.96$) but not with G3BP-1 ($R^2= 0.47$). Scale bar: 50 μm .

d. Mixing score (R^2 values) measured in HeLa cells expressing wild type TDP-43 and the indicated phosphomimetic mutants (see Figure 1a). Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, ns. non-significant, as measured by ANOVA test from $n = 4$ wells.

e. Images of HeLa cells expressing indicated HA-tagged protein and immune-stained with an anti-phospho TDP-43 antibody (Ser409/410). Note the co-localization of the hyper-phosphomimetic TDP-43 mutant and the anti-phospho TDP-43 in the nucleoplasm and some nuclear granules. Scale bars: 20 μm .

f. Relative increase in cellular anti-phospho TDP-43 (Ser409/410) fluorescence intensity with respect to anti-HA intensity in HeLa cells expressing indicated HA-tagged TDP-43 phosphomimetic mutant. Note the non-recognition of the 5E mutant by the anti-phospho TDP-43 since Ser409/410 were not mutated into Glu residues in this mutant. Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with **** $p<0.0001$, ns. non-significant, as measured by ANOVA test from $n = 4$ wells.

Figure 3

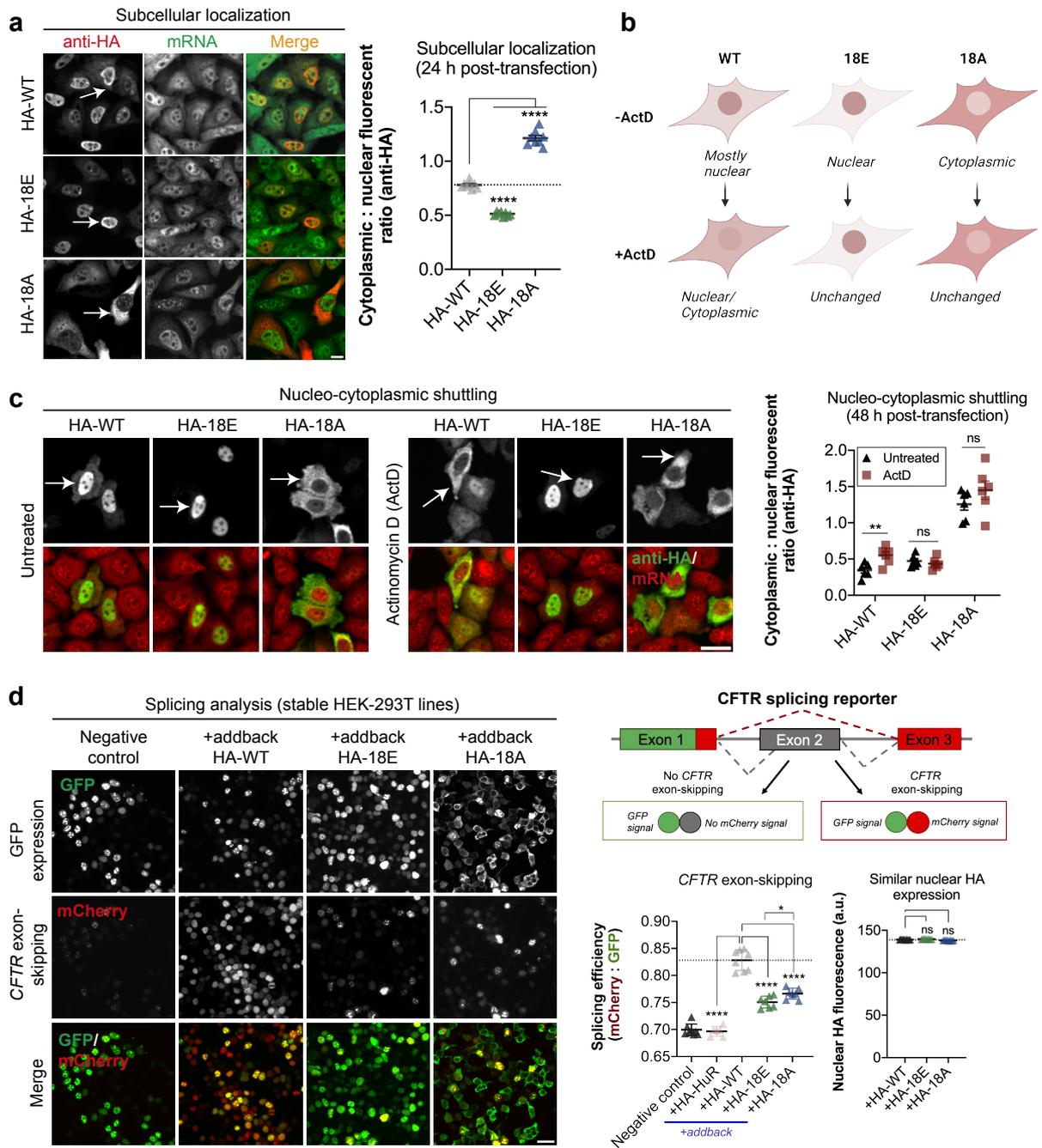


Figure 3: Mimicking the hypo-phosphorylation of TDP-43 C-terminus antagonizes its nuclear retention in HeLa cells

a. Left panel: Subcellular distribution of indicated HA-tagged phosphomimetic mutants expressed in HeLa cells 24 h after transfection. Poly(A) mRNA in green; anti-HA in red. Right panel: Automatic Quantification of the HA-tagged TDP-43 cytoplasmic level under indicated conditions. Each dot represents the mean value of a single well (96-well plate). Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with **** $p < 0.0001$, ns. non-significant, as measured by ANOVA test from $n = 6$ wells. Arrows indicate representative cells. Scale bar: 20 μm .

b. Schematic view of the results obtained with the translocation assays.

c. Same as (a) 48 h post transfection in HeLa cells treated with Actinomycin D (ActD) or not to promote TDP-43 translocation into the cytoplasm. Error bars indicate SEM and the asterisks indicates statistical significance with ** $p < 0.01$, ns. non-significant, as measured by ANOVA test from $n = 8$ wells. Arrows indicate representative cells. Scale bar: 20 μm .

d. Analysis of the skipping of CFTR exon 9, which is controlled by TDP-43, using the indicated minigene reporter in stable shRNA HEK cells that no longer expressed endogenous TDP-43 and after adding back the expression of HA-tagged TDP-43 mutants. Left panel: Representative image of stable shRNA HEK cells under indicated conditions. Upper right panel: Splicing reporter used to detect the skipping of CFTR exon 9. Lower right panel: Quantitative analysis of the splicing efficiency and anti-HA fluorescence intensity under indicated condition at the single cell level. Each dot represents the average values in selected HEK cells in a single well. Quantitative analysis was also performed with cells expressing the same level of HA-tagged protein in the nucleus as showed in the panel. Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with * $p < 0.05$ as measured by unpaired Student's t-test and

**** $p < 0.0001$, ns. non-significant, as measured by ANOVA test from $n = 8$ wells. Scale bar: 50 μm .

Figure 4

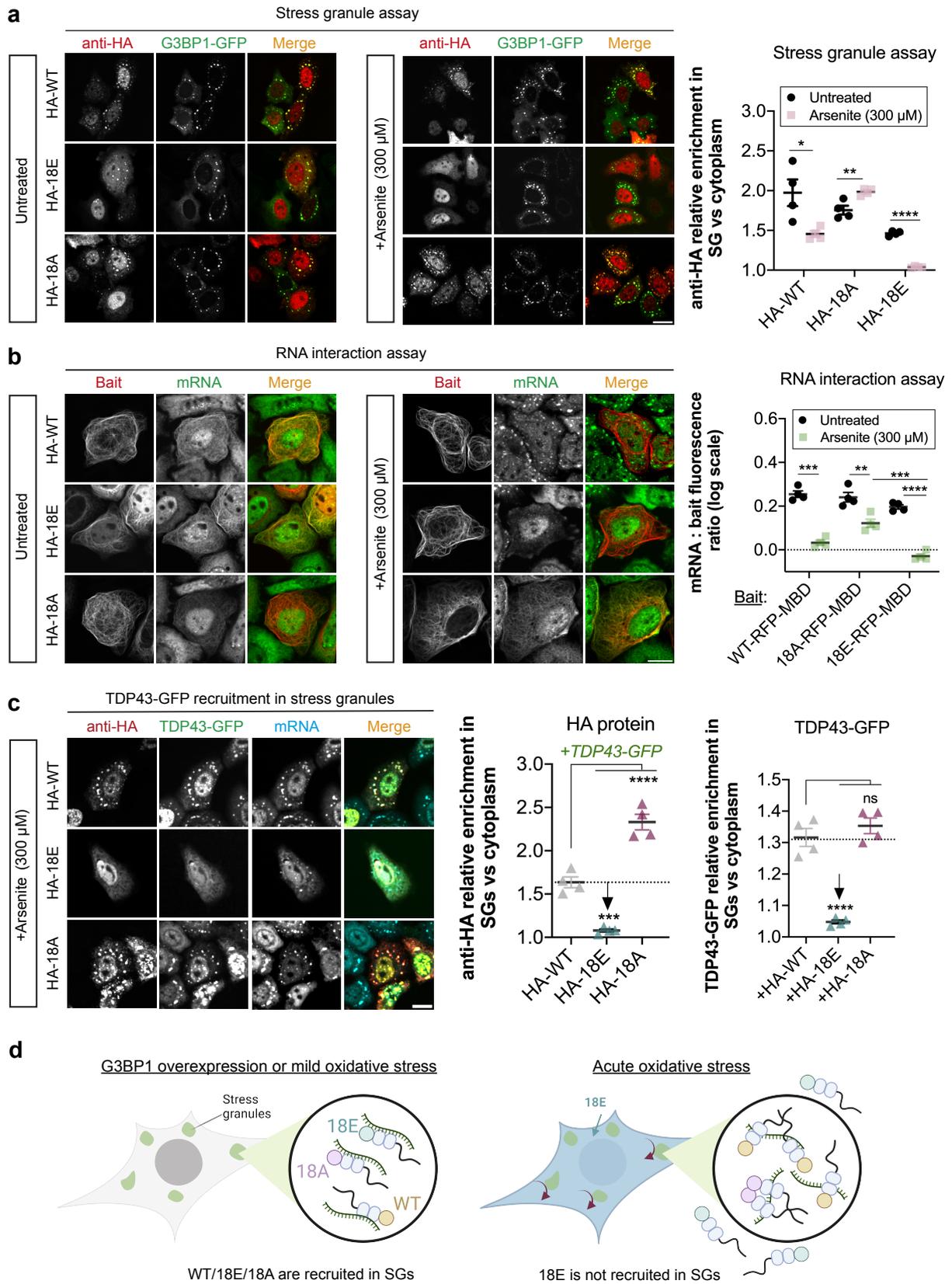


Figure 4: Hyper-phosphomimetic TDP-43 mutant is not recruited in stress granules but only under acute oxidative stress."

a. Left panel: Representative images of HeLa cells expressing HA-tagged phosphomimetic mutants and G3BP1-GFP with or without arsenite (300 μ M, 1 h). Right panel: Automatic quantification of the recruitment of HA-tagged TDP-43 mutants in stress granules. Each dot represents the mean value over all stress granules detected in a single well (96-well plate). Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$, ns. non-significant, as measured by Student's t-test from $n = 4$ wells. Scale bar: 50 μ m.

b. Left panel: Representative images of HeLa cells expressing the indicated TDP-43 mutants fused to microtubule-binding domain to analyze the recruitment of mRNA along microtubules in the presence or absence of arsenite (300 μ M, 1 h). Right panel: Relative recruitment of mRNA along microtubules for indicated proteins used as baits. Each dot represents the mean value over all stress granules detected in a single well (96-well plate). Note the absence of mRNA along microtubules with the hyper-phosphomimetic mutant (18E) after arsenite treatment. Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns. non-significant, as measured by Student's t-test from $n = 4$ wells. Scale bar: 50 μ m. mRNA was detected by in situ hybridization with a fluorescent poly-dT probe.

c. Left panel: Representative images of HeLa cells expressing indicated HA-tagged TDP-43 mutants and wild type TDP-43 in the presence of arsenite. Scale bar: 50 μ m. Center panel: Measurement of the recruitment of HA-tagged TDP-43 mutant and wild type TDP-43 in stress granules. Right panel: Measurement of the recruitment of wild type TDP-43 (GFP-tagged) in stress granules when HeLa cells were co-transfected with GFP-tagged wild type TDP-43 and the HA-tagged wild-type or phosphomimetic mutants. Wild-type TDP-43-GFP is no longer recruited in stress granules in arsenite-treated HeLa cells expressing the hyper-phosphomimetic mutant (18E). Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns. non-significant, as measured by ANOVA test from $n = 4$ wells.

d. Schematic view of the differential recruitment of TDP-43 in stress granules regulated by the phosphorylation status of TDP-43 C-terminus domain and the level of oxidative stress.

Figure 5

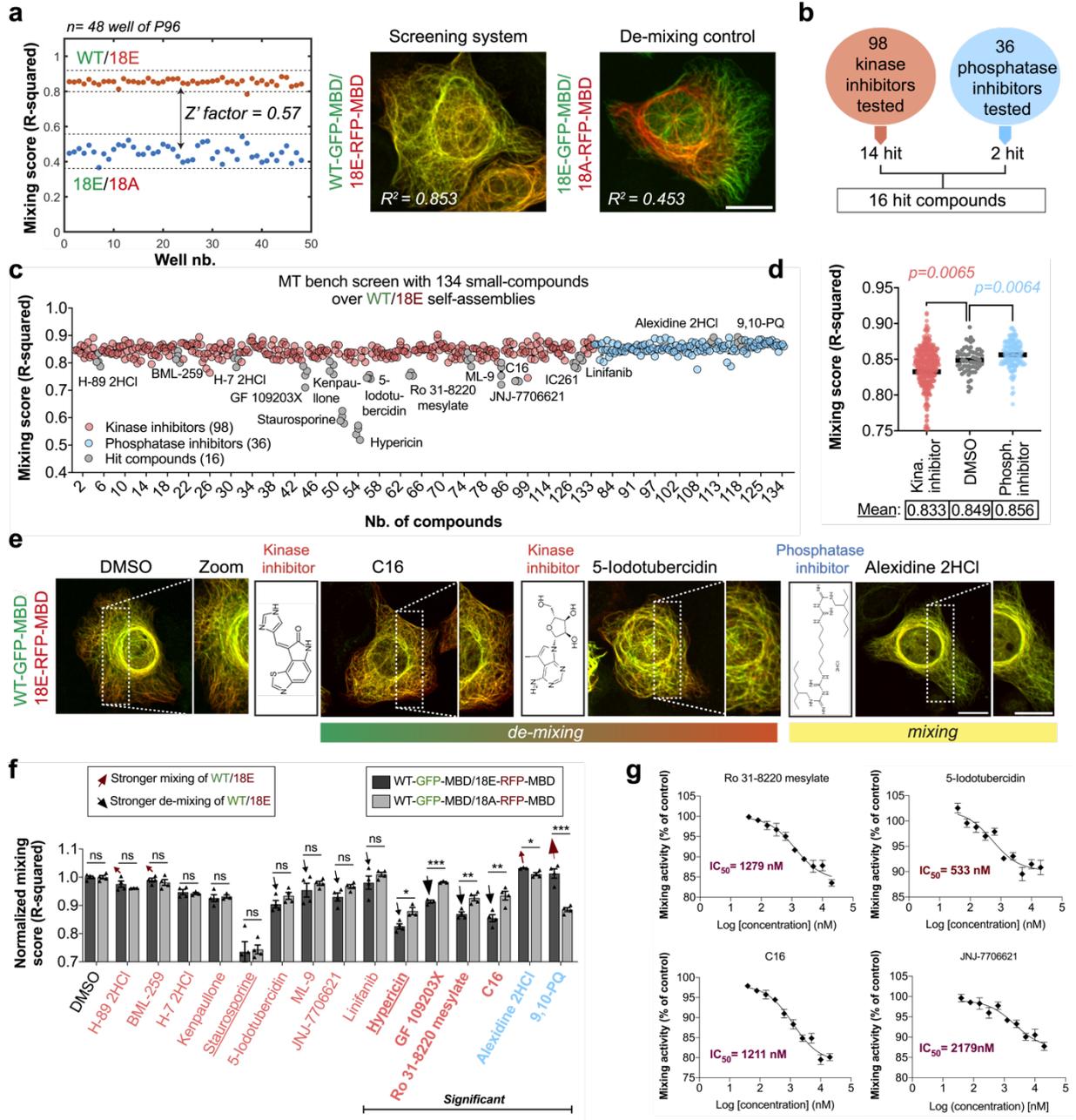


Figure 5: Identification of kinase/phosphatase inhibitors affecting TDP-43 C-terminus self-assembly in the cytoplasm.

a. Left panel: Mixing score of wild type TDP-43 with two mutants (18E or 18A) in a 96-well plate. The measured Z' factor is 0.57, which corresponds to a very good assay for compounds decreasing the mixing score. Right panel: Representative image of the mixing of indicated proteins along the microtubule networks in HeLa cells. Scale bar: 50 μm .

b. Summary of the results of the primary screen.

c. Scatter plot representing the mixing score for all the tested compounds. Red, kinase inhibitors, Blue: Phosphatase inhibitors, Gray: hits. HeLa cells were treated for 4 h with 10 μM of the indicated compounds.

d. Scatter plot of the mixing score for treatments with DMSO (control), kinase and phosphatase inhibitors. Globally, kinase inhibitors decrease while phosphatase inhibitors increase the mixing of the hyper-phosphomimetic mutants (18E) with wild type TDP-43. p values are indicated. T-test.

e. Representative image of the mixing of wtTDP-43 with 18E after indicated treatments. Scale bar: 50 μm .

f. Mixing score changes when comparing the mixing of wild type TDP-43 with either 18E or 18A mutant under indicated treatment. The mixing scores were normalized to 1 under control conditions (DMSO) to help detecting a putative differential mixing. Changes in the normalized mixing score are represented for 13 kinase and 2 phosphatase inhibitors selected from the primary screen. Statistical significance of the bidirectionality was probed with a Student's t -test. Error bars indicate SEM and the asterisks indicates statistical significance with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns. non-significant, as measured by Student's t -test from $n = 4$ wells. For each condition, the mean mixing score was measured in 4 wells (96-well plates). Kinase inhibitors (in red). Phosphatase inhibitor (in blue).

g. IC50 curves of the mixing score obtained from the analysis of 8 wells per conditions. Incubation time: 4 h. The IC50 values are reported for 4 compounds.

Figure 6

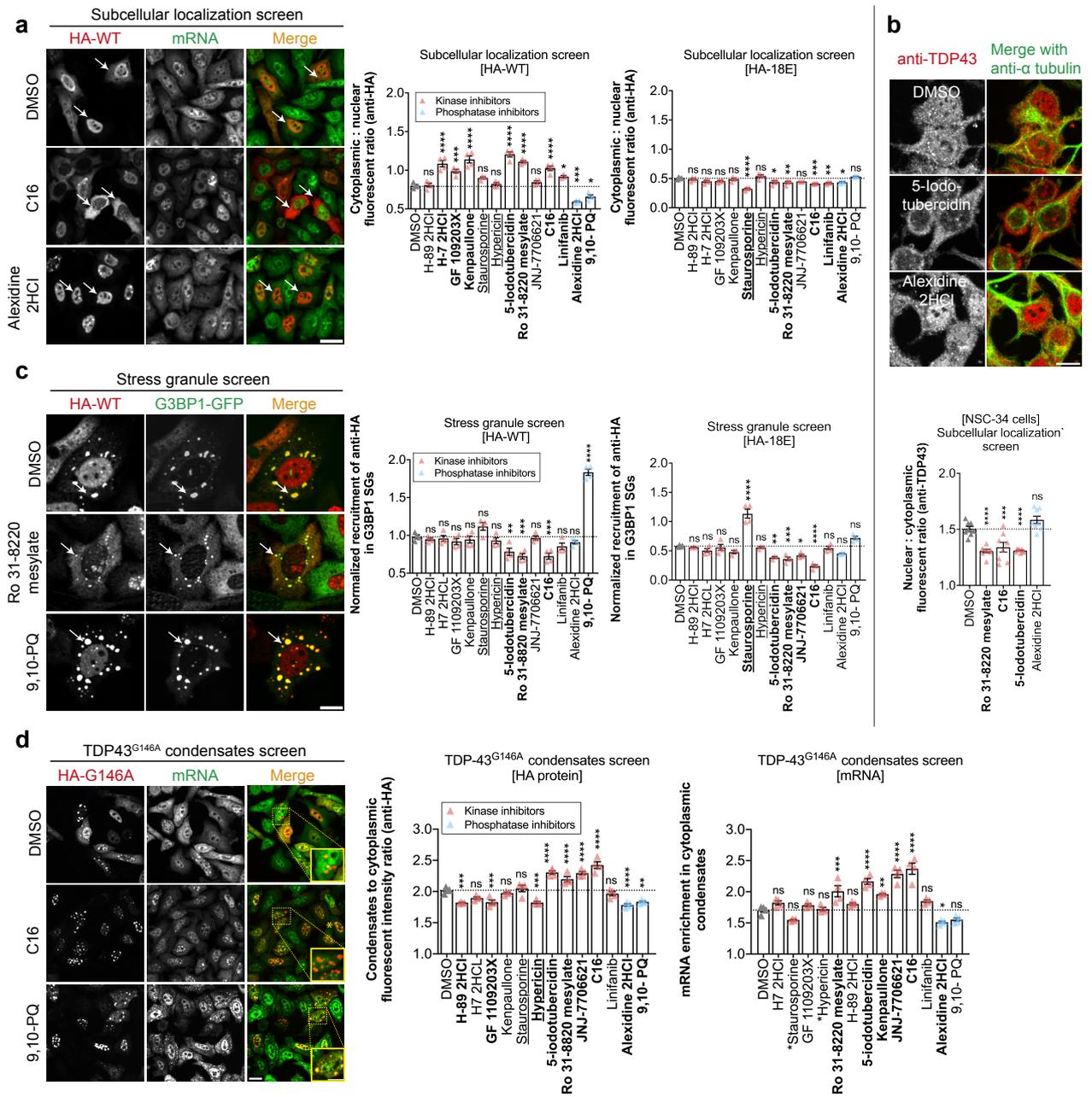


Figure 6: Selected kinase inhibitors antagonize the nuclear retention of TDP-43 in contrast with phosphatase inhibitors.

a. Left panel: Subcellular distribution of HA-tagged wild type TDP-43 in HeLa cells after treatment with the indicated compounds during 4 h (10 μ M). Poly(A) mRNA in green (poly-dT probe) and anti-HA in red. Arrows indicate representative cells. Scale bar: 50 μ m. Right panel: Automatic Quantification of the cytoplasmic:nuclear ratio of HA-tagged TDP-43 under indicated conditions. Each data point represents the mean ratio value obtained from a single well in a 96-well plate. As control, the cytoplasmic:nuclear ratio of the hyper-phosphomimetic mutant was measured under the same condition. Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001, ns. non-significant as measured by ANOVA test from $n = 4$ wells.

b. Upper panel: Subcellular distribution of HA-tagged wild type TDP-43 in undifferentiated mouse motor neuron-like hybrid cell line, NCS-34 cells, after treatment with the indicated compounds for 4 h (3 μ M). Poly(A) mRNA in green; anti-HA in red. Scale bar: 50 μ m. Lower panel: Automatic quantification of the nuclear:cytoplasmic ratio of HA-tagged TDP-43 under indicated conditions. Each data point represents the mean ratio value obtained from a single well. Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with *** p <0.001, **** p <0.0001, ns. non-significant as measured by ANOVA test from $n = 8$ wells.

c. Left panel: Recruitment of HA-tagged wild type TDP-43 in stress granules in HeLa cells expressing GFP-G3BP1 and treated with the indicated compounds during 4 h (10 μ M). Anti-HA in red. Arrows indicate representative stress granules. Scale bar: 20 μ m. Right panel: Automatic quantification of the recruitment of HA-tagged TDP-43 in stress granules under indicated conditions. Each data point represents the mean ratio value obtained from a single well in a 96-well plate. As control, the same ratio was measured with the hyper-phosphomimetic TDP-43 mutant (18E) under the same condition. Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001, ns. non-significant as measured by ANOVA test from $n = 4$ wells.

d. Left panel: Recruitment of HA-tagged G146A mutant in cytoplasmic condensates in HeLa cells treated with the indicated compounds during 4 h (10 μ M). Anti-HA in red. mRNA in green. Scale bar: 50 μ m. Zoom scale bar: 10 μ m. Right panel: Automatic quantification of the recruitment of HA-tagged G146A mutant into cytoplasmic condensates and their mRNA enrichment under indicated conditions. Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001, ns. non-significant as measured by ANOVA test from $n = 4$ wells.

Figure 7

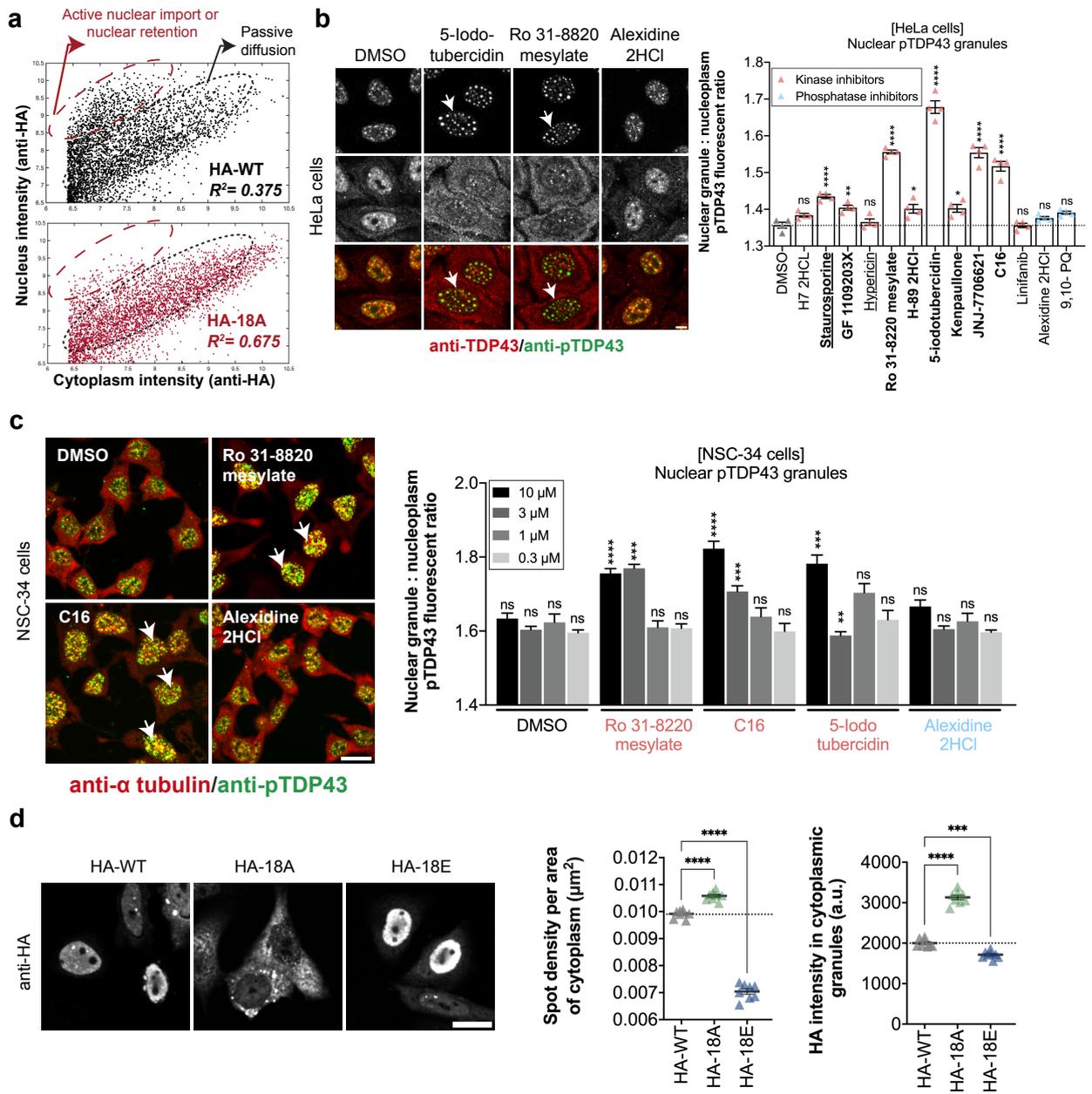


Figure 7: Kinase inhibitors and the hypo-phosphomimetic mutations (18A) impaired TDP-43 nuclear retention because of cytoplasmic TDP-43 self-assembly.

a. Scatter plot of subcellular distribution of HA-tagged wild type and hypo-phosphomimetic TDP-43. A linear regression with a high R^2 (0.675) shows that the level of cytoplasmic and nuclear hypo-phosphomimetic mutant increase linearly, as expected for a passive diffusion. On the other hand, in HeLa cells expressing wild type TDP-43, we observed a fraction of the cells with increased TDP-43 nuclear level. Each dot represents a single cell.

b. Left panel: Representative images of HeLa cells treated with the indicated compounds during 4 h (10 μ M). Red, endogenous TDP-43. Green, anti-phospho TDP-43 (Ser 409/410). Arrows indicate an increased brightness of anti-phospho-TDP-43 positive nuclear granules. Arrows show representative nuclear granules. Scale bar: 20 μ m. Right panel: Quantification of fluorescence ratio of anti-phospho TDP-43 inside versus outside nuclear granules. Only nuclei were selected for this analysis. Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with * p <0.05, ** p <0.01, **** p <0.0001, ns. non-significant as measured by ANOVA test from $n = 4$ wells.

c. Same as (b) with mouse motor neuron-like hybrid cell line NSC-34. Left panel: Representative images of NSC-34 cells. Red, tubulin. Green, anti-phospho TDP-43. Arrows show representative nuclear granules. Scale bar: 30 μ m. Right panel: statistical analysis. The effect was assessed for 4 concentrations of compounds. Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001, ns. non-significant as measured by ANOVA test from $n = 4$ wells.

d. Left panel: Representative images of HeLa cells expressing HA-tagged TDP-43 or indicated mutant. Arrows indicate representative cytoplasmic TDP-43 rich granules. Scale bar: 30 μ m. Zoom scale bar: 20 μ m. Right panel: Quantification of the anti-HA intensity in detected cytoplasmic spots and the density of spots per cytoplasm area. Each dot represents the mean value obtained over the selected cells in a single well. Error bars indicate SEM and the asterisks indicate statistical significance with *** p <0.001, **** p <0.0001, ns. non-significant as measured by ANOVA test from $n = 8$ wells.

Figure 8

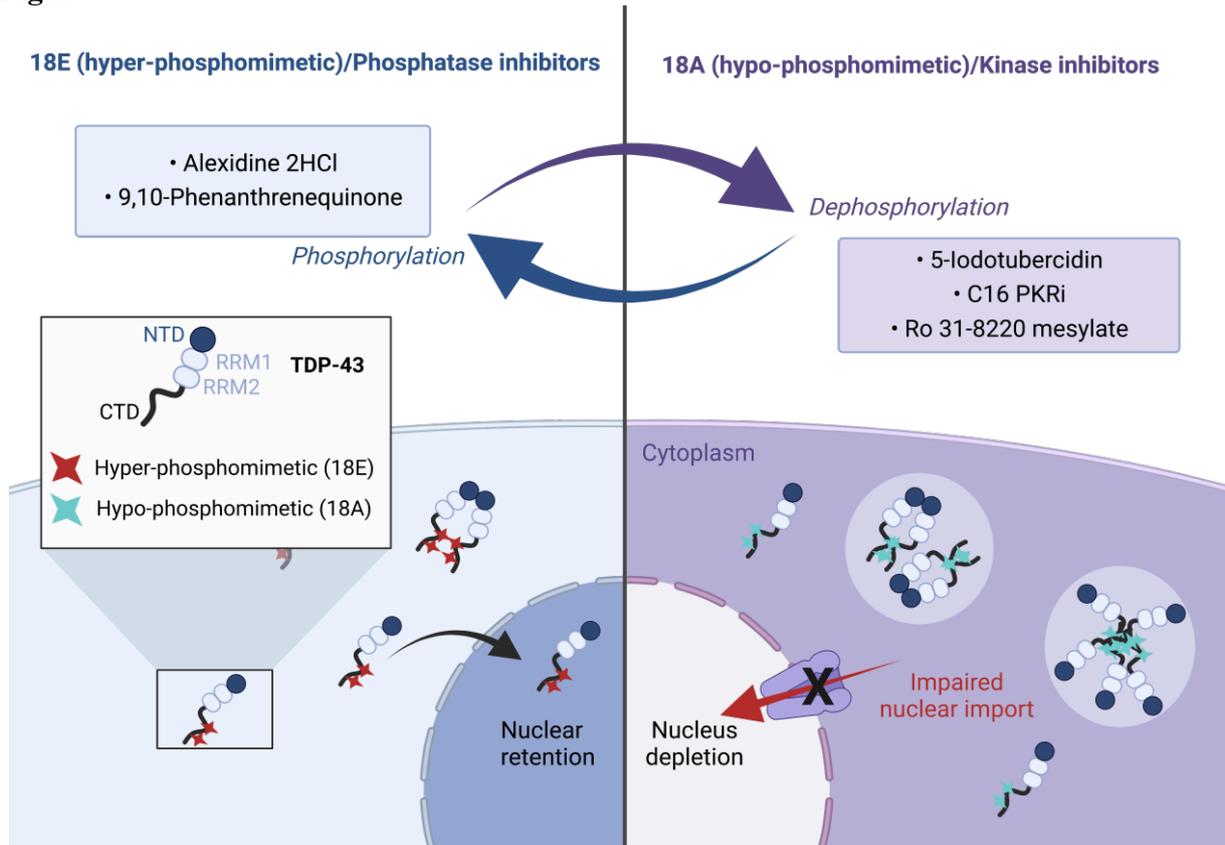
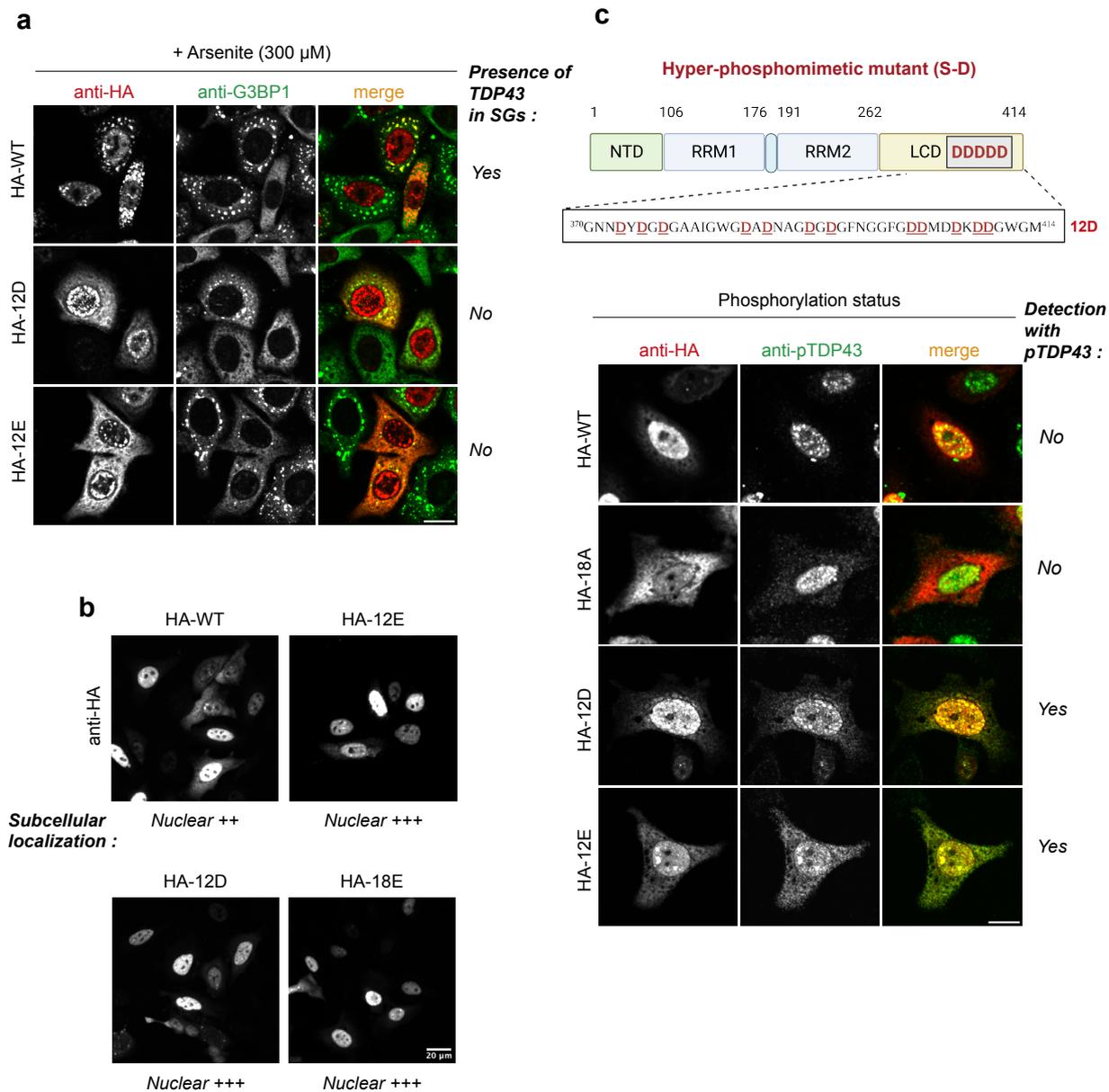


Figure 8: Schematic view on the link between phosphorylation of the C-terminal domain of TDP-43 and its sub-cellular location in cells.

According to our results, dephosphorylated state of TDP-43 promotes its cytoplasmic retention with cytoplasmic condensates as observed in the case of 18A mutant or in presence of protein kinase inhibitors. Indeed, the hypo-phosphorylation of TDP-43 in the cytoplasm positively regulates protein-protein interaction which antagonizes the import of cytoplasmic TDP-43 to the nucleus leading to TDP-43 nuclear depletion and its retention in the cytoplasm. In contrast, as observed for 18E mutant as well as in the presence of protein phosphatase inhibitors, phosphorylated TDP-43 is enriched in the nucleus.

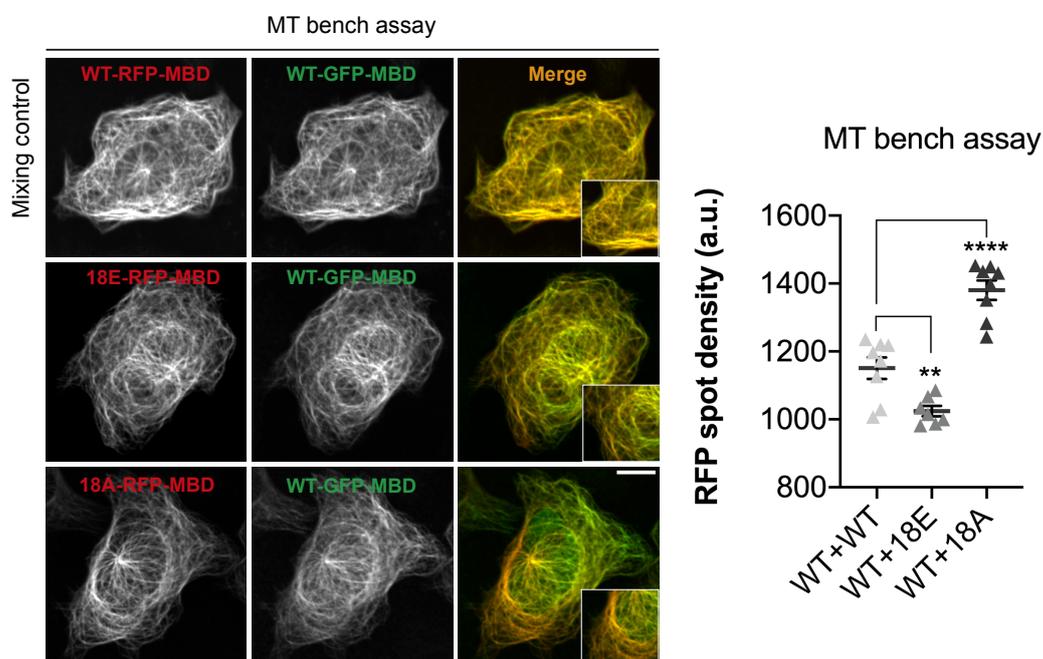
Supp 1



Supplementary Figure 1: Aspartate or glutamate hyper-phosphomimetic mutations display similar behaviors.

a. Representative images of HeLa cells expressing HA-tagged phosphomimetic mutants (12D-HA or 12E-HA) and G3BP1-GFP after 1 h-exposure to 300 μ M arsenite. G3BP1 in green; anti-HA in red. Scale bar: 50 μ m. b. Subcellular distribution of indicated HA-tagged phosphomimetic mutants expressed in HeLa cells 24 h after transfection. Scale bar: 20 μ m. c. Presentation of TDP43 hyper-phosphomimetic mutant 12D. Right panel: Images of HeLa cells expressing indicated HA-tagged protein and immune-stained with anti-phospho TDP43 antibody (Ser409/410). Hyper-phosphomimetic mutants are recognized by the antibody. Scale bar: 50 μ m.

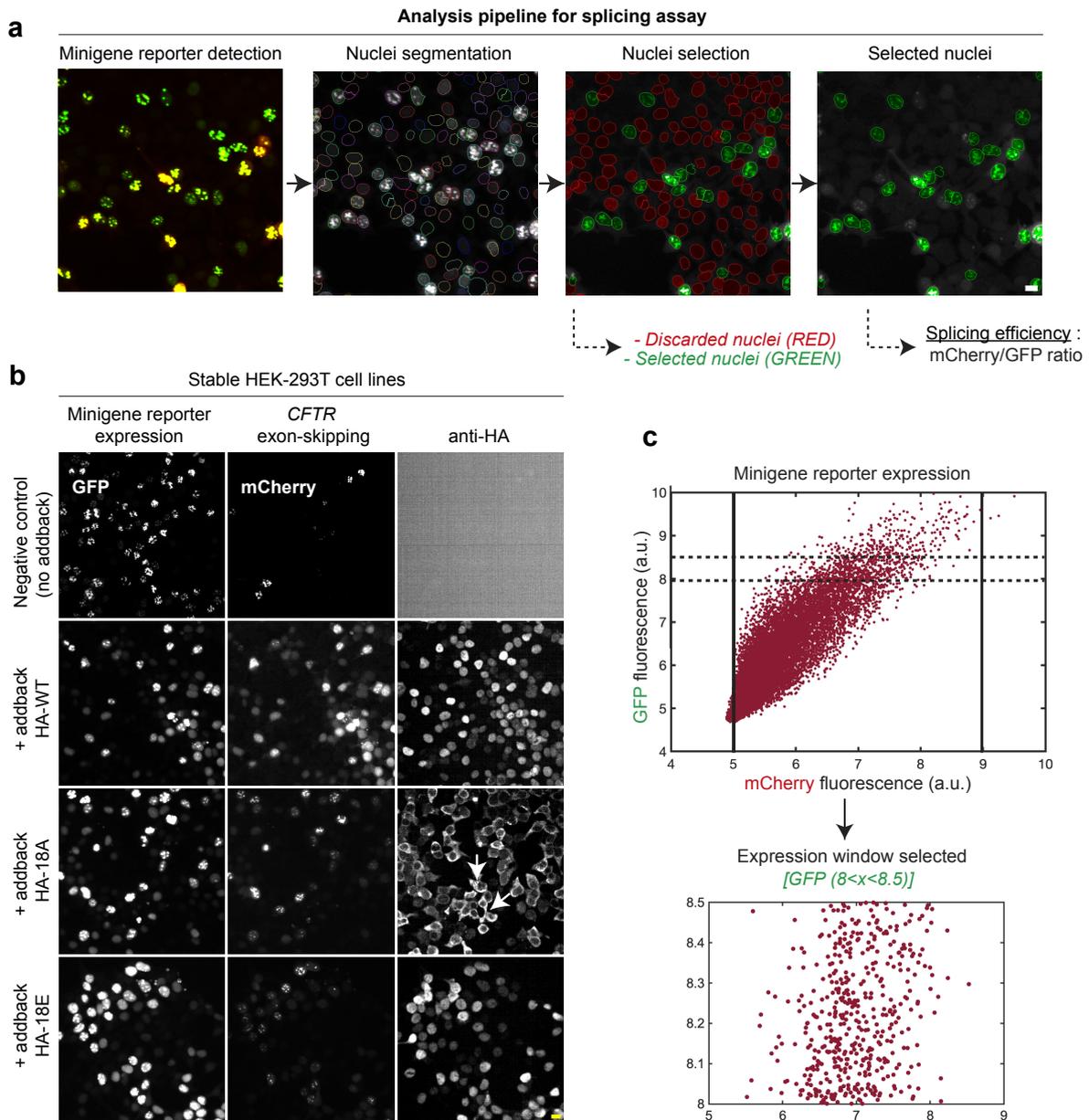
Supp 2



Supplementary Figure 2: Assessment of spot density from MT bench assay.

Left panel: Representative images of HeLa cells co-expressing indicated proteins used to measure their RFP spot density values. Scale bar: 30 μm . Zoom scale bar: 20 μm . Right panel: RFP spot density values (arbitrary unit) measured according to the indicated proteins. Note the high RFP spot density values for 18A-RFP-MBD protein. Error bars indicate SEM and the asterisks indicates statistical significance with $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, as measured by ANOVA test from $n = 8$ wells.

Supp 3

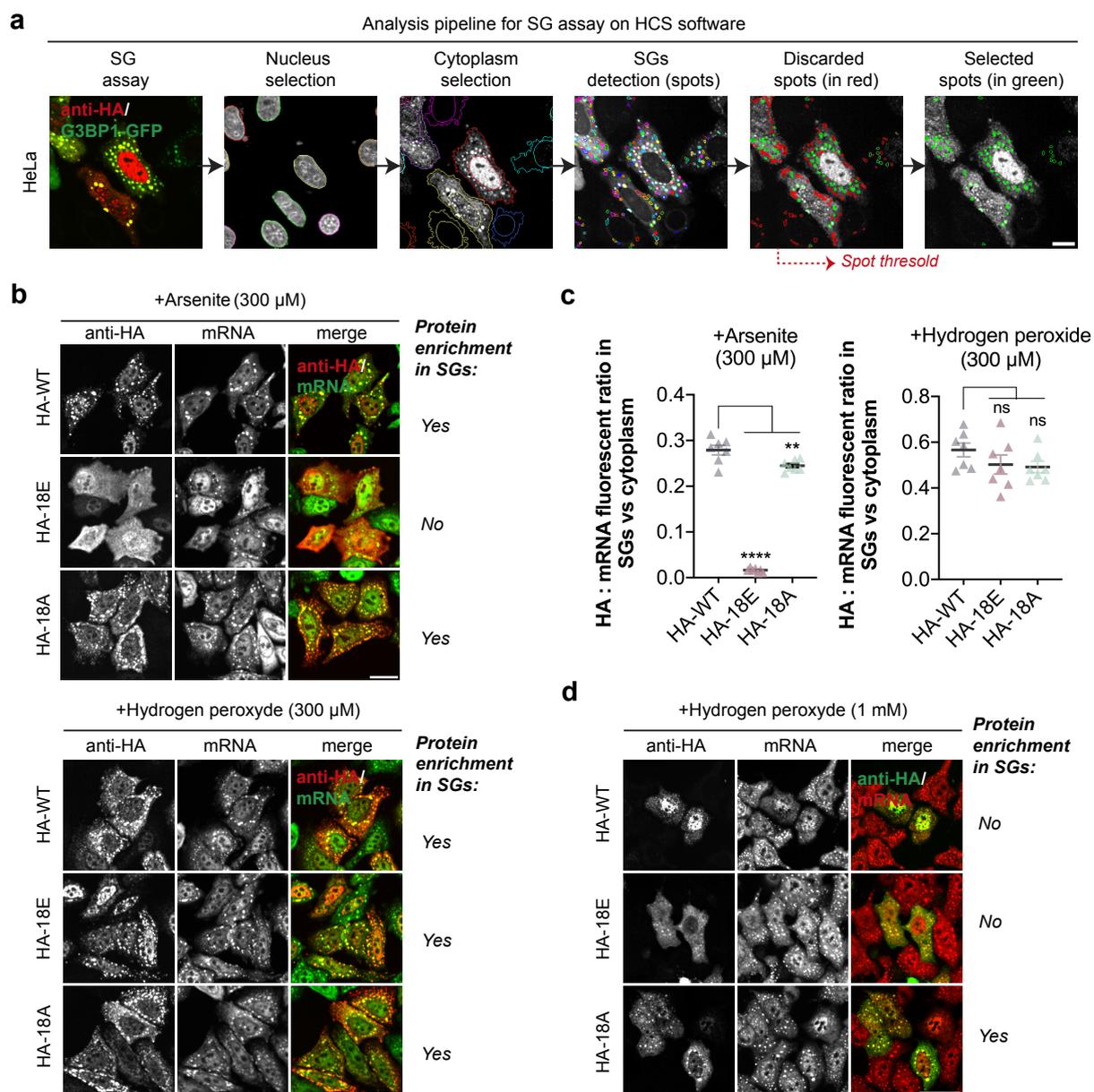


Supplementary Figure 3: Assessment of effect of phosphomimetic mutations in splicing assay.

a. Representative images of the splicing analysis method using the Harmony software associated to the HCS microscope. This pipeline allows the detection of HEK-293T cell nuclei that are filtered with average GFP and RFP intensity values higher than 2000 (a.u.) to calculate the mCherry:GFP ratio (splicing efficiency). Scale bar: 20 μ m. b. Representative image of stable shRNA HEK-293T cells under indicated conditions. Note the cytoplasmic localization of 18A- HA (as indicated by arrow). Scale bar: 20 μ m. c. Scatter plot of the relative GFP and RFP fluorescence intensity detected in all HEK-293T cells present in a single well under indicated

conditions. A GFP expression window was selected for all conditions ($8 < x < 8.5$) to homogenize the data and eliminate the background.

Supp 4



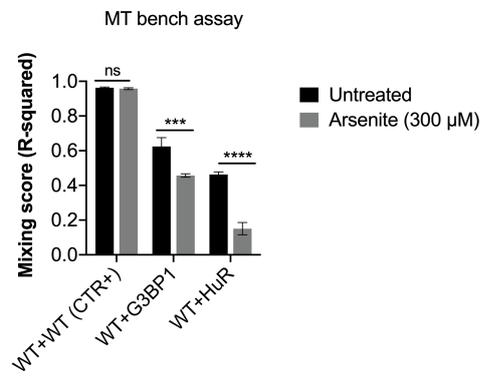
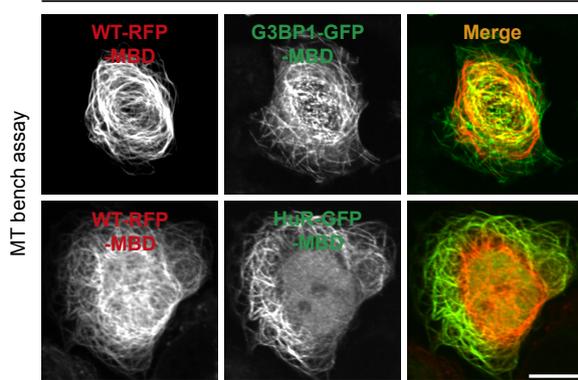
Supplementary Figure 4: Assessment of effect of phosphomimetic mutations in stress granules (SG) assay.

a. Representative images of the SG analysis method using the Harmony Software. This pipeline allows the detection of SGs (called spot). From HeLa cells co-transfected with the indicated plasmids, nuclei are first automatically detected, followed by cytoplasm, and finally spots. Spots are filtered by area ($<400 \text{ px}^2$), roundness (>0.8), length ($<5 \text{ }\mu\text{m}$). The filtered spots are quantified. Scale bar: $20 \text{ }\mu\text{m}$. **b.** Representative images of HeLa cells expressing HA-tagged wild type or phosphomimetic mutants and mRNA used to quantify the relative protein enrichment of HA-tagged protein after 1 h-exposure to $300 \text{ }\mu\text{M}$ arsenite or hydrogen peroxide. Note the loss of enrichment of 18E-HA after arsenite-type oxidative stress. Scale bar: $20 \text{ }\mu\text{m}$. **c.** Left panel: Automatic quantification of the recruitment of HA-tagged TDP43 mutants in SGs. Each dot represents the mean value over stress granules detected in a single well (96-well plate). Error bars indicate SEM and the asterisks indicates statistical significance with $**p<0.01$, $****p<0.0001$, ns. non-significant, as measured by ANOVA test from $n = 7$ wells. Right panel: Quantification of the recruitment of HA-tagged wild-type TDP43 or phosphomimetic mutants in SGs after 1 h-exposure to $300 \text{ }\mu\text{M}$ hydrogen peroxide. Note the absence of effect of hydrogen peroxide-type oxidative stress on the recruitment of HA-tagged protein in SGs. ns. non-significant, ANOVA test from $n = 7$ wells. **d.** Representative images of HeLa cells expressing HA-tagged wild-type TDP43 or phosphomimetic mutants and mRNA to quantify the relative protein enrichment of HA-tagged protein after 1h-exposure to $300 \text{ }\mu\text{M}$ (upper panel) and 1 mM (center panel) hydrogen peroxide (H_2O_2). Note the enrichment of 18A-HA in the SGs despite the high hydrogen peroxide concentrations. However, high concentrations of H_2O_2 ($>300 \text{ }\mu\text{M}$) prevent the recruitment of wild type and TDP-43 hyper-phosphomimetic mutant in stress granules in the cytoplasm. Scale bar: $50 \text{ }\mu\text{m}$.

Supp 5

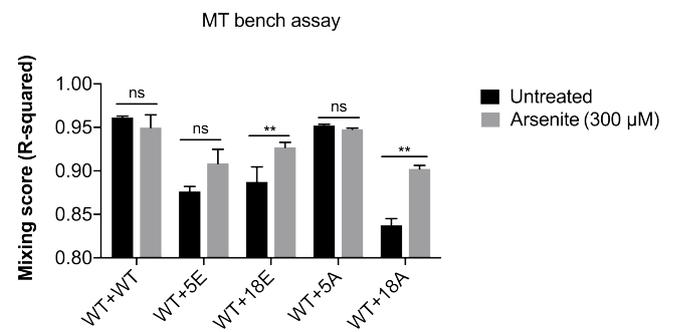
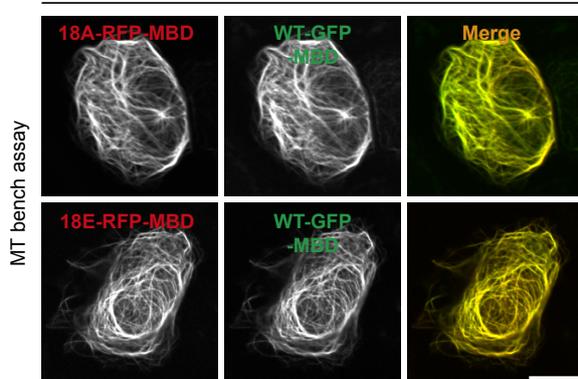
a

+Arsenite (300 μ M)



b

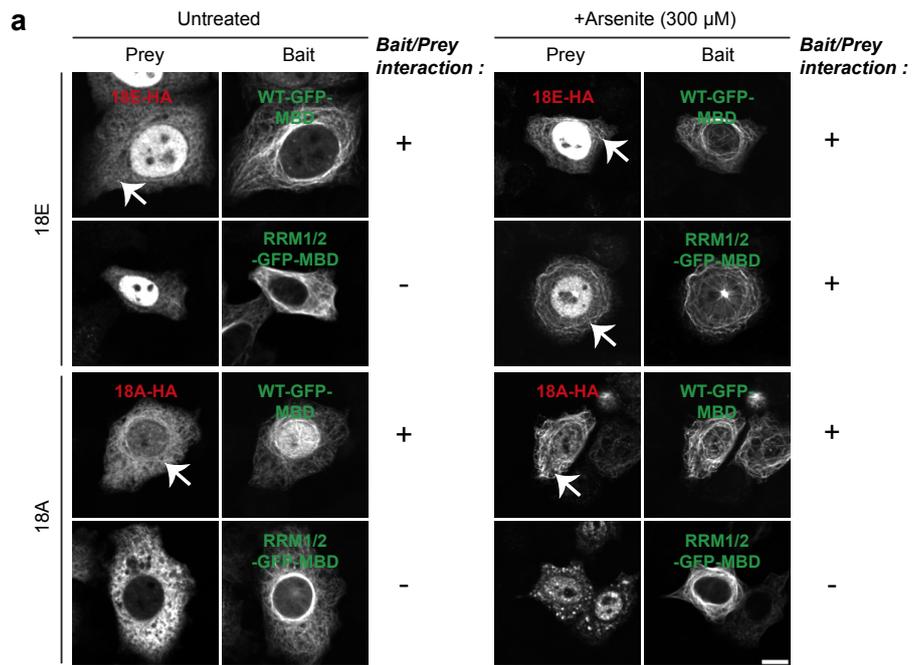
+Arsenite (300 μ M)



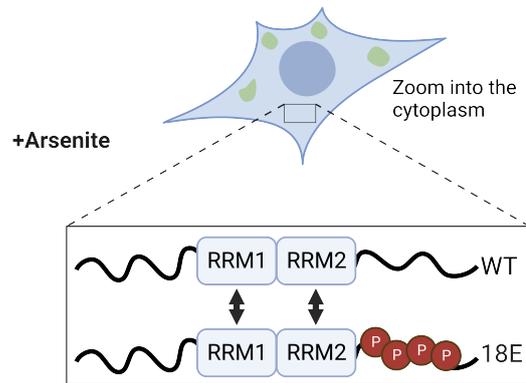
Supplementary Figure 5: MT bench assay to probe the TDP-43 aggregation process.

a. Left panel: Representative images of HeLa cell co-expressing indicated proteins after 1 h-exposure to 300 μ M arsenite to measure their mixing along the microtubule network (MT bench assay). Scale bar: 50 μ m. Right panel: Mixing score (R^2 values) measured in HeLa cells expressing wild type TDP-43 and the indicated wild-type RNA-binding proteins (G3BP1 and HuR). Note the important de-mixing of these RBPs with the wild-type TDP43. Error bars indicate SEM and the asterisks indicates statistical significance with *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns. non-significant, as measured by Student's t-test from $n = 4$ wells. b. Left panel: Representative images of HeLa cell co-expressing indicated proteins after 1 h-exposure to 300 μ M arsenite to measure their mixing along the microtubule network (MT bench assay). Scale bar: 50 μ m. Right panel: Mixing score (R^2 values) measured in HeLa cells expressing wild type TDP-43 and the indicated phosphomimetic TDP-43 mutants. Note the opposite effect with phosphomimetic mutants. Error bars indicate SEM and the asterisks indicates statistical significance with * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$, ns. non-significant, as measured by Student's t-test from $n = 4$ wells.

Supp 6



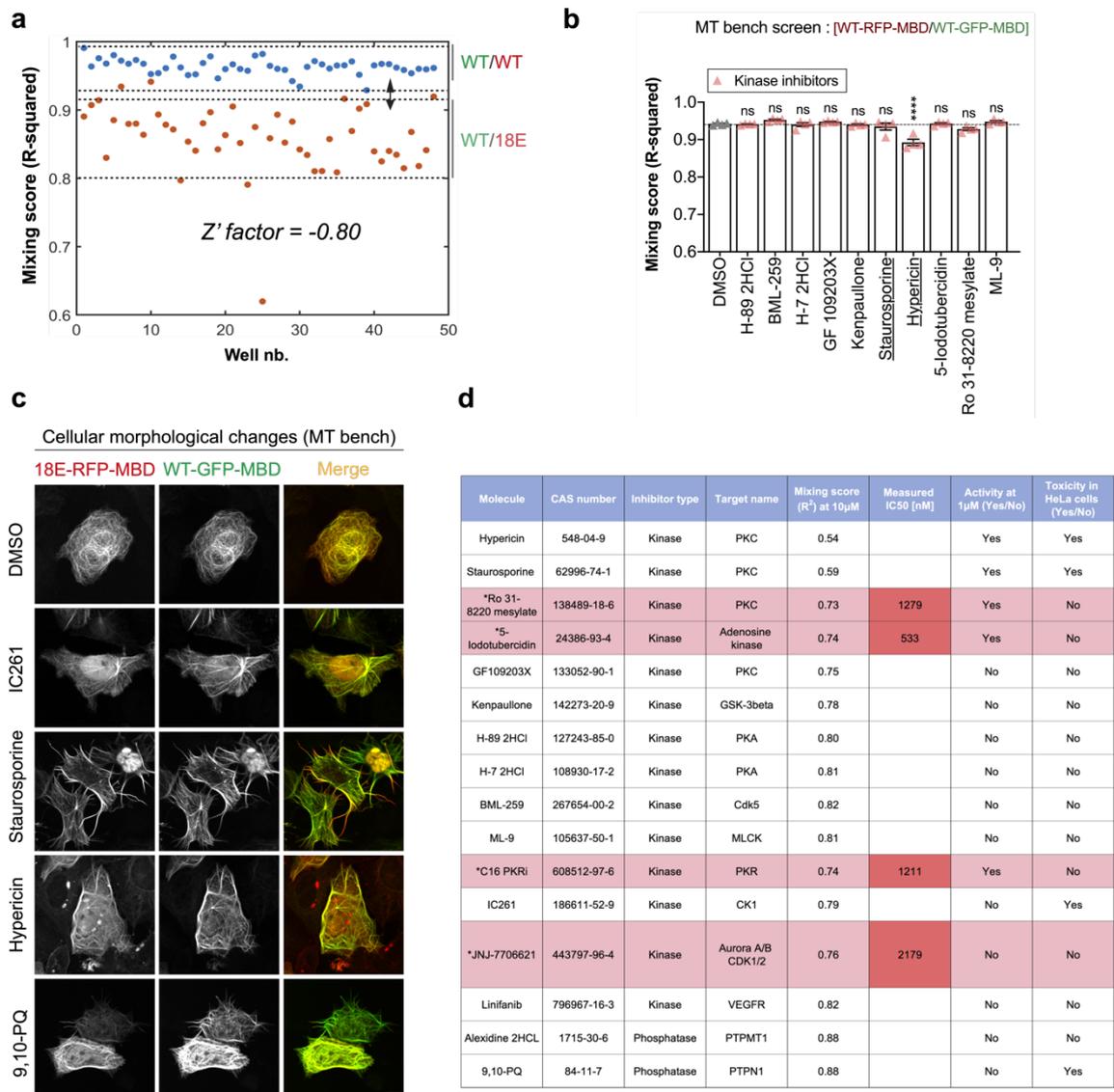
b 18E/WT interaction via RRM1/2 domains after exposure to oxidative stress



Supplementary Figure 6: TDP-43 RRM1/2 domains was brought as a bait onto microtubules to probe the recruitment onto microtubules of hyper- and hypo-phosphomimetic mutants, used as the prey, in the presence of arsenite.

a. Representative images of HeLa cells co-expressing HA-tagged phosphomimetic mutants as prey and the indicated TDP43 mutant fused to microtubule-binding domain as bait to probe the interaction between bait/prey in the presence or absence of arsenite (300 μ M, 1 h). Note the hyper-phosphomimetic (18E) mutant is recruited onto microtubules in the presence of arsenite but not the hypo-phosphomimetic (18A) mutant. Scale bar: 20 μ m. b. Schematic view representing the results obtained with the Bait/Prey interaction assay. Under acute oxidative stress, including arsenite stress, the hyper-phosphomimetic mutant (18E) interact with wild type TDP-43 through their RRM domains leading to the exclusion of TDP-43 from stress granules and found in the cytoplasm as 18E mutant. However, in the same stress conditions, the hypo-phosphomimetic mutant is found located in the stress granules in the cytoplasm.

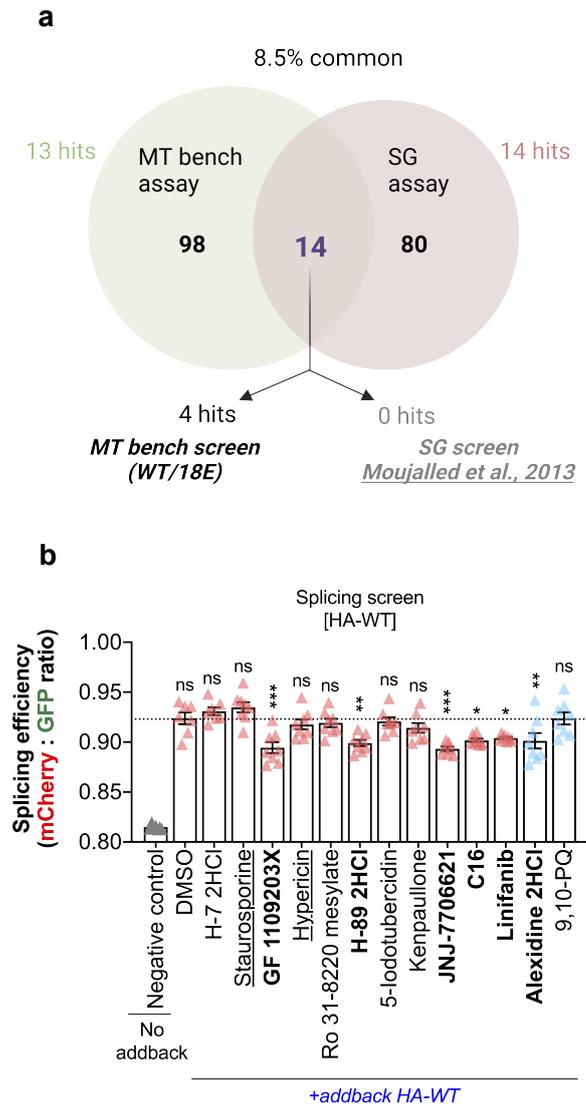
Supp 7



Supplementary Figure 7: Assessment of effect of kinase inhibitors on mixing score of wild type TDP-43 with the hyper-phosphomimetic mutant (18E).

a. Mixing score of wild-type TDP43 in a 96-well plate. Each condition was run in 48 wells. Z' factor is -0.80 , which corresponds to a very bad assay for compounds increasing the mixing score. There is too much overlap between the wt/wt and wt/18E for the assay to be useful. Note that this is the reason why we did not choose these conditions for the MT bench screen. b. Mixing score (R^2 values) of wt TDP-43 with itself measured with the MT bench assay in HeLa cells. Note that no compound can change the mixing of TDP-43 with itself, as expected, except hypericin due to morphological changes or toxicity. Error bars indicate SEM and the asterisks indicates statistical significance with **** $p < 0.0001$, ns. non-significant, as measured by ANOVA test from $n = 4$ wells. c. Representative images of HeLa cells co-expressing the indicated proteins after treatment with indicated hit compounds. Scale bar: $30 \mu\text{m}$. d. Summary table of hit compounds discovered using the MT bench assay over the screening system.

Supp 8



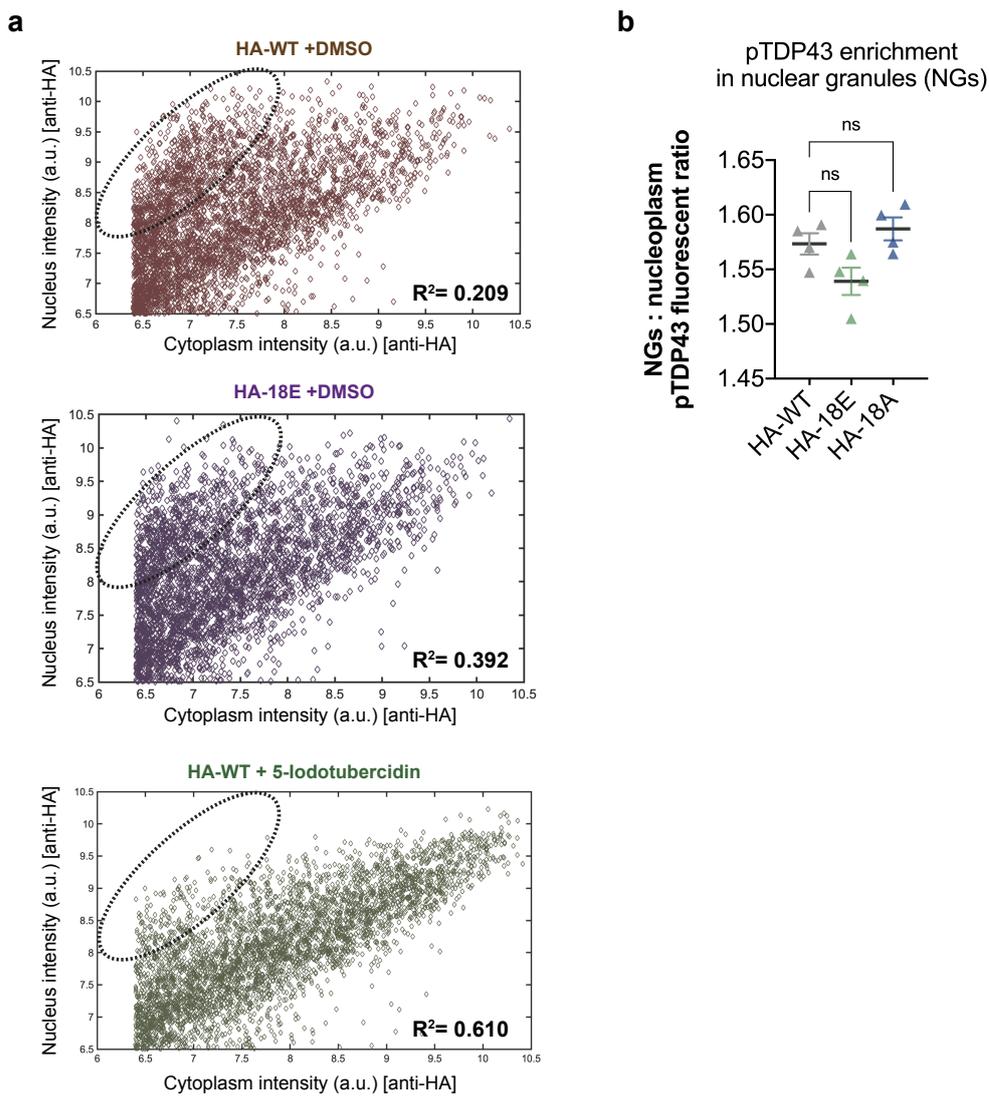
Supplementary Figure 8: Assessment of effect of the compound hits on splicing TDP-43-dependent assay.

a. Venn diagram showing the total number of kinase inhibitors tested for MT bench assay and SGs assay (98 and 80, respectively), together with those commonly tested in both screens (14 which represents 8.5

% total). From these 14 common kinase inhibitors, 4 hits were obtained from the MT bench assay and none from the SGs assay. Independently of these common 14 molecules, hits were obtained from both assays (13 and 14 hits from MT bench and SGs, respectively). b. Quantitative analysis of the splicing efficiency under indicated condition at the single cell level and after treatment with the indicated compounds during 4 h (10 μ M). Each dot represents the average values in selected HEK-293T cells in a single well. Error bars indicate SEM and the asterisks indicates statistical significance with * p <0.05,

** p <0.01, *** p <0.001, ns. non-significant, as measured by ANOVA from $n = 8$ wells.

Supp 9



Supplementary Figure 9: Subcellular distribution of TDP-43 and phosphomimetic mutants.

a. Scatter plot of subcellular distribution of indicated HA-tagged TDP43 treated with DMSO or kinase inhibitor. A linear regression shows that in HeLa cells expressing wild-type TDP43 treated with 5-Iodotubercidin kinase inhibitors, a fraction of the cell with increased TDP43 cytoplasmic level with a significant decrease in the nuclear fraction (see circle). Each dot represents a single cell. R^2 are indicated for each condition. b. Quantification of the nuclear granule:nucleoplasm intensity ratio from cells expressing the indicated HA tagged TDP43 and stained with anti-phospho TDP-43 antibody (Ser 409/410). ns. non-significant, as measured by ANOVA from $n = 4$ wells.

Table S1. Plasmids used for MT bench assay

Name	Sequence	Tag	References
TDP-43	FL (1-414)	RFP-MBD or GFP-MBD	Maucuer, et al. J Cell Sci. 2018
TDP-43	FL (1-414)	GFP	Boca et al., 2015
G3BP1	FL (1-466)	GFP-MBD	Maucuer, et al. J Cell Sci. 2018
G3BP1	FL (1-466)	GFP	Boca et al., 2015
HuR	FL (1-326)	GFP-MBD	Maucuer, et al. J Cell Sci. 2018
RRM1/2 (TDP-43 RRM1/2)	98-264	GFP-MBD	Rengifo et al. (2021)

Table S2. Primers used to construct TDP-43 hyper- or hypo-phosphorylated mutants for MT bench experiments.

Name	Tag	Sense primer (bearing NdeI restriction site)	Antisense primer (bearing AscI restriction site)
5E	RFP-MBD	GTAATGTCACAGCGA CATATGATAG	GCGGGCGCGCCAACA TTCCCCAGCCAGAAG ACTTAGAATCC
18E	RFP-MBD	GTAATGTCACAGCGA CATATGATAG	ATTGCGGGCGCGCCA ACATTCC
18E	GFP-MBD	GTAATGTCACAGCGA CATATGATAG	ATTGCGGGCGCGCCA ACATTCC
5A	RFP-MBD	GTAATGTCACAGCGA CATATGATAG	GCGGGCGCGCCAACA TTCCCCAGCCAGAAG ACTTAGAATCC
18A	RFP-MBD	GTAATGTCACAGCGA CATATGATAG	ATTGCGGGCGCGCCA ACATTCC
12D	RFP-MBD	GTAATGTCACAGCGA CATATGATAG	ATTGCGGGCGCGCCA ACA TTC C
12E	RFP-MBD	GTAATGTCACAGCGA CATATGATAG	ATTGCGGGCGCGCCA ACATTCC

Table S3. Alignment of C-terminal part of wild type TDP-43 and its hyper- or hypo- phosphomimetic mutants.

Alignment of C-terminal part of wild type TDP-43 and its hyper-phosphomimetic mutants with substitution of serine by glutamic residue (showed in red):

```
TDP-43 (WT) KQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTEDELREFFSQQYGDVMDVFIKPPFRAFAFVTFADDQIA 240
5E          KQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTEDELREFFSQQYGDVMDVFIKPPFRAFAFVTFADDQIA
18E          KQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTEDELREFFSQQYGDVMDVFIKPPFRAFAFVTFADDQIA

TDP-43 (WT) QSLCGEDLIIKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQGGFGNSRGGGAGLG 300
5E          QSLCGEDLIIKGISVHISNAEPKHNENRQLEREGRFGGNPGGFGNQGGFGNERGGGAGLG
18E          QSLCGEDLIIKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQGGFGNSRGGGAGLG

TDP-43 (WT) NNQGSNMGGGMNFGAFSINPAMMAAAQAALQSSWGMMGLASQQNQSGPSSGNNQNGNMQ 360
5E          NNQGENMGGGMNFGAFEINPAMMAAAQAALQSSWGMMGLASQQNQSGPSSGNNQNGNMQ
18E          NNQGSNMGGGMNFGAFSINPAMMAAAQAALQEEWGMMGLAEQQNQEGPEGNNQNGNMQ

TDP-43 (WT) REPNQAFGSGNNSYSGSNSGAAIGWGSASNAGSGSGFNNGGFGSSMDSKSSGWGM 414
5E          REPNQAFGSGNNSYSGSNSGAAIGWGSASNAGSGSGFNNGGFGSSMDSKSSGWGM
18E          REPNQAFGEGNNSEGENEGAAIGWGEEAENAGEGEGFNNGGFGEEMDEKEEGWGM
```

Alignment of C-terminal part of wild type TDP-43 and its hypo-phosphomimetic mutants with substitution of serine by alanine residue (showed in blue):

```
TDP-43      KQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTEDELREFFSQQYGDVMDVFIKPPFRAFAFVTFADDQIA 240
5A          KQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTEDELREFFSQQYGDVMDVFIKPPFRAFAFVTFADDQIA
18A          KQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTEDELREFFSQQYGDVMDVFIKPPFRAFAFVTFADDQIA

TDP-43      QSLCGEDLIIKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQGGFGNSRGGGAGLG 300
5A          QSLCGEDLIIKGISVHISNAEPKHNANRQLERAGRFGGNPGGFGNQGGFGNARGGGAGLG
18A          QSLCGEDLIIKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQGGFGNSRGGGAGLG

TDP-43      NNQGSNMGGGMNFGAFSINPAMMAAAQAALQSSWGMMGLASQQNQSGPSSGNNQNGNMQ 360
5A          NNQGANMGGGMNFGAFAINPAMMAAAQAALQSSWGMMGLASQQNQSGPSSGNNQNGNMQ
18A          NNQGSNMGGGMNFGAFSINPAMMAAAQAALQAAWGMMGLAAQQNQAGPAGNNQNGNMQ

TDP-43      REPNQAFGSGNNSYSGSNSGAAIGWGSASNAGSGSGFNNGGFGSSMDSKSSGWGM 414
5A          REPNQAFGSGNNSYSGSNSGAAIGWGSASNAGSGSGFNNGGFGSSMDSKSSGWGM
18A          REPNQAFGAGNNSYAGANAGAAIGWGAANAGAGAGFNNGGFGAAMDAKAAGWGM
```

Alignment of C-terminal part of wild type TDP-43 and its hyper-phosphomimetic mutants with substitution of serine by aspartic or glutamic acid residues (red):

```
TDP-43 (WT) KQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTEDELREFFSQQYGDVMDVFIKPPFRAFAFVTFADDQIA 240
12D          KQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTEDELREFFSQQYGDVMDVFIKPPFRAFAFVTFADDQIA
12E          KQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTEDELREFFSQQYGDVMDVFIKPPFRAFAFVTFADDQIA

TDP-43 (WT) QSLCGEDLIIKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQGGFGNSRGGGAGLG 300
12D          QSLCGEDLIIKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQGGFGNSRGGGAGLG
12E          QSLCGEDLIIKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQGGFGNSRGGGAGLG

TDP-43 (WT) NNQGSNMGGGMNFGAFSINPAMMAAAQAALQSSWGMMGLASQQNQSGPSSGNNQNGNMQ 360
12D          NNQGSNMGGGMNFGAFSINPAMMAAAQAALQSSWGMMGLASQQNQSGPSSGNNQNGNMQ
12E          NNQGSNMGGGMNFGAFSINPAMMAAAQAALQSSWGMMGLASQQNQSGPSSGNNQNGNMQ

TDP-43 (WT) REPNQAFGSGNNSYSGSNSGAAIGWGSASNAGSGSGFNNGGFGSSMDSKSSGWGM 414
12D          REPNQAFGSGNNSYDGDNDGAAIGWGDADNAGDGDGFNNGGFGDDMDKDDGWGM
12E          REPNQAFGSGNNSYEGENEGAAIGWGEEAENAGEGEGFNNGGFGEEMDEKEEGWGM
```

Table S4. Primers used for to construct TDP-43 mutants in HA-tag plasmid.

Plasmid name	Tag	Sense Primer (bearing NdeI restriction site)	Antisense primer (bearing XhoI restriction site)
HA-5E	HA	GTAATGTCACA GCGACATATGA T AG	AATTTCTCGAGTTACATTCCCCA G CCAGAAGACTTAGAATCC
HA-18E	HA	GTAATGTCACA GCGACATATGA T AG	AATTTCTCGAGTTACATTCCCCA G CCTTCCTCCTTTTCATCC
HA-5A	HA	GTAATGTCACA GCGACATATGA T AG	AATTTCTCGAGTTACATTCCCCA G CCAGAAGACTTAGAATCC
HA-18A	HA	GTAATGTCACA GCGACATATGA T AG	AATTTTCTCGAGTTACATTCCCC A GCCAGCTGCCTTAGCATCC
HA-12D	HA	GTAATGTCACA GCGACATATGA T AG	GAT ATA GTC GAG TTA CAT TCC CCA GCC ATC ATC CTT ATC ATC
HA-12E	HA	GTAATGTCACA GCGACATATGA T AG	AATTTCTCGAGTTACATTCCCCA G CCTTCCTCCTTTTCATCC

Table S5. Sequence of shRNA from the TRC library used in this study.

Gene name	shRNA name	Type	Sequence
<i>TARDBP</i>	TRCN000001603 8	TRC human shRNA (Lentiviral)	GCTCTAATTCTGGTGCAGC AA

Table S6. Primers used for shRNA resistance (splicing assay).

Plasmid name	Tag	Sense primer	Anti-sense primer
HA-rTDP-43 (WT)	HA	GTGGCTCTAATTC TGGGGCGGC GATTGGTTGGGGA TCAGC	GCTGATCCCCAACCAAT CGCCGC CCCAGAATTAGAGCCA C
HA-r5E	HA	GTGGCTCTAATTC TGGGGCGGC GATTGGTTGGGGA TCAGC	GCTGATCCCCAACCAAT CGCCGC CCCAGAATTAGAGCCA C

HA-r18E	HA	GAGGGCGAAAATG AGGGGGCG GCGATTGGTTGGG GAGAAGC	GCTTCTCCCCAACCAAT CGCCGC CCCCTCATTTTCGCCCT C
HA-r5A	HA	GTGGCTCTAATTC TGGGGCGGC GATTGGTTGGGGA TCAGC	GCTGATCCCCAACCAAT CGCCGC CCCAGAATTAGAGCCA C
HA-r18A	HA	CTGGCGCAAATGC TGGGGCGG CGATTGGTTGGGG AGCAGC	GCTGCTCCCCAACCAAT CGCCGC CCCAGCATTTGCGCCAG

Table S7. List of primary and secondary antibodies used for IF.

Name	Species	Epitope	Dilution	Reference
anti-TDP43	Mouse	AA 1-260 (N-ter)	IF (1:1000)	mAb ABnova H00023435-M01
anti-TDP43	Rabbit	(C-ter)	IF (1:1000)	pAb Proteintech 12892-1-AP
anti-HA	Mouse	HA tag (YPYDVPDY A)	IF (1:1000)	mAb Santa Cruz Biotechnology Sc-7392
anti-HA	Rabbit	HA tag (YPYDVPDY A)	IF (1:1000)	pAb Proteintech 51064-2-AP
anti-pTDP43 (S409/410)	Rabbit	Ser409/Ser410	IF (1:3000)	pAb Proteintech 22309-1-AP
anti- α -Tubulin	Mouse	AA 426-430 (C-ter)	IF (1:1000)	mAB Sigma- Aldrich T5168

Table S8. List of secondary antibodies used for IF.

Name	Species	Epitope	Dilution	Reference
Alexa Fluor 594	Mouse	IgG	IF (1 :1000)	Invitrogen A11005
Alexa Fluor 488	Rabbit	IgG	IF (1 :1000)	Invitrogen A11008

IR Dye 680 RD	Rabbit	IgG	IF (1 :1000)	LI-COR 926-68071
------------------	--------	-----	--------------	---------------------

Table S9. List of kinase inhibitor names and their target.

<i>Number</i>	<i>Name</i>	<i>Target</i>
1	PD98059	MEK
2	U0126	MEK
3	SB 203580	p38 MAPK
4	H-7 2HCl	PKA, PKG, MLCK
5	H-9 HCl	PKA, PKG, MLCK, PKC
6	Staurosporine	Pan-specific
7	AG 494	EGFRK, PDGFRK
8	AG 825	HER1-2
9	Lavendustin A	EGFRK
10	RG-1462	EGFRK
11	Tyrphostin 23	EGFRK
12	Tyrphostin 25	EGFRK
13	Tyrphostin 46	EGFRK
14	Tyrphostin 47	EGFRK
15	Tyrphostin 51	EGFRK
16	Tyrphostin 1	Negative control for tyrosine kinase
17	Tyrphostin AG 1288	Tyrosine kinases
18	Tyrphostin AG 1478	EGFRK
19	Tyrphostin AG 1295	Tyrosine kinases
20	Tyrphostin 9	PDGFRK
21	PKC 412	PKC
22	Piceatannol	Syk
23	PP1	Src family
24	AG-490	JAK-2
25	AG-126	IRAK
26	AG-879	NGFRK
27	LY 294002	PI 3-K
28	Wortmannin	PI 3-K
29	GF 109203X	PKC
30	Hypericin	PKC
31	Ro 31-8220 mesylate	PKC
32	D-Erythro- Sphingosine	PKC
33	H-89 2HCl	PKA
34	HA-1004 HCl	PKA, PKG
35	HA-1077 2HCl	PKA, PKG
36	2-Hydroxy-5-(2,5-dihydroxybenzyl amino) benzoic acid	EGFRK, CaMK II
37	KN-62	KN-62
38	KN-93	KN-93
39	ML-7 HCl	MLCK
40	ML-9 HCl	MLCK
41	2-Aminopurine	p58 PITSLRE beta1

42	N9-isopropyl olomoucine	CDK
43	Olomoucine	CDK
44	Iso-olomoucine	Negative control for olomoucine
45	Roscovitine	CDK
46	5-iodotubericidin	ERK2, CK1, CK2
47	LFM-A13	BTK
48	SB-202190	p38 MAPK
49	PP2	Src family
50	ZM-336372	cRAF
51	SU 4312	Flk1
52	AG 1296	PDGFRK
53	GW 5074	cRAK
54	Palmitoyl-D L- carnitine	PKC
55	Rottlerin	PKC delta
56	Genistein	Tyrosine kinases
57	Daidzein	Negative control for genistein
58	Erbstatin analog	EGFRK
59	Quercetin 2H2O	PI 3-K
60	SU1498	Flk1
61	ZM 449829	JAK-3
62	BAY 11-7082	IKK pathway
63	5,6-dichloro-1-β-D- ribofuranosylbenzimi dazole	CK II
64	2,2',3,3',4,4'- Hexahydroxy-1,1'- biphenyl- 6,6'dimethanol dimethyl ether	PKC alpha, PKC gamma
65	SP 600125	JNK
66	Indirubin	GSK-3beta, CDK5
67	Indirubin-3'- monooxime	GSK-3beta
68	Y-27632 2HCl	ROCK
69	Kenpauillone	GSK-3beta
70	Terreic acid	Btk
71	Triciribin	Akt signaling
72	BML-257	Akt
73	SC-514	IKK2
74	BML-259	Cdk5/p25
75	Apigenin	CK-II
76	BML-259	Cdk5/p25
77	Rapamycin	mTOR
78	H-89 2HCl	PKA
79	AG-370	PDGFRK
80	HNMPA	Tyrosine kinases
81	Y-27632 dihydrochloride	ROCK
82	Imatinib mesylate	BCR-ABL
83	Sorafenib tosylate	Tyrosine kinases
84	TC-S 7004	DYRK1A/B
85	JNJ-7706621	CDK1/2
86	C16 PKRi	PKR
87	CX-4945	CK2
88	SR-3029	CK1δ/ε
89	GSK-3 inhibitor XVI	GSK-3
90	IC261	CK1δ/ε
91	Binimetinib	MEK

92	Ibrutinib	BTK
93	PF-670462	CK1 δ , p38, EGFR
94	BMS-536924	IGF-1R/IR
95	AC-480	HER1/2
96	Enzastaurin	PKC
97	Linifanib	VEGFR/PDGFR
98	Saracatinib	BTK, EGFR, Src

Table S10. List of phosphatase inhibitor names and their target.

<i>Number</i>	<i>Name</i>	<i>Target</i>
1	Cantharidic acid	PP2A
2	Cantharidin	PP1/2
3	Endothall	PP2A
4	L-p bromotetramisole oxalate	Alkaline phosphatase
5	RK-682	PTP1B
6	LEVAMISOL HCL	Alkaline phosphatase
7	TETRAMISOLE HCL	Alkaline phosphatase
8	CYPERMETHRIN	PP2B
9	Deltamethrin	Calcineurin (PP2B)
10	Fenvalerate	Calcineurin (PP2B)
11	Tyrphostin 8	Calcineurin (PP2B)
12	CinnGel	PTP1B
13	NSC-95397	Cdc25
14	BN-82002	Cdc25
15	Shikonin	PTP1B
16	NSC-663284	Cdc25
17	Cyclosporin A	PTP1B
18	Pentamidine	PRL
19	BVT-948	PTP
20	B4-Rhodanine	PRL3
21	Alexidine 2HCl	PTPMT1
22	9,10-Phenanthrene-quinone	CD45
23	BML-260	DUSP22
24	Sanguinarine chloride	PP2C
25	BML-267	PTP1B
26	OBA	Tyrosine phosphatases
27	OBA ester	Tyrosine phosphatases (cell permeable)
28	Gossypol	5 α -reductase 1 and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase
29	Vorinostat	HDAC
30	Citicoline	Alkaline phosphatase
31	ZINC253496134	PTP1B
32	Tacrolimus	PTP1B
33	Alendronate	Tyrosine phosphatases
34	RWJ-60475	CD45
35	benzylphosphonic acid	PTP
36	RWJ-60475 (AM)3	CD45

REFERENCES:

1. Sreedharan, J. et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **319**, 1668-1672 (2008).
2. Scotter, E.L., Chen, H.-J. & Shaw, C.E. TDP-43 proteinopathy and ALS: insights into disease mechanisms and therapeutic targets. *Neurotherapeutics* **12**, 352-363 (2015).
3. Grese, Z.R. et al. Specific RNA interactions promote TDP-43 multivalent phase separation and maintain liquid properties. *EMBO reports* **22**, e53632 (2021).
4. Gopal, P.P., Nirschl, J.J., Klinman, E. & Holzbaur, E.L. Amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations increase the viscosity of liquid-like TDP-43 RNP granules in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E2466-E2475 (2017).
5. Babinchak, W.M. et al. The role of liquid–liquid phase separation in aggregation of the TDP-43 low-complexity domain. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 6306-6317 (2019).
6. Wang, A. et al. A single N-terminal phosphomimic disrupts TDP-43 polymerization, phase separation, and RNA splicing. *The EMBO journal* **37**, e97452 (2018).
7. Rengifo-Gonzalez, J.C. et al. The cooperative binding of TDP-43 to GU-rich RNA repeats antagonizes TDP-43 aggregation. *Elife* **10**, e67605 (2021).
8. Van Deerlin, V.M. et al. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *The Lancet Neurology* **7**, 409-416 (2008).
9. Arai, T. et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and biophysical research communications* **351**, 602-611 (2006).
10. Buratti, E. & Baralle, F.E. The molecular links between TDP-43 dysfunction and neurodegeneration. *Advances in genetics* **66**, 1-34 (2009).
11. Jiang, L.-L. et al. Structural transformation of the amyloidogenic core region of TDP-43 protein initiates its aggregation and cytoplasmic inclusion. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 19614-19624 (2013).
12. Brown, A.-L. et al. TDP-43 loss and ALS-risk SNPs drive mis-splicing and depletion of UNC13A. *Nature* **603**, 131-137 (2022).
13. Ma, X.R. et al. TDP-43 represses cryptic exon inclusion in the FTD–ALS gene UNC13A. *Nature* **603**, 124-130 (2022).
14. Suk, T.R. & Rousseaux, M.W. The role of TDP-43 mislocalization in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular neurodegeneration* **15**, 1-16 (2020).
15. Ayala, Y.M. et al. TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *The EMBO journal* **30**, 277-288 (2011).
16. Polymenidou, M. et al. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nature neuroscience* **14**, 459-468 (2011).
17. Mann, J.R. et al. RNA binding antagonizes neurotoxic phase transitions of TDP-43. *Neuron* **102**, 321-338. e8 (2019).
18. Conicella, A.E., Zerze, G.H., Mittal, J. & Fawzi, N.L. ALS mutations disrupt phase separation mediated by α -helical structure in the TDP-43 low-complexity C-terminal domain. *Structure* **24**, 1537-1549 (2016).
19. Maharana, S. et al. RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins. *Science* **360**, 918-921 (2018).
20. Cascella, R. et al. A quantitative biology approach correlates neuronal toxicity with the largest inclusions of TDP-43. *Science Advances* **8**, eabm6376 (2022).
21. Gu, J. et al. Hsp70 chaperones TDP-43 in dynamic, liquid-like phase and prevents it from amyloid aggregation. *Cell Research* **31**, 1024-1027 (2021).

22. Yu, H. et al. HSP70 chaperones RNA-free TDP-43 into anisotropic intranuclear liquid spherical shells. *Science* **371**, eabb4309 (2021).
23. Carrasco, J. et al. Metamorphism in TDP-43 prion-like domain determines chaperone recognition. *Nature Communications* **14**, 466 (2023).
24. Xu, Y.-F. et al. Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *Journal of Neuroscience* **30**, 10851-10859 (2010).
25. Hasegawa, M. et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* **64**, 60-70 (2008).
26. Grujic da Silva, L.A. et al. Disease-linked TDP-43 hyper-phosphorylation suppresses TDP-43 condensation and aggregation. *The EMBO Journal* **41**, e108443 (2022).
27. Gao, J., Wang, L., Huntley, M.L., Perry, G. & Wang, X. Pathomechanisms of TDP-43 in neurodegeneration. *Journal of neurochemistry* **146**, 7-20 (2018).
28. Liachko, N.F. et al. CDC7 inhibition blocks pathological TDP-43 phosphorylation and neurodegeneration. *Annals of neurology* **74**, 39-52 (2013).
29. Aikio, M. et al. Opposing roles of p38 α -mediated phosphorylation and arginine methylation in driving TDP-43 proteinopathy. *bioRxiv* (2021).
30. Fazal, R. et al. HDAC6 inhibition restores TDP-43 pathology and axonal transport defects in human motor neurons with TARDBP mutations. *The EMBO journal* **40**, e106177 (2021).
31. Arai, T. et al. Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta neuropathologica* **117**, 125-136 (2009).
32. Neumann, M. et al. Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. *Acta neuropathologica* **117**, 137-149 (2009).
33. Newell, K. et al. Dysregulation of TDP-43 intracellular localization and early onset ALS are associated with a TARDBP S375G variant. *Brain Pathology* **29**, 397-413 (2019).
34. Hicks, D.A., Cross, L.L., Williamson, R. & Rattray, M. Endoplasmic reticulum stress signalling induces casein kinase 1-dependent formation of cytosolic TDP-43 inclusions in motor neuron-like cells. *Neurochemical research* **45**, 1354-1364 (2020).
35. Eck, R.J., Kraemer, B.C. & Liachko, N.F. Regulation of TDP-43 phosphorylation in aging and disease. *GeroScience* **43**, 1605-1614 (2021).
36. McGurk, L. et al. Poly (ADP-ribose) prevents pathological phase separation of TDP-43 by promoting liquid demixing and stress granule localization. *Molecular cell* **71**, 703-717. e9 (2018).
37. Fang, M.Y. et al. Small-molecule modulation of TDP-43 recruitment to stress granules prevents persistent TDP-43 accumulation in ALS/FTD. *Neuron* **103**, 802-819. e11 (2019).
38. Li, Y.R., King, O.D., Shorter, J. & Gitler, A.D. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *Journal of cell biology* **201**, 361-372 (2013).
39. Gasset-Rosa, F. 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* **102**, 339-357. e7 (2019).
40. Maucuer, A. et al. Microtubules as platforms for probing liquid–liquid phase separation in cells—application to RNA-binding proteins. *Journal of cell science* **131**, jcs214692 (2018).
41. Cohen, T.J. et al. An acetylation switch controls TDP-43 function and aggregation propensity. *Nature communications* **6**, 1-13 (2015).

42. Cohen, T.J., Hwang, A.W., Unger, T., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M. Redox signalling directly regulates TDP-43 via cysteine oxidation and disulphide cross-linking. *The EMBO journal* **31**, 1241-1252 (2012).
43. Duan, L. et al. Nuclear RNA binding regulates TDP-43 nuclear localization and passive nuclear export. *Cell reports* **40**, 111106 (2022).
44. Pinarbasi, E.S. et al. Active nuclear import and passive nuclear export are the primary determinants of TDP-43 localization. *Scientific reports* **8**, 1-16 (2018).
45. Ayala, Y.M. et al. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *Journal of cell science* **121**, 3778-3785 (2008).
46. Wheeler, R.J. et al. Small molecules for modulating protein driven liquid-liquid phase separation in treating neurodegenerative disease. *BioRxiv*, 721001 (2019).
47. Babinchak, W.M. et al. Small molecules as potent biphasic modulators of protein liquid-liquid phase separation. *Nature communications* **11**, 1-15 (2020).
48. François-Moutal, L. et al. Small molecule targeting TDP-43's RNA recognition motifs reduces locomotor defects in a Drosophila model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *ACS chemical biology* **14**, 2006-2013 (2019).
49. Moujalled, D. et al. Kinase inhibitor screening identifies cyclin-dependent kinases and glycogen synthase kinase 3 as potential modulators of TDP-43 cytosolic accumulation during cell stress. *PLoS One* **8**, e67433 (2013).
50. Chiang, W.-C. et al. Hyper-phosphorylation-Mimetic TDP-43 Drives Amyloid Formation and Possesses Neuronal Toxicity at the Oligomeric Stage. *ACS Chemical Neuroscience* **13**, 2599-2612 (2022).
51. Conicella, A.E. et al. TDP-43 α -helical structure tunes liquid-liquid phase separation and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 5883-5894 (2020).
52. Schmidt, H.B., Barreau, A. & Rohatgi, R. Phase separation-deficient TDP43 remains functional in splicing. *Nature communications* **10**, 1-14 (2019).
53. D'Ambrogio, A. et al. Functional mapping of the interaction between TDP-43 and hnRNP A2 in vivo. *Nucleic acids research* **37**, 4116-4126 (2009).
54. Kedersha, N. & Anderson, P. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods in enzymology* **431**, 61-81 (2007).
55. Ivanov, P., Kedersha, N. & Anderson, P. Stress granules and processing bodies in translational control. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **11**, a032813 (2019).
56. Singatulina, A.S. et al. PARP1 Activation Controls Stress Granule Assembly after Oxidative Stress and DNA Damage. *Cells* **11**, 3932 (2022).
57. El Hage, K. et al. Targeting RNA: protein interactions with an integrative approach leads to the identification of potent YBX1 inhibitors. *Elife* **12**, e80387 (2023).
58. Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R. & Bullock, P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro* **18**, 703-710 (2004).
59. Iversen, P.W., Eastwood, B.J., Sittampalam, G.S. & Cox, K.L. A comparison of assay performance measures in screening assays: signal window, Z'factor, and assay variability ratio. *Journal of biomolecular screening* **11**, 247-252 (2006).
60. Doll, S.G. et al. Recognition of the TDP-43 nuclear localization signal by importin α 1/ β . *Cell reports* **39**, 111007 (2022).
61. Scotter, E.L., Chen, H.-J. & Shaw, C.E. TDP-43 proteinopathy and ALS: insights into disease mechanisms and therapeutic targets. *Neurotherapeutics* **12**, 352-363 (2015).
62. Pérez-Berlanga, M. et al. TDP-43 oligomerization and RNA binding are codependent but their loss elicits distinct pathologies. *bioRxiv* (2022).

63. Choksi, D.K. et al. TDP-43 Phosphorylation by casein kinase I ϵ promotes oligomerization and enhances toxicity in vivo. *Human molecular genetics* **23**, 1025-1035 (2014).
64. Liachko, N.F., Guthrie, C.R. & Kraemer, B.C. Phosphorylation promotes neurotoxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of TDP-43 proteinopathy. *Journal of Neuroscience* **30**, 16208-16219 (2010).
65. Liachko, N.F. et al. The phosphatase calcineurin regulates pathological TDP-43 phosphorylation. *Acta neuropathologica* **132**, 545-561 (2016).
66. Geser, F., Lee, V.M.Y. & Trojanowski, J.Q. Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration: a spectrum of TDP-43 proteinopathies. *Neuropathology* **30**, 103-112 (2010).

Discussion

L'innovation de ce travail de thèse réside dans l'utilisation d'une approche automatisée permettant de quantifier l'autoassociation phospho-dépendante de TDP-43 dans le cytoplasme des cellules. Cette approche combinée à des tests cellulaires nous a permis d'identifier des composés capables de moduler ces autoassemblages. Notre approche automatisée nous a également permis d'en déduire un modèle scientifique permettant d'expliquer l'effet de la phosphorylation sur la distribution subcellulaire de TDP-43. Encore aucune étude n'a permis de mettre en lumière un rôle des mutations phosphomimétiques dans la régulation de la localisation cellulaire de TDP-43. Le modèle scientifique proposé est le suivant : l'hypo-phosphorylation C-terminale de TDP-43 et l'action des inhibiteurs de kinases, favorisent la formation d'autoassemblages cytoplasmiques de TDP-43 empêchant son import nucléaire **(Figure 29)**.

La discussion qui suit se divise en plusieurs parties afin d'analyser en détail les résultats obtenus à l'issue de ma thèse. J'aborderai l'effet de la phosphorylation de TDP-43 sur sa distribution subcellulaire (A), sur son recrutement dans les granules de stress (B), sur son activité d'épissage de l'ARNm cible CFTR (C), sur son agrégation protéique (D) et enfin je discuterai des composés identifiés à l'aide de la méthode automatisée développée (E).

A- Effet de la phosphorylation de TDP-43 sur sa distribution subcellulaire

Au cours de mes travaux de recherche, nous avons principalement constaté que la phosphorylation joue un rôle essentiel dans la régulation de la localisation subcellulaire de TDP-43. Nous avons mis en évidence le rôle critique de l'hypo-phosphorylation de TDP-43 dans sa rétention cytoplasmique. Cependant, nos résultats diffèrent de ceux d'une étude récente menée par Guijs da Silva et al. (2022). Dans leur

étude, les mutations phosphomimétiques (12D et 12A) n'ont pas perturbé la distribution subcellulaire et l'importation nucléaire de TDP-43. Ce qui pourrait expliquer cette différence de résultats est la présence de résidus mutés dans la potentielle région conservée CR [320-343] située dans le domaine C-terminal (Conicella et al., 2016) dans les mutants phosphomimétiques 18A et 18E. Cependant, nous avons réfuté cette hypothèse en montrant que le mutant 12D (Guijs da Silva et al., 2022) était retenu dans le noyau tout comme le mutant hyperphosphomimétique 18E. Ces observations suggèrent que les différences obtenues entre nos résultats et ceux de Guijs da Silva et al. (2022) ne sont pas attribuables à des modifications structurales du domaine CTD de TDP-43.

De plus, nos résultats mettent en évidence une corrélation négative entre l'autoassemblage de TDP-43 dans le cytoplasme et sa rétention nucléaire, ce qui est en accord avec d'autres études antérieures (Gasset-Rosa et al., 2019 ; Duan et al., 2022 ; Koehler et al., 2023). Une étude a démontré que la distribution de TDP-43 dans la cellule est principalement régulée par la diffusion passive à travers les canaux des pores nucléaires, et est limitée par la liaison à l'ARN riche en dinucléotide (GU) au niveau du noyau, associée à une importation nucléaire active. Ce processus constitue le principal déterminant de la distribution de TDP-43 dans la cellule (Duan et al., 2022). Une autre étude a montré qu'une augmentation accrue de TDP-43 dans le cytoplasme en réponse à un stress cellulaire provoque l'accumulation de TDP-43 phosphorylée dans des condensats liquides qui recrutent progressivement des récepteurs d'importation nucléaires (Importine- α et Nup62) et qui induisent une mauvaise localisation de RanGap1, Ran (*Ras related nuclear protein*) et Nup107 (*Nucleoporin 107*), provoquant l'inhibition de l'import nucléaire, la déplétion de TDP-43 dans le noyau et la mort cellulaire (Gasset-Rosa et al., 2019). Ces observations suggèrent qu'un équilibre et une régulation des niveaux de rétention nucléaire et la localisation cytoplasmique de TDP-43 sont essentiels pour maintenir sa fonction normale. L'autoassemblage de TDP-43 et les processus de phosphorylation et de déphosphorylation interagissent de manière complexe pour influencer la localisation subcellulaire de TDP-43. De plus, les résultats

d'une étude suggèrent que l'autorégulation de TDP-43 est médiée par son autoassemblage et par le processus LLPS lorsqu'elle se lie à l'ARN. De plus, la liaison spécifique de TDP-43 à un ARN appelé CLIP34 augmente les propriétés liquides des condensats de TDP-43. En outre, ils montrent que la phosphorylation du résidu S48 dans le domaine NTD de TDP-43 et des variants pathologiques tels que M337V associés à la SLA peuvent entraîner une accumulation anormale de TDP-43 dans les cellules, ce qui peut être dû à une diminution de la clairance de la protéine (Koehler et al., 2022). Ces études additionnées à notre modèle scientifique suggèrent l'importance de restaurer la fonction normale de TDP-43 dans le noyau dans des conditions pathologiques liées aux maladies neurodégénératives.

Afin d'approfondir nos recherches, il serait intéressant d'observer l'expression des principaux régulateurs du trafic nucléocytoplasmique (RanGap1, Ran, Nup107 et Nup62) de TDP-43 dans les cellules. On pourrait également comparer ce profil d'expression avec celui des récepteurs d'importation nucléaire (importine- α et la karyophérine- β 1) afin de déterminer s'ils s'accumulent dans les condensats cytoplasmiques avec TDP-43. Dans des cellules exprimant soit les mutants phosphomimétiques (18E et 18A) soit la forme sauvage de TDP-43, on pourrait étudier par immunofluorescence la localisation de ces marqueurs. Notamment, on pourrait s'intéresser aux récepteurs d'importation nucléaire, Importine- α et la karyophérine- β 1, qui ont été rapportés pour prévenir ou inverser l'agrégation de TDP-43 *in vitro* (Guo et al., 2018). En effet, la réduction de l'importation nucléaire pourrait potentiellement perturber la voie d'autorégulation de TDP-43 (Ayala et al., 2011 ; Polymenidou et al., 2011).

- **Quelques limites concernant les mutations phosphomimétiques**

Dans le cadre de notre étude, nous avons employé des mutations phosphomimétiques (E ou D). Il est important de noter que cela peut parfois constituer une limite, car ces mutations ne reproduisent pas toujours de manière précise l'impact de la phosphorylation sur les interactions protéine-protéine (Durocher et al, 1999 ;

Yaffe et al, 1997). Les substitutions phosphomimétiques consistent à remplacer une sérine, une thréonine ou une tyrosine phosphorylée par un acide aminé chargé négativement (D ou E), imitant ainsi la charge négative du groupe phosphate. Néanmoins, ces substitutions sous-estiment le changement de charge (charge nette de l'aspartate ou glutamate = -1 au lieu de -2 pour un groupement phosphate) et ne reproduisent pas toujours avec précision la chimie d'un groupement phosphate. Cependant, les mutations phosphomimétiques ont souvent été utilisées avec succès pour étudier la fonction biologique des résidus phosphorylés (Martin et al., 2014).

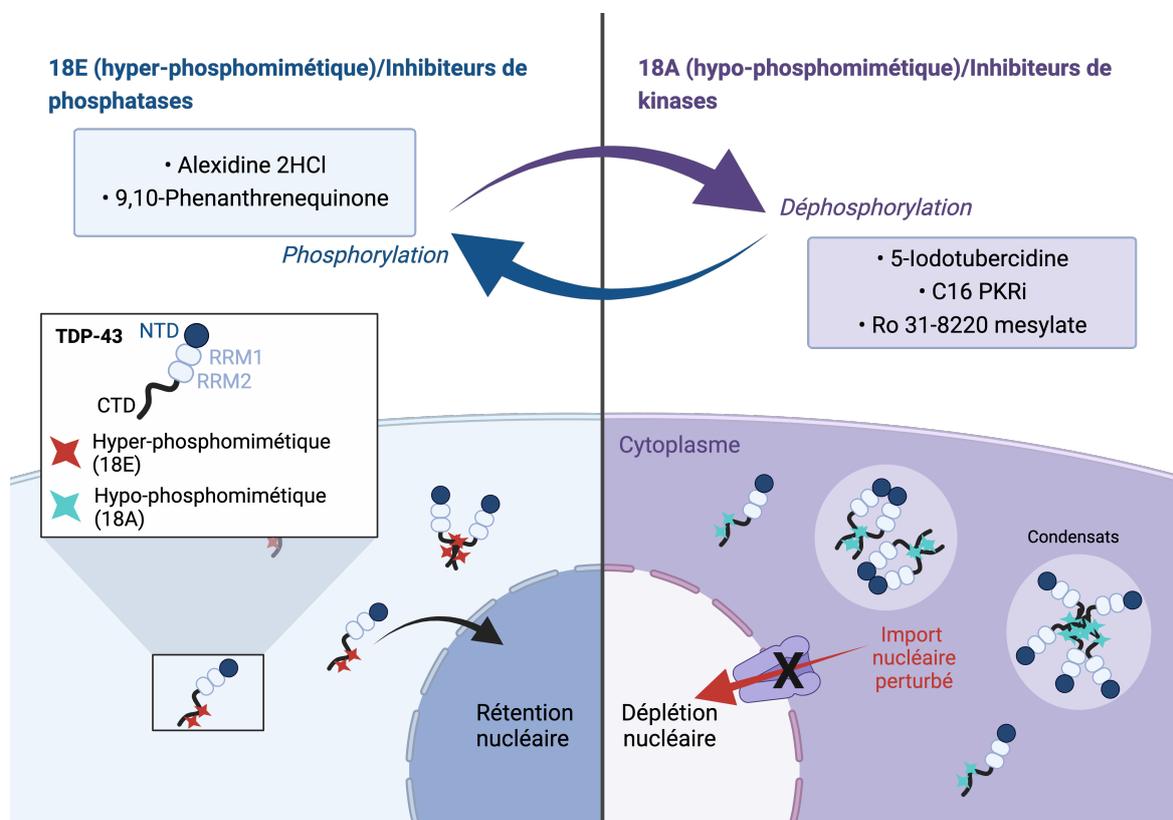


Figure 29- Modèle de l'autoassemblage de TDP-43, dépendant de l'état de phosphorylation de son domaine C-terminal.

A gauche, la forme hyper-phosphorylé (18E) de TDP-43 et les inhibiteurs de phosphatases favorisent la rétention nucléaire de TDP-43. A droite, la forme hypo-phosphorylé (18A) de TDP-43 et les inhibiteurs de kinases, augmentent l'auto-association de TDP-43 dans le cytoplasme, ce qui perturbe son importation nucléaire et conduit potentiellement à une déplétion nucléaire. Les étoiles rouges représentent les résidus glutamates (E), tandis que les étoiles vertes représentent les résidus alanines (A).

B- Effet de la phosphorylation de TDP-43 sur son recrutement dans les granules de stress (GS)

Dans notre étude, nous avons exploré les effets de l'hyper- ou de l'hypo-phosphorylation de TDP-43 sur sa capacité de recrutement dans les GS. Le résultat principal est que la phosphorylation de TDP-43 n'influence pas son recrutement dans les GS en conditions de stress physiologiques (H2O2 300 μ M et expression de G3BP1-GFP). C'est uniquement lors d'un stress oxydatif aigu que la forme hyper-phosphorylée de TDP-43 n'est pas recrutée dans les GS contrairement à la forme hypo-phosphorylée de TDP-43. Nos résultats obtenus en conditions de stress aigu sont en accord avec l'étude de Guijs da Silva et al. (2022) qui montre que des mutations hyper-phosphomimétiques (substitutions de sérines en acide aspartique) dans le domaine CTD de TDP-43 altèrent leur recrutement dans les GS à la fois *in vitro* et *in cellulo* conduisant à une dispersion des mutants dans le cytoplasme après un stress oxydant aigu (1mM de H₂O₂). Cependant, dans leur étude, ils considèrent que c'est la phosphorylation de TDP-43 qui empêche son autossemblage dans des compartiments liquides cytoplasmiques (GS). En revanche, nous montrons dans notre modèle que l'état de phosphorylation de TDP-43 n'a pas d'impact sur son recrutement dans les GS, uniquement dans des conditions de stress physiologiques. Nous avons décortiqué les mécanismes sous-jacents à cette perte de recrutement et nous montrons que la phosphorylation de TDP-43 réduit sa capacité de liaison aux ARNm en raison de son agrégation intermoléculaire dépendante des domaines RRM uniquement lors d'un stress aigu. Maintenant la question qui se pose est celle du recrutement différentiel observé entre la forme hypo- et hyper-phosphorylée dans les GS en conditions de stress aigu. Pourquoi la forme hypo-phosphorylée de TDP-43 n'est pas sensible à l'agrégation des domaines RRM ? Pourquoi l'on n'observe pas d'agrégats de la forme hyper-phosphorylée de TDP-43 dans le cytoplasme lors d'un stress aigu ? Ces questions sont intéressantes et mériteraient d'être pleinement explorées. Autre point, lorsque nous avons étudié l'effet des composés sur le recrutement de la forme sauvage de TDP-43 dans les GS, nous n'avons pas observé de résultats cohérents. En effet, nous

nous attendions à observer en présence d'inhibiteurs de kinases, une augmentation du recrutement de la forme sauvage de TDP-43 dans les GS, et l'inverse avec les inhibiteurs de phosphatases. En effet, nous avons montré précédemment que la forme hypophosphorylée de TDP-43 a une affinité plus grande pour l'ARNm que la forme hyperphosphorylée. Cependant, nous avons obtenu des résultats contraires, qui ne vont pas dans le même sens que les mutants phosphomimétiques. Nos observations suggèrent que les inhibiteurs de kinases/phosphatases sélectionnés pourraient modifier le recrutement de TDP-43 dans les GS indépendamment des mécanismes liés à l'autoassociation de TDP-43 dans le cytoplasme, contrôlé par l'état de phosphorylation de son domaine CTD.

C- Effet de la phosphorylation de TDP-43 sur sa fonction d'épissage des ARNm cibles

Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence une perte de fonction nucléaire (épissage de l'ARNm CFTR contrôlé par TDP-43) liée à la phosphorylation. Ces résultats sont cohérents avec un rôle potentiel du domaine CTD de TDP-43 dans l'interaction avec des facteurs protéiques qui régulent l'épissage de ses ARNm cibles (D'Ambrogio et al., 2009). Ainsi, il est raisonnable de supposer que des altérations de l'auto-association de TDP-43 pourraient avoir un impact sur l'activité d'épissage de son ARNm cible CFTR. Cependant, nous n'avons pas obtenu de tendance claire lorsque nous avons entrepris de modifier l'activité d'épissage de TDP-43 avec les inhibiteurs de kinases et de phosphatases identifiés. Nos résultats suggèrent que l'activité d'épissage des ARNm, contrôlée par TDP-43 dans le noyau, pourrait ne pas être régulée par les mêmes kinases impliquées dans son auto-association cytoplasmique. Il est donc possible que des états de phosphorylation/déphosphorylation différents, spécifiques à différentes parties du domaine CTD, puissent être envisagés pour expliquer ces résultats expérimentaux. C'est pour cette raison que nous ne sommes pas allés plus loin dans la compréhension des mécanismes sous-jacents à la perte de fonction liée à la phosphorylation de TDP-43.

D- Effet de la phosphorylation de TDP-43 sur son agrégation protéique

Dans mon projet de recherche, j'ai entrepris d'étudier l'effet des inhibiteurs de kinases et de phosphatases identifiés sur l'agrégation de la protéine mutante G146A. J'ai principalement constaté que les inhibiteurs de kinases augmentent l'agrégation de G146A ainsi que l'enrichissement en ARNm dans ces agrégats. L'inverse a été observé avec les inhibiteurs de phosphatases sélectionnés. Ces résultats sont cohérents avec l'observation faite sur la forme hypo-phosphorylée de TDP-43 (le mutant 18A) qui a tendance à se fixer davantage à l'ARNm et à être recruté dans les granules de stress. Un article récent montre que TDP-43 dans les granules de stress reste soluble et ne semble pas présenter les caractéristiques d'agrégats irréversibles, alors que les inclusions de TDP-43 à l'extérieur des GS pourraient être insolubles (Mann et al., 2019). Si l'on suit cette hypothèse, l'enrichissement de l'ARNm après le traitement par les inhibiteurs de kinases seraient un moyen pour la protéine mutante G146A de retrouver sa solubilité. Pour l'heure, nous ne sommes pas en mesure de savoir s'il s'agit finalement d'agrégats ou de granules de stress qui se seraient formées pour améliorer la solubilité de la protéine mutante G146A.

E- Identifications de molécules capables de moduler l'auto-association de TDP-43, dépendante de l'état de phosphorylation de son domaine CTD

Grâce à l'approche automatisée que j'ai développé, basée sur la quantification des autoassemblages de TDP-43, phospho-dépendants dans la cellule vivante, nous avons identifié plusieurs composés capables de moduler ces autoassemblages. Parmi ces composés, quatorze inhibiteurs de kinases empêchent la phosphorylation de la forme sauvage de TDP-43. Notre hypothèse est qu'en présence d'inhibiteurs de kinases, la forme sauvage de TDP-43 imite une hypo-phosphorylation de son domaine C-terminal. Ce qui a pour effet d'augmenter l'interaction de la forme sauvage avec elle-même et l'interaction de la forme hyper-phosphorylée (18E) avec elle-même sur les microtubules, ce qui se traduit par une diminution du score d'autoassociation (R^2) entre la forme sauvage et la forme hyper-phosphorylée de TDP-43 (18E).

Deux autres inhibiteurs de phosphatases ont été identifiés, si l'on suit cette hypothèse, ils agiraient en empêchant la déphosphorylation de la forme sauvage de TDP-43. Ce qui a pour effet de regrouper la forme sauvage de TDP-43 qui imite une hyper-phosphorylation avec la forme hyper-phosphorylée de TDP-43 (18E) sur les microtubules. En d'autres termes, deux protéines qui se ressemblent auraient tendance à s'autoassocier entre elles. Cette observation se traduirait par une augmentation du score d'autoassociation (R2) entre la forme sauvage et la forme hyper-phosphorylée de TDP-43 (18E). Cependant, bien que notre essai soit spécifique à l'auto-association de TDP-43 dépendant de l'état de phosphorylation de son domaine CTD, nous ne sommes pas en mesure de déterminer si les inhibiteurs de kinases sélectionnés modifient directement l'état de phosphorylation de TDP-43 ou régulent indirectement son auto-association par un mécanisme indirect (par exemple en agissant sur l'activité des protéines chaperonnes ou par les hélicases des ARN). Étant donné le large spectre des protéines ciblées par ces inhibiteurs de kinases, la voie indirecte semble plus plausible, même si la voie directe n'est pas à exclure. Toutefois, il serait intéressant de cartographier les sites phosphorylés par ces inhibiteurs de kinases (probablement de façon indirecte), dans l'ensemble du domaine CTD de TDP-43. Pour cela, on pourrait réaliser des analyses *in vitro* de protéomique par spectrométrie de masse afin d'identifier les sites spécifiques sur la protéine TDP-43 qui sont ciblés indirectement par les inhibiteurs de protéines kinases.

Aucune autre étude n'a encore établi de lien entre les 3 inhibiteurs de kinases mentionnés précédemment et l'auto-association de TDP-43. Une étude intéressante démontre que le *knockdown* de TDP-43 dans des astrocytes de rat active spécifiquement une voie de signalisation impliquant la protéine kinase R (PKR), une kinase activée par l'ARN double brin et connue pour jouer un rôle clé dans la réponse immunitaire innée (LaRocca et al., 2019). L'activation de la voie de la PKR entraîne une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires et l'induction de réponses inflammatoires dans les astrocytes. De plus, cette étude montre que l'inhibition de la protéine PKR par le composé C16 dans les astrocytes bloque les effets

pro-inflammatoires, résultats de l'inhibition de l'expression de TDP-43 dans les cellules astrocytaires. Ces résultats soulignent le rôle potentiel de TDP-43 dans la régulation de la réponse immunitaire innée dans les astrocytes. Ils suggèrent également que la dysfonction ou l'accumulation anormale de TDP-43 observée dans les MND pourrait contribuer à l'activation de la réponse immunitaire et à l'inflammation dans le cerveau.

En résumé, mes travaux de recherche offrent une perspective prometteuse pour la recherche de médicaments ciblant les autoassemblages défectueux de la protéine TDP-43 dans la SLA. Dans la section suivante, nous examinerons plus en détail les perspectives liées à mon projet de thèse.

Conclusion et perspectives

Mes travaux de thèse ont permis de démontrer la fiabilité de notre approche automatisée pour le criblage et l'identification de composés capables de moduler les autoassemblages de TDP-43 dans les cellules vivantes. L'une des principales perspectives de ce travail de recherche repose sur l'identification de composés FDA afin de moduler les autoassemblages de TDP-43, en présence de mutations pathologiques associées à la SLA. Cette approche faisait partie de l'un des grands objectifs de cette thèse mais il a d'abord fallu automatiser le système MTbench afin qu'il soit adapté pour la première fois à des tests de criblage à haut débit de molécules en utilisant le microscope HCS. Cette perspective de recherche est d'autant plus intéressante compte tenu de l'orientation de la société 4P-Pharma vers l'identification de thérapies modifiant les maladies non traitées avec des médicaments régénérés (molécules de repositionnement). De plus, étudier l'impact des mutations pathologiques de TDP-43 associées à la SLA et essayer de les corriger avec des molécules approuvées (FDA) permettrait de gagner un temps précieux pour la maladie. Une fois que nous aurions identifié des molécules prometteuses, nous pourrions les évaluer dans des modèles plus pertinents de la maladie comme des modèles *in vivo* de SLA. Par exemple, divers modèles de souris transgéniques portant des mutations connues retrouvées chez des patients atteints de SLA ont été développés pour la recherche fondamentale ou translationnelle (Wegorzewska et al., 2011 ; Huang et al., 2020). Ensuite, ces modèles animaux pourraient être utilisés pour des études de preuve de concept *in vivo*.

Durant mes travaux de thèse, j'ai produit une quarantaine de mutants : des mutations dans les parties structurées de TDP-43 (principalement le domaine NTD et RRM), des mutations pathologiques et des mutations phosphomimétiques. Les seuls mutants qui ont eu un impact significatif sur l'autoassociation de TDP-43, sont les

mutations qui imitent une hyper- ou une hypo-phosphorylation C-terminale de TDP-43. En parallèle de mes études sur les mutants phosphomimétiques, je suis parvenu à identifier deux mutants pathologiques associés à la SLA (N267S et K263E) qui impactent significativement le processus d'autoassociation de TDP-43. J'ai décidé de vous montrer quelques résultats préliminaires ci-dessous qui ont été obtenus afin de vous donner une idée de ce que nous pourrions mettre en place dans le futur afin de corriger les mutations pathologiques SLA. Ces résultats feront probablement partie de la continuité d'une nouvelle thèse dans le laboratoire.

Études préliminaires sur la caractérisation des mutants pathologiques N267S et K263E associés à la SLA

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons également eu l'opportunité d'étudier deux mutants pathologiques de la protéine TDP-43 associés à la SLA, les mutants K263E et N267S. Ces mutations sont localisées dans la région située entre le domaine RRM2 et le domaine CTD de TDP-43. Dans le premier mutant, K263E, la lysine (avec une charge positive) est substituée par un résidu glutamate (avec une charge négative) qui pourrait mimer le groupement phosphate (d'une sérine phosphorylée). Dans le deuxième mutant N267S, l'asparagine (non chargée) est substituée en résidu sérine qui pourrait être à son tour potentiellement phosphorylée par une protéine kinase. Dans le but de comprendre l'impact de ces mutations dans le mécanisme conduisant à l'agrégation de TDP-43, nous avons réalisé une analyse de la séparation de phase liquide-liquide de ces mutants pathologiques en présence de la forme normale de TDP-43 *in cellulo*, en utilisant le MT bench. Nos résultats ont montré une diminution significative de l'auto-association des protéines mutantes avec la forme normale de la protéine TDP-43 (**Figure 30**).

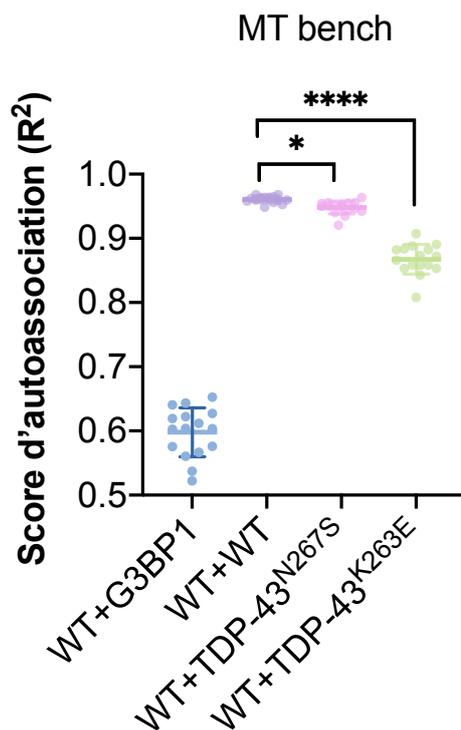


Figure 30- Quantification de l'auto-association des protéines mutantes N267S et K263E avec la protéine TDP-43 normale à l'aide du Microtubule bench dans les cellules HeLa.

Nous avons étudié l'impact des mutations pathologiques N267S et K263E sur l'auto-association de TDP-43. Un contrôle négatif constitué du couple de protéines G3BP1 et TDP-43 (normales), ne se mélange pas sur les microtubules. On observe une réduction significative de l'auto-association des protéines mutantes lorsqu'elles sont en association avec la protéine TDP-43 normale sur les microtubules. Un effet plus prononcé est obtenu pour le mutant K263E avec un R^2 d'environ 0.84.

Par la suite, nous avons entrepris une caractérisation biochimique et structurale de TDP-43 portant sur ces mutations pathologiques. Nous avons tout d'abord produit des fragments de TDP-43 formés des deux domaines RRM (RRM1-2) portant soit la mutation K263E soit la mutation N267S. Ces protéines ont été produites sans marquage (pour des études biochimiques) ou avec marquage isotopique (^{15}N) pour des études structurales en utilisant la spectroscopie RMN. Des résultats préliminaires montrent que les deux mutations pathologiques induisent des perturbations de déplacements chimiques et des variations de largeur des pics RMN pour plusieurs résidus localisés dans le domaine RRM1 (résidus 101-192) (**Figure 31**), loin du site de la mutation (résidu 263 ou 267) notamment pour des résidus situés au niveau de la boucle 4 du domaine RRM1, qui sont connus pour être impliqués dans la coopérativité comme cela a été précédemment démontré au laboratoire (Rengifo-Gonzalez et al.,

2021). Ces modifications spectrales suggèrent des changements structuraux probables induits par ces mutations. Il est important de noter que, par le biais de l'approche de microcalorimétrie isotherme ITC, nous avons démontré que ces mutations n'altèrent pas l'interaction des fragments RRM1-2 avec un oligonucléotide court (GU)₆. Des formes plus longues de ces fragments comprenant également le domaine NTD ont été produites au laboratoire. De plus, des études sur l'effet de ces mutations sur l'agrégation et la formation des LLPS *in vitro* de la forme entière de TDP-43 vont être entreprise au laboratoire.

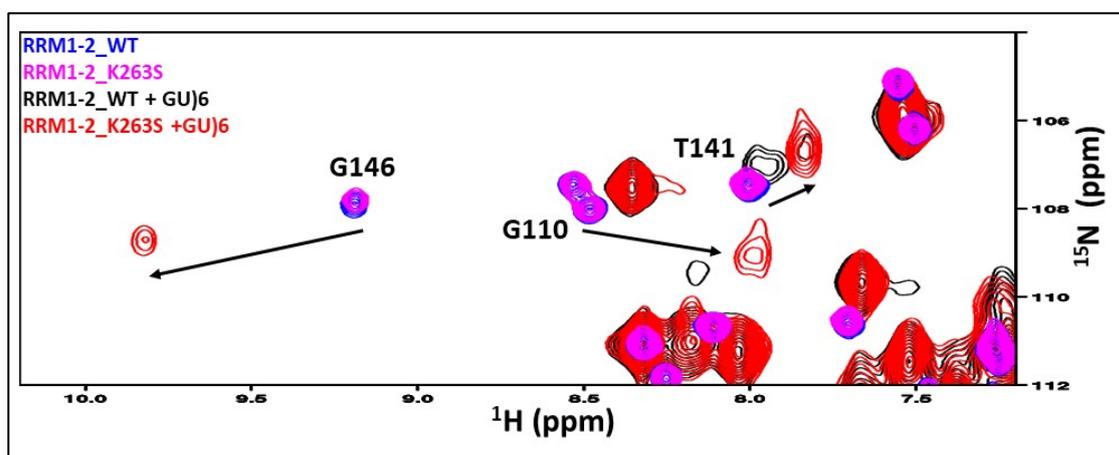


Figure 31- Comparaison des spectres RMN des fragments RRM1/2 normaux et mutés (portant la mutation K263E) seuls ou en association avec l'ARN (GU)₆.

Superposition d'une partie des spectres RMN (HSQC ¹H/¹⁵N) du fragment RRM1-2 de TDP-43 normale seul (en bleu), du mutant K263E seul (en rose), de TDP-43 normale en présence de l'oligonucléotide (GU)₆ (en noir) et celui de K263E en présence de l'oligonucléotide (GU)₆ (en rouge). Les flèches indiquent les perturbations des déplacements chimiques induites par la liaison à l'ARN du mutant pathologique.
D'après : Laboratoire SABNP.

Ces travaux préliminaires ouvrent la voie à une meilleure compréhension des effets de ces mutations pathologiques sur la structure et la fonction de TDP-43. L'identification de changements structuraux induits par ces mutations dans le domaine RRM1 suggère une possible altération de la coopérativité de TDP-43, ce qui pourrait avoir des conséquences sur ses interactions cellulaires et son comportement agrégatif. Des études supplémentaires, notamment sur l'ensemble de la protéine et l'impact de ces mutations sur l'agrégation et la formation de compartiments liquides-liquides *in vitro*, seront nécessaires pour approfondir notre compréhension de ces mécanismes.

Concernant les autres pistes de réflexion, nous avons principalement étudié l'auto-association de TDP-43 avec elle-même, mais nous n'avons pas abordé son impact sur les interactions avec ses partenaires protéiques. Une approche possible consisterait à réaliser des analyses comparatives de *pull-down* de TDP-43 suivies d'une analyse protéomique globale dans des cellules, en utilisant la forme normale de TDP-43 et ses mutants phosphomimétiques. Cela nous permettrait d'évaluer directement l'effet de la phosphorylation sur les réseaux d'interactions protéiques de TDP-43 dans la cellule.

D'autre part, dans nos études portant sur l'épissage de l'ARNm cible CFTR contrôlé par TDP-43, nous avons observé un effet de la phosphorylation de TDP-43 sur l'activité d'épissage de l'ARNm CFTR. Cela suggère que les variants hyper- ou hypo-phosphomimétiques de TDP-43 pourraient influencer la régulation de certains ARNm. Étant donné que TDP-43 cible des milliers d'ARN, y compris des ARN spécifiques aux neurones impliqués dans des troubles neurodégénératifs (Polymenidou et al., 2011 ; Sephton et al., 2011 ; Tollervey et al., 2011), il serait pertinent de réaliser des approches telles que des analyses transcriptomiques complètes ou des études de CLIP pour mieux comprendre l'impact de la phosphorylation sur la régulation des ARNm par TDP-43. Il est également important de ne pas exclure la possibilité que d'autres aspects de la biologie de TDP-43, tels que son auto-régulation, sa fonction dans la transcription ou la traduction, soient influencés par la phosphorylation.

Dans mes travaux de thèse, nous avons principalement porté notre attention sur le domaine CTD de TDP-43 en raison de la présence de multiples sites (sérines, thréonines et tyrosines) susceptibles d'être phosphorylés de manière anormale dans la SLA (Hasegawa et al., 2008). Cependant, une autre question importante se pose : Qu'en est-il des autres domaines de TDP-43 ? Des études récentes utilisant la spectrométrie de masse pour analyser les résidus phosphorylés de TDP-43 via la caséine kinase-1 (CK1) ont identifié des sites phosphorylés dans le domaine N-terminal (NTD) (Kametani et al., 2009). Il a été démontré qu'une seule substitution phosphomimétique (S48E) dans le domaine NTD de TDP-43 perturbe la dimérisation fonctionnelle médiée par le domaine NTD globulaire et interrompt la formation de LLPS de TDP-43 (Wang et al.,

2018a). Cependant, nous ne connaissons pas encore les conditions dans lesquelles la phosphorylation du résidu S48 se produit ni son implication dans la maladie. Par conséquent, il est possible que d'autres sites potentiels dans le domaine NTD modulent également la séparation de phase de TDP-43.

De manière intéressante, certains de ces sites se trouvent dans la séquence de localisation nucléaire (NLS) située dans le domaine NTD de TDP-43, tels que les résidus T88 et S91/92 (Kametani et al., 2016 ; Nonaka et al., 2016). Ainsi, la phosphorylation de ces sites pourrait affecter la liaison de l'Importine α/β , en introduisant des charges négatives, ce qui pourrait avoir un impact sur la liaison des importines aux résidus lysine/arginine chargés positivement dans la séquence NLS de TDP-43. Cette interaction est importante pour le transport nucléocytoplasmique de TDP-43 et pourrait donc être perturbée par la phosphorylation de ces sites. Ces résultats soulignent l'importance d'explorer davantage les autres domaines de TDP-43 et leurs sites de phosphorylation potentiels pour mieux comprendre l'impact de la phosphorylation sur la fonction et la pathologie de TDP-43 dans la SLA. En plus de la phosphorylation, d'autres modifications post-traductionnelles (MPT) ont été associées aux maladies et il serait intéressant d'étudier leurs effets sur l'auto-association de TDP-43. Par exemple, l'acétylation de la lysine 82 identifiée par une analyse en spectrométrie de masse dans les tissus *post-mortem* de cerveaux de patients atteints de SLA (Wang et al., 2017 ; Cohen et al., 2018), se situe également dans la séquence NLS de TDP-43 (Kametani et al., 2016). Cette MPT pourrait également affecter la liaison de TDP-43 aux importines et ainsi altérer le processus LLPS. Il est important de noter que l'acétylation dans les domaines RRM de TDP-43 (sur K136, K145 et K192) diminue la liaison à l'ARN et perturbe la régulation des cibles ARN de TDP-43 (Cohen et al., 2018 ; Morato et al., 2020). Une autre étude récente a révélé que l'acétylation et la perte de liaison à l'ARN augmentent la propension de TDP-43 à s'agréger et entraînent la déplétion nucléaire de TDP-43 normal en le séquestrant dans des assemblages pathologiques, contribuant ainsi à la dysfonction et à l'agrégation de TDP-43 dans la SLA (Keating et al., 2023). Par

conséquent, l'étude de l'acétylation des domaines RRM de TDP-43 représente une piste d'étude intéressante.

D'autres MPT, telles que l'ubiquitination et la O-Glycosylation TDP-43 sont également pathologiques (Tsoi et al., 2023). Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle potentiel de ces MPT dans le processus d'auto-association et dans l'agrégation de TDP-43. Ces résultats suggèrent une interconnexion complexe entre différentes modifications qui pourraient contribuer au développement des protéinopathies de TDP-43.

Il reste encore de nombreuses questions qui nécessitent des recherches approfondies. Par exemple, il serait important de savoir quand et par quelle kinase TDP-43 est hyper-phosphorylée chez les patients atteints de SLA. Comprendre si la phosphorylation de TDP-43 entraîne d'autres changements dans le processus des modifications post-traductionnelles (MPT), telles que l'ubiquitination et la dégradation de TDP-43, est essentiel. Des questions subsistent également concernant les autres MPT des protéines de liaison à l'ARN dans les MND. Par exemple, est-ce que des modifications telles que la PARylation, la O-glycosylation ou la SUMOylation se produisent et jouent un rôle dans l'évolution de la maladie ? Comment ces modifications régulent-elles les fonctions physiologiques normales et le cycle de vie des RBPs liées à ces maladies ? Enfin, il est important de déterminer si les changements dans le paysage des MPT des protéines de liaison à l'ARN sont corrélés à des changements plus étendus dans le protéome ou l'interactome des RBPs. Poursuivre ces recherches approfondies permettra de mieux comprendre les mécanismes des maladies neurodégénératives liées à TDP-43 et ouvrira la voie au développement de stratégies thérapeutiques potentielles visant à moduler les MPT de TDP-43 et d'autres RBPs dans le but de prévenir ou de traiter ces affections dévastatrices.

En conclusion, d'un point de vue scientifique, mes travaux contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes régulant la distribution subcellulaire de TDP-43, et de son rôle dans les maladies neurodégénératives, en éclairant les voies

cellulaires potentiellement affectées dans ces pathologies. D'un point de vue industriel, la méthode automatisée développée au cours de ma thèse permet l'identification de molécules modulatrices de l'autoassemblage de TDP-43 et de sa localisation subcellulaire et ouvre ainsi la voie au développement de thérapies potentielles pour prévenir ou traiter les maladies neurodégénératives associées à TDP-43. Ces découvertes pourraient également avoir un impact significatif dans le domaine de la médecine personnalisée, en permettant le développement de traitements adaptés aux patients présentant des mutations spécifiques de TDP-43.

Table des illustrations

Figure 1- Les prémices de la SLA spinale.	13
Figure 2- Augmentation attendue du nombre de cas de SLA entre 2015 et 2040.	14
Figure 3- Phénotypes de la SLA en fonction de l'implication relative des motoneurons supérieurs UMN par rapport aux motoneurons LMN et de la distribution régionale.	16
Figure 4- Les gènes associés à la SLA ne cessent d'augmenter depuis 1990.	23
Figure 5- Mécanismes pathophysiologiques dans la SLA et leurs gènes causatifs à l'origine de la neurodégénérescence du motoneurone.	26
Figure 6- Les mécanismes physiopathologiques majoritairement ciblés dans la SLA et les thérapies associées en pré-clinique et clinique.	34
Figure 7- Immunomarquage de TDP-43 sur des tissus de la moelle épinière issus de patients atteints de SLA.	38
Figure 8- Structure et fonctions des domaines de la protéine TDP-43.	39
Figure 9- Structure tridimensionnelle du domaine N-terminal de TDP-43.	40
Figure 10- Modèle tridimensionnel correspondant aux domaines RRM1/2 fixé à l'oligonucléotide (GU) ₁₂ avec l'interface d'interaction (carré pointillé noir) entre le monomère 1 et le monomère 2. D'après : Laboratoire SABNP.	42
Figure 11- Le domaine C-terminal de TDP-43 est faiblement structuré.	43
Figure 12- Les fonctions de TDP-43 en lien avec le métabolisme de l'ARN/ADN.	46
Figure 13- Mutations pathologiques de TDP-43 associées à la SLA.	54
Figure 14- Les différentes modifications post-traductionnelles (MPT) de TDP-43.	56
Figure 15- Mécanismes de perte et de gain de fonction (LOF/GOF) de la protéine TDP-43 dans les protéinopathies associées à TDP-43.	59
Figure 16- Les conditions favorisant les transitions de phases liquides (LLPS).	64
Figure 17- La diversité des condensats biomoléculaires et leurs principales fonctions.	66
Figure 18- Les interactions multivalentes pilotent la séparation de phase.	69
Figure 19- Les régions intrinsèquement désordonnées et les domaines de faible complexité se chevauchent.	70
Figure 20- La séparation de phase liquide-liquide (LLPS) de TDP-43 est pilotée par son domaine C-terminal, de faible complexité et intrinsèquement désordonnée.	72
Figure 21- TDP-43 est impliquée dans la formation et la régulation de plusieurs condensats biomoléculaires.	73
Figure 22- La transition de phase liquide à solide.	76
Figure 23- Les granules de stress seraient à l'origine de l'agrégation des protéines de liaison à l'ARN.	79
Figure 24- Les approches thérapeutiques existantes pour moduler les transitions de phase liquide à solide des protéines de liaison à l'ARN dans la pathologie.	81
Figure 25- Co-marquage des anticorps pTDP-43 ^{S375} et pTDP-43 ^{S409/410} dans les tissus de patients atteints de SLA.	87
Figure 26- Les sites de phosphorylation de TDP-43 et leur impact fonctionnel.	89
Figure 27- Kinases et phosphatases ciblant TDP-43 et leurs conséquences biologiques.	90
Figure 28- Schéma du principe de la méthode du Microtubule bench.	102
Figure 29- Modèle de l'autoassemblage de TDP-43, dépendant de l'état de phosphorylation de son domaine C-terminal.	173
Figure 30- Quantification de l'auto-association des protéines mutantes N267S et K263E avec la protéine TDP-43 normale à l'aide du Microtubule bench dans les cellules HeLa.	181
Figure 31- Comparaison des spectres RMN des fragments RRM1/2 normaux et mutés (portant la mutation K263E) seuls ou en association avec l'ARN (GU) ₆	182

Liste des tableaux

<i>Tableau 1- Liste des gènes codant des protéines de liaison à l'ARN associées à la SLA et leurs principales fonctions biologiques.</i>	22
<i>Tableau 2- Description des avantages liés au microscope à haut contenu (HCS)</i>	99
<i>Tableau 3- Avantages de la technique du Microtubule bench</i>	103

Références

- Afroz, T., Hock, E. M., Ernst, P., Foglieni, C., Jambeau, M., Gilhespy, L. A. B., Laferriere, F., Maniecka, Z., Plückthun, A., Mittl, P., Paganetti, P., Allain, F. H. T., & Polymenidou, M. (2017). Functional and dynamic polymerization of the ALS-linked protein TDP-43 antagonizes its pathologic aggregation. *Nature communications*, *8*(1), 45.
- Ahmadinejad, F., Møller, S. G., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Bidkhor, G., & Jami, M. (2017). Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. *Antioxidants*, *6*(3), 51.
- Alami, N. H., Smith, R. B., Carrasco, M. A., Williams, L. A., Winborn, C. S., Han, S. S. W., Kiskinis, E., Winborn, B., Freibaum, B. D., Kanagaraj, A., Clare, A. J., Badders, N. M., Bilican, B., Chaum, E., Chandran, S., Shaw, C. E., Eggen, K. C., Maniatis, T., & Taylor, J. P. (2014). Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron*, *81*(3), 536–543.
- Alberti, S., Gladfelter, A., & Mittag, T. (2019). Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell*, *176*(3), 419–434.
- Alquezar, C., Salado, I. G., De La Encarnación, A., Pérez, D. G., Moreno, F., Gil, C., De Munain, A. L., Martínez, A., & Martín-Requero, Á. (2016). Targeting TDP-43 phosphorylation by Casein Kinase-1 δ inhibitors : a novel strategy for the treatment of frontotemporal dementia. *Molecular Neurodegeneration*, *11*(1).
- Altman, T., Ionescu, A., Ibraheem, A., Priesmann, D., Gradus-Pery, T., Farberov, L., Alexandra, G., Shelestovich, N., Dafinca, R., Shomron, N., Rage, F., Talbot, K., Ward, M. E., Dori, A., Krüger, M., & Perlson, E. (2021). Axonal TDP-43 condensates drive neuromuscular junction disruption through inhibition of local synthesis of nuclear encoded mitochondrial proteins. *Nature communications*, *12*(1), 6914.
- Arnold, E. S., Ling, S. C., Huelga, S. C., Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Ditsworth, D., ... & Cleveland, D. W. (2013). ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(8), E736-E745.
- Arseni, D., Hasegawa, M., Murzin, A. G., Kametani, F., Arai, M., Yoshida, M., & Ryskeldi-Falcon, B. (2022). Structure of pathological TDP-43 filaments from ALS with FTL. *Nature*, *601*(7891), 139–143.

Aulas, A., & Vande Velde, C. (2015). Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS?. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 423.

Austin, J. A., Wright, G. S., Watanabe, S., Grossmann, J. G., Antonyuk, S. V., Yamanaka, K., & Hasnain, S. S. (2014). Disease causing mutants of TDP-43 nucleic acid binding domains are resistant to aggregation and have increased stability and half-life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(11), 4309–4314.

Ayala et al., 2008) : Ayala, Y. M., Zago, P., D'Ambrogio, A., Xu, Y. F., Petrucelli, L., Buratti, E., & Baralle, F. E. (2008). Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *Journal of cell science*, 121(Pt 22), 3778–3785.

Ayala, Y. M., De Conti, L., Avendaño-Vázquez, S. E., Dhir, A., Romano, M., D'Ambrogio, A., Tollervey, J., Ule, J., Baralle, M., Buratti, E., & Baralle, F. E. (2011). TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *The EMBO journal*, 30(2), 277–288.

Babinchak WM, Surewicz WK. Liquid-Liquid Phase Separation and Its Mechanistic Role in Pathological Protein Aggregation. *J Mol Biol*. 2020 Mar 27;432(7):1910-1925. doi: 10.1016/j.jmb.2020.03.004. Epub 2020 Mar 10. PMID: 32169484; PMCID: PMC7395662.

Babinchak, W. M., Haider, R., Dumm, B. K., Sarkar, P., Surewicz, K., Choi, J. K., & Surewicz, W. K. (2019). The role of liquid-liquid phase separation in aggregation of the TDP-43 low-complexity domain. *The Journal of biological chemistry*, 294(16), 6306–6317.

Baradaran-Heravi, Y., Van Broeckhoven, C., & van der Zee, J. (2020). Stress granule mediated protein aggregation and underlying gene defects in the FTD-ALS spectrum. *Neurobiology of Disease*, 134, 104639.

Barber, S. C., & Shaw, P. J. (2010). Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(5), 629-641.

Battle, C., Yang, P., Coughlin, M., Messing, J., Pesarrodon, M., Szulc, E., Salvatella, X., Kim, H. J., Taylor, J. P., & Ventura, S. (2020). hnRNPD Phase Separation Is Regulated by Alternative Splicing and Disease-Causing Mutations Accelerate Its Aggregation. *Cell reports*, 30(4), 1117–1128.e5.

Beckman, J. S., Carson, M. P., Smith, C. R., & Koppenol, W. H. (1993). ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature*, 364(6438), 584.

Beers, D. R., Henkel, J. S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A. A., ... & Appel, S. H. (2006). Wild-type microglia extend survival in PU. 1 knockout mice with familial amyotrophic

lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(43), 16021-16026.

Benatar, M., Wu, J., Andersen, P. M., Lombardi, V., & Malaspina, A. (2018). Neurofilament light: a candidate biomarker of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis and phenoconversion. *Annals of neurology*, 84(1), 130-139.

Benatar, M., Goutman, S. A., Staats, K. A., Feldman, E. L., Weisskopf, M., Talbott, E., ... & Al-Chalabi, A. (2023). A roadmap to ALS prevention: strategies and priorities. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 94(5), 399-402.

Bentmann, E., Neumann, M., Tahirovic, S., Rodde, R., Dormann, D., & Haass, C. (2012). Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). *The Journal of biological chemistry*, 287(27), 23079–23094.

Berry, J. D., Cudkovicz, M., Windebank, A. J., Staff, N. P., Owegi, M. A., Nicholson, K. L., McKenna-Yasek, D., Levy, Y. S., Abramov, N., Kaspi, H., Mehra, M., Aricha, R., Gothelf, Y., & Brown, R. S. (2019). NurOwn, phase 2, randomized, clinical trial in patients with ALS. *Neurology*, 93(24), e2294-e2305.

Blasco, H., Garcon, G., Patin, F., Veyrat-Durebex, C., Boyer, J., Devos, D., ... & Corcia, P. (2017). Panel of oxidative stress and inflammatory biomarkers in ALS: a pilot study. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 44(1), 90-95.

Boija, A., Klein, I. A., Sabari, B. R., Dall'Agnesse, A., Coffey, E. L., Zamudio, A. V., Li, C. H., Shrinivas, K., Manteiga, J. C., Hannett, N. M., Abraham, B. J., Afeyan, L. K., Guo, Y. E., Rimel, J. K., Fant, C. B., Schuijers, J., Lee, T. I., Taatjes, D. J., & Young, R. A. (2018). Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains. *Cell*, 175(7), 1842–1855.e16.

Brangwynne, C. P., Eckmann, C. R., Courson, D. S., Rybarska, A., Hoege, C., Gharakhani, J., Jülicher, F., & Hyman, A. A. (2009). Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5935), 1729–1732.

Brangwynne, C. P., Mitchison, T. J., & Hyman, A. A. (2011). Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(11), 4334–4339.

Brenner, D. A., Müller, K., Wieland, T., Weydt, P., Böhm, S., Lulé, D., Hübers, A., Neuwirth, C., Weber, M., Borck, G., Wahlqvist, M., Danzer, K. M., Volk, A. E., Meitinger, T., Strom, T.

M., Otto, M., Kassubek, J., Ludolph, A. C., Andersen, P., & Weishaupt, J. H. (2016). *NEK1* mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 139(5), e28.

Brown, D. G., Shorter, J., & Wobst, H. J. (2020). Emerging small-molecule therapeutic approaches for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(4), 126942.

Budini, M., Buratti, E., Morselli, E., & Criollo, A. (2017). Autophagy and its impact on neurodegenerative diseases: new roles for TDP-43 and C9orf72. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 170.

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

Buratti E. (2018). TDP-43 post-translational modifications in health and disease. *Expert opinion on therapeutic targets*, 22(3), 279–293.

Buratti, E., De Conti, L., Stuani, C., Romano, M., Baralle, M., & Baralle, F. (2010). Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *The FEBS journal*, 277(10), 2268–2281.

Buratti, E., Dörk, T., Zuccato, E., Pagani, F., Romano, M., & Baralle, F. E. (2001). Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *The EMBO journal*, 20(7), 1774–1784.

Buratti, E. (2018). TDP-43 post-translational modifications in health and disease. *Expert opinion on therapeutic targets*, 22(3), 279–293.

Butti, Z., & Patten, S. A. (2019). RNA dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in genetics*, 9, 712.

Cao, M. C., & Scotter, E. L. (2022). Transcriptional targets of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia protein TDP-43 - meta-analysis and interactive graphical database. *Disease models & mechanisms*, 15(9), dmm049418.

Carey, J. L., & Guo, L. (2022). Liquid-Liquid Phase Separation of TDP-43 and FUS in Physiology and Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in molecular biosciences*, 9, 826719.

Casafont, I., Bengoechea, R., Tapia, O., Berciano, M. T., & Lafarga, M. (2009). TDP-43 localizes in mRNA transcription and processing sites in mammalian neurons. *Journal of structural biology*, 167(3), 235–241.

Cascella, R., Capitini, C., Fani, G., Dobson, C. M., Cecchi, C., & Chiti, F. (2016). Quantification of the Relative Contributions of Loss-of-function and Gain-of-function Mechanisms in TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) Proteinopathies. *The Journal of biological chemistry*, 291(37), 19437–19448.

Chen, H. J., Mitchell, J. C., Novoselov, S., Miller, J., Nishimura, A. L., Scotter, E. L., Vance, C. A., Cheetham, M. E., & Shaw, C. E. (2016). The heat shock response plays an important role in TDP-43 clearance: evidence for dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, 139(Pt 5), 1417–1432.

Chen, H. J., Topp, S. D., Hui, H. S., Zacco, E., Katarya, M., McLoughlin, C., King, A., Smith, B. N., Troakes, C., Pastore, A., & Shaw, C. E. (2019). RRM adjacent TARDBP mutations disrupt RNA binding and enhance TDP-43 proteinopathy. *Brain : a journal of neurology*, 142(12), 3753–3770.

Chew, S., & Atassi, N. (2019). Positron emission tomography molecular imaging biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in neurology*, 10, 135.

Chiang, H., Andersen, P., Tysnes, O., Gredal, O., Christensen, P., & Graff, C. (2012). Novel TARDBP mutations in Nordic ALS patients. *Journal of Human Genetics*, 57(5), 316-319.

Chiot, A., Zaïdi, S., Iltis, C., Ribon, M., Berriat, F., Schiaffino, L., ... & Boillée, S. (2020). Modifying macrophages at the periphery has the capacity to change microglial reactivity and to extend ALS survival. *Nature Neuroscience*, 23(11), 1339-1351.

Choksi, D. K., Roy, B., Chatterjee, S., Yusuff, T., Bakhoun, M. F., Sengupta, U., ... & Jackson, G. R. (2014). TDP-43 Phosphorylation by casein kinase I ϵ promotes oligomerization and enhances toxicity in vivo. *Human molecular genetics*, 23(4), 1025-1035.

Chollet, F., Bioulac, B., Dubois, B., Hauw, J. J., & Léger, J. M. (2022). Rapport 22-06. Maladies neurodégénératives: marqueurs biologiques et de neuroimagerie. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 206(6), 708-718.

Chong, S., Dugast-Darzacq, C., Liu, Z., Dong, P., Dailey, G. M., Cattoglio, C., Heckert, A., Banala, S., Lavis, L., Darzacq, X., & Tjian, R. (2018). Imaging dynamic and selective low-complexity domain interactions that control gene transcription. *Science (New York, N.Y.)*, 361(6400), eaar2555.

Chu, J. F., Majumder, P., Chatterjee, B., Huang, S. L., & Shen, C. J. (2019). TDP-43 Regulates Coupled Dendritic mRNA Transport-Translation Processes in Co-operation with FMRP and Staufen1. *Cell reports*, 29(10), 3118–3133.e6.

- Chu, Y. P., Jin, L. W., Wang, L. C., Ho, P. C., Wei, W. Y., & Tsai, K. J. (2023). Transthyretin attenuates TDP-43 proteinopathy by autophagy activation via ATF4 in FTLD-TDP. *Brain : a journal of neurology*, 146(5), 2089–2106.
- Cohen, T. J., Hwang, A., Restrepo, C. R., Yuan, C., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2015). An acetylation switch controls TDP-43 function and aggregation propensity. *Nature Communications*, 6(1).
- Cohen, T. J., Hwang, A., Unger, T. L., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2012). Redox signalling directly regulates TDP-43 via cysteine oxidation and disulphide cross-linking.
- Colombrita, C., Onesto, E., Megiorni, F., Pizzuti, A., Baralle, F. E., Buratti, E., Silani, V., & Ratti, A. (2012). TDP-43 and FUS RNA-binding proteins bind distinct sets of cytoplasmic messenger RNAs and differently regulate their post-transcriptional fate in motoneuron-like cells. *The Journal of biological chemistry*, 287(19), 15635–15647.
- Colombrita, C., Zennaro, E., Fallini, C., Weber, M., Sommacal, A., Buratti, E., Silani, V., & Ratti, A. (2009). TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *Journal of neurochemistry*, 111(4), 1051–1061.
- Conicella, A. E., Dignon, G. L., Zerze, G. H., Schmidt, H. B., D'Ordine, A. M., Kim, Y. C., Rohatgi, R., Ayala, Y. M., Mittal, J., & Fawzi, N. L. (2020). TDP-43 α -helical structure tunes liquid-liquid phase separation and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(11), 5883–5894.
- Conicella, A. E., Zerze, G. H., Mittal, J., & Fawzi, N. L. (2016). ALS Mutations Disrupt Phase Separation Mediated by α -Helical Structure in the TDP-43 Low-Complexity C-Terminal Domain. *Structure (London, England : 1993)*, 24(9), 1537–1549.
- Conlon, E. G., & Manley, J. L. (2017). RNA-binding proteins in neurodegeneration: mechanisms in aggregate. *Genes & development*, 31(15), 1509–1528.
- Cooper-Knock, J., Walsh, M. J., Higginbottom, A., Robin Highley, J., Dickman, M. J., Edbauer, D., Ince, P. G., Wharton, S. B., Wilson, S. A., Kirby, J., Hautbergue, G. M., & Shaw, P. J. (2014). Sequestration of multiple RNA recognition motif-containing proteins by C9orf72 repeat expansions. *Brain : a journal of neurology*, 137(Pt 7), 2040–2051.
- Courtney, A. H., Shvets, A. A., Lu, W., Griffante, G., Mollenauer, M., Horkova, V., ... & Weiss, A. (2019). CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells. *Science signaling*, 12(604), eaaw8151.

Coyne, A. N., Siddegowda, B. B., Estes, P. S., Johannesmeyer, J., Kovalik, T., Daniel, S. G., Pearson, A., Bowser, R., & Zarnescu, D. C. (2014). Futsch/MAP1B mRNA is a translational target of TDP-43 and is neuroprotective in a Drosophila model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *34*(48), 15962–15974.

Coyne, A. N., Baskerville, V., Zaepfel, B. L., Dickson, D. W., Rigo, F., Bennett, F., ... & Rothstein, J. D. (2021). Nuclear accumulation of CHMP7 initiates nuclear pore complex injury and subsequent TDP-43 dysfunction in sporadic and familial ALS. *Science translational medicine*, *13*(604), eabe1923.

Cuadrado, A., Rojo, A. I., Wells, G., Hayes, J. D., Cousin, S. P., Rumsey, W. L., ... & Dinkova-Kostova, A. T. (2019). Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nature reviews Drug discovery*, *18*(4), 295-317.

D'Ambrogio, A., Buratti, E., Stuani, C., Guarnaccia, C., Romano, M., Ayala, Y. M., & Baralle, F. E. (2009). Functional mapping of the interaction between TDP-43 and hnRNP A2 in vivo. *Nucleic acids research*, *37*(12), 4116–4126.

Dammer, E. B., Fallini, C., Gozal, Y. M., Duong, D. M., Rossoll, W., Xu, P., Lah, J. J., Levey, A. I., Peng, J., Bassell, G. J., & Seyfried, N. T. (2012). Coaggregation of RNA-binding proteins in a model of TDP-43 proteinopathy with selective RGG motif methylation and a role for RRM1 ubiquitination. *PloS one*, *7*(6), e38658.

Dao, T. P., Kolaitis, R. M., Kim, H. J., O'Donovan, K., Martyniak, B., Colicino, E., Hehnly, H., Taylor, J. P., & Castañeda, C. A. (2018). Ubiquitin Modulates Liquid-Liquid Phase Separation of UBQLN2 via Disruption of Multivalent Interactions. *Molecular cell*, *69*(6), 965–978.e6.

Deng, H., Chen, W., Hong, S., Boycott, K. M., Gorrie, G., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H. L., Jiang, H., Hirano, M., Rampersaud, E., Jansen, G. H., Donkervoort, S., Bigio, E. H., Brooks, B. R., Ajroud, K., Sufit, R. L., ... Siddique, T. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, *477*(7363), 211-215.

Dewey, C. M., Cenik, B., Sephton, C. F., Johnson, B. A., Herz, J., & Yu, G. (2012). TDP-43 aggregation in neurodegeneration: are stress granules the key?. *Brain research*, *1462*, 16–25.

Doll, S. G., & Cingolani, G. (2022). Importin α/β and the tug of war to keep TDP-43 in solution : *quo vadis* ? *BioEssays*, *44*(12), 2200181.

Donde, A., Sun, M., Ling, J. P., Braunstein, K. E., Pang, B., Wen, X., Cheng, X., Chen, L., & Wong, P. C. (2019). Splicing repression is a major function of TDP-43 in motor neurons. *Acta neuropathologica*, *138*(5), 813–826.

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

Dormann, D., Rodde, R., Edbauer, D., Bentmann, E., Fischer, I., Hruscha, A., Than, M. E., Mackenzie, I. R., Capell, A., Schmid, B., Neumann, M., & Haass, C. (2010). ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *The EMBO journal*, *29*(16), 2841–2857.

Elbaum-Garfinkle, S., & Brangwynne, C. P. (2015). Liquids, Fibers, and Gels: The Many Phases of Neurodegeneration. *Developmental cell*, *35*(5), 531–532.

Fang, M. Y., Markmiller, S., Vu, A. Q., Javaherian, A., Dowdle, W. E., Jolivet, P., Bushway, P. J., Castello, N. A., Baral, A., Chan, M. Y., Linsley, J. W., Linsley, D., Mercola, M., Finkbeiner, S., Lecuyer, E., Lewcock, J. W., & Yeo, G. W. (2019). Small-Molecule Modulation of TDP-43 Recruitment to Stress Granules Prevents Persistent TDP-43 Accumulation in ALS/FTD. *Neuron*, *103*(5), 802–819.e11.

Fecto, F., Yan, J., Vemula, S. P., Liu, E., Yang, Y., Chen, W., Zheng, J. G., Shi, Y., Siddique, N., Arrat, H., Donkervoort, S., Ajroud-Driss, S., Sufit, R. L., Heller, S. L., Deng, H. X., & Siddique, T. (2011). SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology*, *68*(11), 1440–1446.

Ferri, A., Nencini, M., Battistini, S., Giannini, F., Siciliano, G., Casali, C., ... & Carrì, M. T. (2004). Activity of protein phosphatase calcineurin is decreased in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of neurochemistry*, *90*(5), 1237–1242.

Floris, G., Borghero, G., Cannas, A., Di Stefano, F., Murru, M. F., Corongiu, D., Cuccu, S., Tranquilli, S., Cherchi, M. V., Serra, A., Loi, G., Marrosu, M. G., Chiò, A., & Marrosu, F. (2015). Clinical phenotypes and radiological findings in frontotemporal dementia related to TARDBP mutations. *Journal of Neurology*, *262*(2), 375–384.

François-Moutal, L., Felemban, R., Scott, D. D., Sayegh, M. R., Miranda, V. G., Perez-Miller, S., Khanna, R., Gokhale, V., Zarnescu, D. C., & Khanna, M. (2019). Small Molecule Targeting TDP-43's RNA Recognition Motifs Reduces Locomotor Defects in a *Drosophila* Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *ACS chemical biology*, *14*(9), 2006–2013.

Franzmann, T. M., & Alberti, S. (2019). Prion-like low-complexity sequences: Key regulators of protein solubility and phase behavior. *The Journal of biological chemistry*, *294*(18), 7128–7136.

Franzmann, T. M., Jahnel, M., Pozniakovsky, A., Mahamid, J., Holehouse, A. S., Nüske, E., Richter, D., Baumeister, W., Grill, S. W., Pappu, R. V., Hyman, A. A., & Alberti, S. (2018). Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness. *Science (New York, N.Y.)*, *359*(6371), eaa05654.

Furukawa, Y., Suzuki, Y., Fukuoka, M., Nagasawa, K., Nakagome, K., Shimizu, H., Mukaiyama, A., & Akiyama, S. (2016). A molecular mechanism realizing sequence-specific recognition of nucleic acids by TDP-43. *Scientific Reports*, *6*(1).

Gao, J., Wang, L., Huntley, M. L., Perry, G., & Wang, X. (2018). Pathomechanisms of TDP-43 in neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, *146*(1), 7-20.

Gao, J., Wang, L., Ren, X., Dunn, J. R., Peters, A., Miyagi, M., Fujioka, H., Zhao, F., Askwith, C., Liang, J., & Wang, X. (2021). Translational regulation in the brain by TDP-43 phase separation. *The Journal of cell biology*, *220*(10), e202101019.

Gao, J., Wang, L., Yan, T., Perry, G., & Wang, X. (2019). TDP-43 proteinopathy and mitochondrial abnormalities in neurodegeneration. *Molecular and cellular neurosciences*, *100*, 103396.

Garcia Morato, J., Hans, F., von Zweydford, F., Feederle, R., Elsässer, S. J., Skodras, A. A., Gloeckner, C. J., Buratti, E., Neumann, M., & Kahle, P. J. (2022). Sirtuin-1 sensitive lysine-136 acetylation drives phase separation and pathological aggregation of TDP-43. *Nature communications*, *13*(1), 1223.

Garcia-Jove Navarro, M., Kashida, S., Chouaib, R., Souquere, S., Pierron, G., Weil, D., & Gueroui, Z. (2019). RNA is a critical element for the sizing and the composition of phase-separated RNA-protein condensates. *Nature communications*, *10*(1), 3230.

Gasset-Rosa, F., Lu, S., Yu, H., Chen, C., Melamed, Z., Guo, L., Shorter, J., Da Cruz, S., & Cleveland, D. W. (2019). Cytoplasmic TDP-43 De-mixing Independent of Stress Granules Drives Inhibition of Nuclear Import, Loss of Nuclear TDP-43, and Cell Death. *Neuron*, *102*(2), 339–357.e7.

Geevasinga, N., Menon, P., Ng, K., Van Den Bos, M., Byth, K., Kiernan, M. C., & Vucic, S. (2016). Riluzole exerts transient modulating effects on cortical and axonal hyperexcitability in ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal*

Gibson, B. A., Doolittle, L. K., Schneider, M. W. G., Jensen, L. E., Gamarra, N., Henry, L., Gerlich, D. W., Redding, S., & Rosen, M. K. (2019). Organization of Chromatin by Intrinsic and Regulated Phase Separation. *Cell*, 179(2), 470–484.e21.

Goh, C. W., Lee, I. C., Sundaram, J. R., George, S. E., Yusoff, P., Brush, M. H., ... & Shenolikar, S. (2018). Chronic oxidative stress promotes GADD34-mediated phosphorylation of the TAR DNA-binding protein TDP-43, a modification linked to neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 293(1), 163-176.

Gromicho, M., Oliveira Santos, M., Pinto, A., Pronto-Laborinho, A., & De Carvalho, M. (2017). Young-onset rapidly progressive ALS associated with heterozygous FUS mutation. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*, 18(5-6), 451–453.

Guo, J. C., Fang, S. S., Wu, Y., Zhang, J. H., Chen, Y., Liu, J., Wu, B., Wu, J. R., Li, E. M., Xu, L. Y., Sun, L., & Zhao, Y. (2019). CNIT: a fast and accurate web tool for identifying protein-coding and long non-coding transcripts based on intrinsic sequence composition. *Nucleic acids research*, 47(W1), W516–W522.

Guo, L., & Shorter, J. (2017). Biology and Pathobiology of TDP-43 and Emergent Therapeutic Strategies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(9), a024554.

Harrison, A. F., & Shorter, J. (2017). RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease. *The Biochemical journal*, 474(8), 1417–1438.

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

Hawley, Z. C. E., Campos-Melo, D., & Strong, M. J. (2020). Evidence of A Negative Feedback Network Between TDP-43 and miRNAs Dependent on TDP-43 Nuclear Localization. *Journal of molecular biology*, 432(24), 166695.

Henninger, J. E., Oksuz, O., Shrinivas, K., Sagi, I., LeRoy, G., Zheng, M. M., Andrews, J. O., Zamudio, A. V., Lazaris, C., Hannett, N. M., Lee, T. I., Sharp, P. A., Cissé, I. I., Chakraborty, A. K., & Young, R. A. (2021). RNA-Mediated Feedback Control of Transcriptional Condensates. *Cell*, 184(1), 207–225.e24.

Hergesheimer, R. C., Chami, A. A., de Assis, D. R., Vourc'h, P., Andres, C. R., Corcia, P., Lanznaster, D., & Blasco, H. (2019). The debated toxic role of aggregated TDP-43 in

amyotrophic lateral sclerosis: a resolution in sight?. *Brain : a journal of neurology*, 142(5), 1176–1194.

Hicks, D. A., Cross, L. L., Williamson, R., & Rattray, M. (2020). Endoplasmic reticulum stress signalling induces casein kinase 1-dependent formation of cytosolic TDP-43 inclusions in motor neuron-like cells. *Neurochemical research*, 45, 1354-1364.

Hyman, A. A., Weber, C. A., & Jülicher, F. (2014). Liquid-liquid phase separation in biology. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 39–58.

Igaz, L. M., Kwong, L. K., Xu, Y., Truax, A. C., Uryu, K., Neumann, M., Clark, C. M., Elman, L. B., Miller, B. L., Grossman, M., McCluskey, L. F., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2008). 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. *The American journal of pathology*, 173(1), 182–194.

Iguchi, Y., Katsuno, M., Niwa, J., Takagi, S., Ishigaki, S., Ikenaka, K., Kawai, K., Watanabe, H., Yamanaka, K., Takahashi, R., Misawa, H., Sasaki, S., Tanaka, F., & Sobue, G. (2013). Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain*, 136(5), 1371-1382.

Ihara, Y., Nobukuni, K., Takata, H., & Hayabara, T. (2005). Oxidative stress and metal content in blood and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with and without a Cu, Zn-superoxide dismutase mutation. *Neurological research*, 27(1), 105-108.

Izumikawa, K., Ishikawa, H., Yoshikawa, H., Fujiyama, S., Watanabe, A., Aburatani, H., Tachikawa, H., Hayano, T., Miura, Y., Isobe, T., Simpson, R. J., Li, L., Min, J., & Takahashi, N. (2019). LYAR potentiates rRNA synthesis by recruiting BRD2/4 and the MYST-type acetyltransferase KAT7 to rDNA. *Nucleic acids research*, 47(19), 10357–10372.

Izumikawa, K., Nobe, Y., Yoshikawa, H., Ishikawa, H., Miura, Y., Nakayama, H., Nonaka, T., Hasegawa, M., Egawa, N., Inoue, H., Nishikawa, K., Yamano, K., Simpson, R. J., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., & Takahashi, N. (2017). TDP-43 stabilises the processing intermediates of mitochondrial transcripts. *Scientific Reports*, 7(1).

Jiang, L., & Ngo, S. T. (2022). Altered TDP-43 Structure and Function: Key Insights into Aberrant RNA, Mitochondrial, and Cellular and Systemic Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Metabolites*, 12(8), 709.

Jiang, L., Xue, W., Hong, J., Zhang, J., Minter, S. D., Yu, S., He, J., & Hu, H. (2017). The N-terminal dimerization is required for TDP-43 splicing activity. *Scientific Reports*, 7(1).

Jiménez-Villegas, J., Ferraiuolo, L., Mead, R. J., Shaw, P. J., Cuadrado, A., & Rojo, A. I. (2021). NRF2 as a therapeutic opportunity to impact in the molecular roadmap of ALS. *Free Radical Biology and Medicine*, *173*, 125-141.

Johnson, B. S., Snead, D., Lee, J. J., McCaffery, J. M., Shorter, J., & Gitler, A. D. (2009). TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity. *The Journal of biological chemistry*, *284*(30), 20329–20339.

Johnson, J. O., Piro, E. P., Boehringer, A., Chia, R., Feit, H., Renton, A. E., Pliner, H. A., Abramzon, Y., Marangi, G., Winborn, B. J., Gibbs, J. R., Nalls, M. A., Morgan, S. E., Shoai, M., Hardy, J., Pittman, A. M., Orrell, R. W., Malaspina, A., Sidle, K., . . . Traynor, B. J. (2014). Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, *17*(5), 664-666.

Kabashi, E., Lin, L., Tradewell, M. L., Dion, P. A., Bercier, V., Bourguoin, P., Rochefort, D., Hadj, S. B., Durham, H. D., Velde, C. V., Rouleau, G. A., & Drapeau, P. (2010). Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Human Molecular Genetics*, *19*(15), 3102.

Kametani, F., Obi, T., Shishido, T., Akatsu, H., Murayama, S., Saito, Y., ... & Hasegawa, M. (2016). Mass spectrometric analysis of accumulated TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis brains. *Scientific reports*, *6*(1), 23281.

Kanekura, K., Yamanaka, Y., Miyagi, T., & Kuroda, M. (2022). Chemically oligomerizable TDP-43: a novel chemogenetic tool for studying the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Neural regeneration research*, *17*(11), 2434–2436.

Kato, M., Han, T. W., Xie, S., Shi, K., Du, X., Wu, L. C., Mirzaei, H., Goldsmith, E. J., Longgood, J., Pei, J., Grishin, N. V., Frantz, D. E., Schneider, J. W., Chen, S., Li, L., Sawaya, M. R., Eisenberg, D., Tycko, R., & McKnight, S. L. (2012). Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell*, *149*(4), 753–767.

Kawahara, Y., & Mieda-Sato, A. (2012). TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(9), 3347–3352.

Khalil, B., Chhangani, D., Wren, M. C., Smith, C. L., Lee, J. H., Li, X., Puttinger, C., Tsai, C. W., Fortin, G., Morderer, D., Gao, J., Liu, F., Lim, C. K., Chen, J., Chou, C. C., Croft, C. L., Gleixner, A. M., Donnelly, C. J., Golde, T. E., Petrucelli, L., ... Rossoll, W. (2022). Nuclear import receptors are recruited by FG-nucleoporins to rescue hallmarks of TDP-43 proteinopathy. *Molecular neurodegeneration*, *17*(1), 80.

Kim, K. (2021). Glutathione in the nervous system as a potential therapeutic target to control the development and progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants*, 10(7), 1011.

Klim, J. R., Williams, L. A., Limone, F., Guerra San Juan, I., Davis-Dusenbery, B. N., Mordes, D. A., Burberry, A., Steinbaugh, M. J., Gamage, K. K., Kirchner, R., Moccia, R., Cassel, S. H., Chen, K., Wainger, B. J., Woolf, C. J., & Eggan, K. (2019). ALS-implicated protein TDP-43 sustains levels of STMN2, a mediator of motor neuron growth and repair. *Nature neuroscience*, 22(2), 167–179.

Koehler LC, Grese ZR, Bastos ACS, Mamede LD, Heyduk T, Ayala YM. TDP-43 Oligomerization and Phase Separation Properties Are Necessary for Autoregulation. *Front Neurosci.* 2022;16:818655. Published 2022 Apr 14. doi:10.3389/fnins.2022.818655

Krach, F., Batra, R., Wheeler, E. C., Vu, A. Q., Wang, R., Hutt, K., Rabin, S. J., Baughn, M. W., Libby, R. T., Diaz-Garcia, S., Stauffer, J., Pirie, E., Saberi, S., Rodriguez, M., Madrigal, A. A., Kohl, Z., Winner, B., Yeo, G. W., & Ravits, J. (2018). Transcriptome-pathology correlation identifies interplay between TDP-43 and the expression of its kinase CK1E in sporadic ALS. *Acta neuropathologica*, 136(3), 405–423.

Kuo, P. H., Chiang, C. H., Wang, Y. T., Doudeva, L. G., & Yuan, H. S. (2014). The crystal structure of TDP-43 RRM1-DNA complex reveals the specific recognition for UG- and TG-rich nucleic acids. *Nucleic acids research*, 42(7), 4712–4722.

Kuo, P. H., Doudeva, L. G., Wang, Y. T., Shen, C. K., & Yuan, H. S. (2009). Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic acids research*, 37(6), 1799–1808.

Kwiatkowski, T. J., Jr, Bosco, D. A., Leclerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E. J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G. A., Hosler, B. A., Cortelli, P., de Jong, P. J., Yoshinaga, Y., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Yan, J., Ticozzi, N., ... Brown, R. H., Jr (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5918), 1205–1208.

Lafontaine, D. L. J., Riback, J. A., Bascetin, R., & Brangwynne, C. P. (2021). The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 22(3), 165–182.

- Lalmansingh, A. S., Urekar, C. J., & Reddi, P. P. (2011). TDP-43 is a transcriptional repressor: the testis-specific mouse *acr1* gene is a TDP-43 target in vivo. *The Journal of biological chemistry*, *286*(13), 10970–10982.
- LaRocca, T. J., Mariani, A., Watkins, L. R., & Link, C. D. (2019). TDP-43 knockdown causes innate immune activation via protein kinase R in astrocytes. *Neurobiology of disease*, *132*, 104514.
- Lattante, S., Rouleau, G. A., & Kabashi, E. (2013). *TARDBP* and *FUS* Mutations Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis : Summary and Update. *Human Mutation*, *34*(6), 812-826.
- Lee, E. A., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2012). Gains or losses : molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(1), 38-50.
- Lee, J. D., & Woodruff, T. M. (2021). TDP-43 puts the STING in ALS. *Trends in Neurosciences*, *44*(2), 81-82.
- Lépine, S., Castellanos-Montiel, M. J., & Durcan, T. M. (2022). TDP-43 dysregulation and neuromuscular junction disruption in amyotrophic lateral sclerosis. *Translational neurodegeneration*, *11*(1), 56.
- Li, P., Banjade, S., Cheng, H. C., Kim, S., Chen, B., Guo, L., ... & Rosen, M. K. (2012). Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature*, *483*(7389), 336-340.
- Li, Q., Babinchak, W. M., & Surewicz, W. K. (2021). Cryo-EM structure of amyloid fibrils formed by the entire low complexity domain of TDP-43. *Nature Communications*, *12*(1).
- Li, W., Jin, Y., Prazak, L., Hammell, M., & Dubnau, J. (2012). Transposable elements in TDP-43-mediated neurodegenerative disorders. *PloS one*, *7*(9), e44099.
- Li, W., Reeb, A. N., Lin, B., Subramanian, P., Fey, E. E., Knoverek, C. R., French, R. L., Bigio, E. H., & Ayala, Y. M. (2017). Heat Shock-induced Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) by MAPK/ERK Kinase Regulates TDP-43 Function. *The Journal of biological chemistry*, *292*(12), 5089–5100.
- Li, Y. X., Sibon, O. C. M., & Dijkers, P. F. (2018). Inhibition of NF-κB in astrocytes is sufficient to delay neurodegeneration induced by proteotoxicity in neurons. *Journal of neuroinflammation*, *15*(1), 261.

- Liachko, N. F., McMillan, P. J., Guthrie, C. R., Bird, T. D., Leverenz, J. B., & Kraemer, B. C. (2013). CDC7 inhibition blocks pathological TDP-43 phosphorylation and neurodegeneration. *Annals of neurology*, *74*(1), 39–52.
- Liachko, N. F., Saxton, A. D., McMillan, P. J., Strovast, T. J., Currey, H. N., Taylor, L. M., Wheeler, J. M., Oblak, A. L., Ghetti, B., Montine, T. J., Keene, C. D., Raskind, M. A., Bird, T. D., & Kraemer, B. C. (2016). The phosphatase calcineurin regulates pathological TDP-43 phosphorylation. *Acta neuropathologica*, *132*(4), 545–561.
- Liebman, S. W., & Chernoff, Y. O. (2012). Prions in yeast. *Genetics*, *191*(4), 1041–1072.
- Lin, Y., Protter, D. S., Rosen, M. J., & Parker, R. (2015). Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins. *Molecular Cell*, *60*(2), 208–219.
- Ling, J. P., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., & Wong, P. C. (2015). TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. *Science (New York, N.Y.)*, *349*(6248), 650–655.
- Ling, S. C., Albuquerque, C. P., Han, J. S., Lagier-Tourenne, C., Tokunaga, S., Zhou, H., & Cleveland, D. W. (2010). ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS. *Proceedings of the National Academy of Science the United States of America*, *107*(30), 13318–13323.
- Ling, S. C., Polymenidou, M., & Cleveland, D. W. (2013). Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*, *79*(3), 416–438.
- Liu, J., & Wang, F. (2017). Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: cellular mechanisms and therapeutic implications. *Frontiers in immunology*, *8*, 1005.
- Lu, S., Ye, Q., Singh, D., Cao, Y., Diedrich, J. K., Yates III, J. R., ... & Corbett, K. D. (2021). The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *Nature communications*, *12*(1), 502.
- Lu, S., Hu, J., Arogundade, O. A., Goginashvili, A., Vazquez-Sanchez, S., Diedrich, J. K., Gu, J., Blum, J., Oung, S., Ye, Q., Yu, H., Ravits, J., Liu, C., Yates, J. R., 3rd, & Cleveland, D. W. (2022). Heat-shock chaperone HSPB1 regulates cytoplasmic TDP-43 phase separation and liquid-to-gel transition. *Nature cell biology*, *24*(9), 1378–1393.
- Lukavsky, P. J., Daujotyte, D., Tollervey, J. R., Ule, J., Stuani, C., Buratti, E., Baralle, F. E., Damberger, F. F., & Allain, F. H. (2013). Molecular basis of UG-rich RNA recognition by the human splicing factor TDP-43. *Nature structural & molecular biology*, *20*(12), 1443–1449.

Luotti, S., Pasetto, L., Porcu, L., Torri, V., Elezgarai, S. R., Pantalone, S., ... & Bonetto, V. (2020). Diagnostic and prognostic values of PBMC proteins in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, *139*, 104815.

Ma, X. R., Prudencio, M., Koike, Y., Vatsavayai, S. C., Kim, G., Harbinski, F., Briner, A., Rodriguez, C. M., Guo, C., Akiyama, T., Schmidt, H. B., Cummings, B. B., Wyatt, D. W., Kurylo, K., Miller, G., Mekhoubad, S., Sallee, N., Mekonnen, G., Ganser, L., Rubien, J. D., ... Gitler, A. D. (2022). TDP-43 represses cryptic exon inclusion in the FTD-ALS gene UNC13A.

Mackenzie, K. J., Carroll, P., Martin, C. A., Murina, O., Fluteau, A., Simpson, D. J., Olova, N., Sutcliffe, H., Rainger, J. K., Leitch, A., Osborn, R. T., Wheeler, A. P., Nowotny, M., Gilbert, N., Chandra, T., Reijns, M. A. M., & Jackson, A. P. (2017). cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature*, *548*(7668), 461–465.

Maharana, S., Wang, J., Papadopoulos, D. K., Richter, D., Pozniakovsky, A., Poser, I., Bickle, M., Rizk, S., Guillén-Boixet, J., Franzmann, T. M., Jahnel, M., Marrone, L., Chang, Y. T., Sternecker, J., Tomancak, P., Hyman, A. A., & Alberti, S. (2018). RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins. *Science (New York, N.Y.)*, *360*(6391), 918–921.

Majumder, P., Chen, Y. T., Bose, J. K., Wu, C. C., Cheng, W. C., Cheng, S. J., Fang, Y. H., Chen, Y. L., Tsai, K. J., Lien, C. C., & Shen, C. K. (2012). TDP-43 regulates the mammalian spinogenesis through translational repression of Rac1. *Acta neuropathologica*, *124*(2), 231–245.

Mann, J. R., Gleixner, A. M., Mauna, J. C., Gomes, E., DeChellis-Marks, M. R., Needham, P. G., Copley, K. E., Hurtle, B., Portz, B., Pyles, N. J., Guo, L., Calder, C. B., Wills, Z. P., Pandey, U. B., Kofler, J. K., Brodsky, J. L., Thathiah, A., Shorter, J., & Donnelly, C. J. (2019). RNA Binding Antagonizes Neurotoxic Phase Transitions of TDP-43. *Neuron*, *102*(2), 321–338.e8.

Marcelo, A., Koppenol, R., De Almeida, L. P., Matos, C. R. R., & Nóbrega, C. (2021). Stress granules, RNA-binding proteins and polyglutamine diseases : too much aggregation ? *Cell Death and Disease*, *12*(6).

Martínez-González, L., Rodríguez-Cueto, C., Cabezudo, D., Bartolomé, F., Andrés-Benito, P., Ferrer, I., ... & de Lago, E. (2020). Motor neuron preservation and decrease of in vivo TDP-43 phosphorylation by protein CK-1 δ kinase inhibitor treatment. *Scientific reports*, *10*(1), 4449.

Martinez-Macias, M. I., Moore, D. A., Green, R. L., Gomez-Herreros, F., Naumann, M., Hermann, A., Van Damme, P., Hafezparast, M., & Caldecott, K. W. (2019). FUS (fused in sarcoma) is a component of the cellular response to topoisomerase I-induced DNA breakage and transcriptional stress. *Life science alliance*, 2(2), e201800222.

Mateju, D., Franzmann, T. M., Patel, A., Kopach, A., Boczek, E. E., Maharana, S., Lee, H. O., Carra, S., Hyman, A. A., & Alberti, S. (2017). An aberrant phase transition of stress granules triggered by misfolded protein and prevented by chaperone function. *The EMBO journal*, 36(12), 1669–1687.

Matsukawa, K., Kukharsky, M. S., Park, S., Park, S., Watanabe, N., Iwatsubo, T., Hashimoto, T., Liebman, S. W., & Shelkovernikova, T. A. (2021). Long non-coding RNA NEAT1_1 ameliorates TDP-43 toxicity in in vivo models of TDP-43 proteinopathy. *RNA Biology*, 18(11), 1546-1554.

Maucuer, A., Desforges, B., Joshi, V., Boca, M., Kretov, D. A., Hamon, L., Bouhss, A., Curmi, P. A., & Pastré, D. (2018). Microtubules as platforms for probing liquid-liquid phase separation in cells - application to RNA-binding proteins. *Journal of cell science*, 131(11), jcs214692.

Maurel, C., Chami, A. A., Thépault, R. A., Marouillat, S., Blasco, H., Corcia, P., Andres, C. R., & Vourc'h, P. (2020). A role for SUMOylation in the Formation and Cellular Localization of TDP-43 Aggregates in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular neurobiology*, 57(3), 1361–1373.

McCampbell, A., Cole, T., Wegener, A. J., Tomassy, G. S., Setnicka, A., Farley, B. J., Schoch, K. M., Hoyer, M. L., Shabsovich, M., Sun, L., Luo, Y., Zhang, M., Comfort, N., Wang, B., Amacker, J., Thankamony, S., Salzman, D. W., Cudkowicz, M., Graham, D. L., Bennett, C. F., ... Miller, T. M. (2018). Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models. *The Journal of clinical investigation*, 128(8), 3558–3567.

McGurk, L., Gomes, E., Guo, L., Mojsilovic-Petrovic, J., Tran, V., Kalb, R. G., Shorter, J., & Bonini, N. M. (2018). Poly(ADP-Ribose) Prevents Pathological Phase Separation of TDP-43 by Promoting Liquid Demixing and Stress Granule Localization. *Molecular cell*, 71(5), 703–717.e9.

Mead, R. J., Shan, N., Reiser, H. J., Marshall, F., & Shaw, C. (2022). Amyotrophic lateral sclerosis : a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22(3), 185-212.

Miller, T., Cudkowicz, M., Shaw, P. J., Andersen, P. M., Atassi, N., Bucelli, R. C., ... & Ferguson, T. A. (2020). Phase 1–2 trial of antisense oligonucleotide tofersen for SOD1

Milovanovic, D., Wu, Y., Bian, X., & De Camilli, P. (2018). A liquid phase of synapsin and lipid vesicles. *Science (New York, N.Y.)*, 361(6402), 604–607.

Mitra, J., Guerrero, E. N., Hegde, P. M., Liachko, N. F., Wang, H., Vasquez, V., Gao, J., Pandey, A., Taylor, J., Kraemer, B. C., Wu, P., Boldogh, I., Garruto, R. M., Mitra, S., Rao, K. J., & Hegde, M. L. (2019). Motor neuron disease-associated loss of nuclear TDP-43 is linked to DNA double-strand break repair defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(10), 4696-4705.

Mitsumoto, H., Santella, R. M., Liu, X., Bogdanov, M., Zipprich, J., Wu, H. C., ... & Factor-Litvak, P. (2008). Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 9(3), 177-183.

Mitsuzawa, S., Akiyama, T., Nishiyama, A., Suzuki, N., Kato, M., Warita, H., Izumi, R., Osana, S., Koyama, S., Kato, T., Suzuki, Y., & Aoki, M. (2018). *TARDBP* p.G376D mutation, found in rapid progressive familial ALS, induces mislocalization of TDP-43. *eNeurologicalSci*, 11, 20–22.

Mittag, T., & Parker, R. (2018). Multiple Modes of Protein–Protein Interactions Promote RNP Granule Assembly. *Journal of Molecular Biology*, 430(23), 4636-4649.

Modic, M., Grosch, M., Rot, G., Schirge, S., Lepko, T., Yamazaki, T., Lee, F. C. Y., Rusha, E., Shaposhnikov, D., Palo, M., Merl-Pham, J., Cacchiarelli, D., Rogelj, B., Hauck, S. M., von Mering, C., Meissner, A., Lickert, H., Hirose, T., Ule, J., & Drukker, M. (2019). Cross-Regulation between TDP-43 and Paraspeckles Promotes Pluripotency-Differentiation Transition. *Molecular cell*, 74(5), 951–965.e13.

Mompeán, M., Romano, M., Pantoja-Uceda, D., Stuani, C., Baralle, F. E., Buratti, E., & Laurents, D. V. (2017). Point mutations in the N-terminal domain of transactive response DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) compromise its stability, dimerization, and functions. *Journal of Biological Chemistry*, 292(28), 11992-12006.

Monahan, Z. T., Rhoads, S. N., Yee, D. S., & Shewmaker, F. P. (2018). Yeast Models of Prion-Like Proteins That Cause Amyotrophic Lateral Sclerosis Reveal Pathogenic Mechanisms. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 453.

Nabavi, S. M., Arab, L., Jarooghi, N., Bolurieh, T., Abbasi, F., Mardpour, S., Azimyan, V., Moeninia, F., Maroufizadeh, S., Sanjari, L., Hosseini, S. E., & Aghdami, N. (2019). Safety, Feasibility of Intravenous and Intrathecal Injection of Autologous Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Open Label Phase I Clinical Trial. *Cell journal*, 20(4), 592–598.

Naganuma, T., Nakagawa, S., Tanigawa, A., Sasaki, Y. F., Goshima, N., & Hirose, T. (2012). Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *The EMBO journal*, *31*(20), 4020–4034.

Nardozzi, J. D., Lott, K., & Cingolani, G. (2010). Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell communication and signaling : CCS*, *8*, 32.

Garcia-Jove Navarro, M., Kashida, S., Chouaib, R., Souquere, S., Pierron, G., Weil, D., & Gueroui, Z. (2019). RNA is a critical element for the sizing and the composition of phase-separated RNA–protein condensates. *Nature communications*, *10*(1), 3230.

Nedelsky, N. B., & Taylor, J. P. (2022). Pathological phase transitions in ALS-FTD impair dynamic RNA-protein granules. *RNA (New York, N.Y.)*, *28*(1), 97–113.

Neelagandan, N., Gonnella, G., Dang, S., Janiesch, P. C., Miller, K. K., Kuchler, K., Marques, R. F., Indenbirken, D., Alawi, M., Grundhoff, A., Kurtz, S., & Duncan, K. E. (2019). TDP-43 enhances translation of specific mRNAs linked to neurodegenerative disease. *Nucleic acids research*, *47*(1), 341–361.

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

Nicolas, A., Kenna, K. P., Renton, A. E., Ticozzi, N., Faghri, F., Chia, R., Dominov, J. A., Kenna, B. J., Nalls, M. A., Keagle, P., Rivera, A. M., van Rheenen, W., Murphy, N. A., van Vugt, J. J. F. A., Geiger, J. T., Van der Spek, R. A., Pliner, H. A., Shankaracharya, Smith, B. N., Marangi, G., ... Landers, J. E. (2018). Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene. *Neuron*, *97*(6), 1268–1283.e6.

Nonaka, T., Masuda-Suzukake, M., Arai, T., Hasegawa, Y., Akatsu, H., Obi, T., Yoshida, M., Murayama, S., Mann, D. M., Akiyama, H., & Hasegawa, M. (2013). Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell reports*, *4*(1), 124–134.

Nonaka, T., Suzuki, G., Tanaka, Y., Kametani, F., Hirai, S., Okado, H., Miyashita, T., Saitoe, M., Akiyama, H., Masai, H., & Hasegawa, M. (2016). Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1 δ Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. *The Journal of biological chemistry*, *291*(11), 5473–5483.

Ojaimi, Y. A., Dangoumau, A., Alarcan, H., Hergesheimer, R., Vourc'h, P., Corcia, P., Lanznaster, D., & Blasco, H. (2022). TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a promising therapeutic target. *Expert opinion on therapeutic targets*, 26(6), 575–592.

Ou, S. H., Wu, F., Harrich, D., García-Martínez, L. F., & Gaynor, R. B. (1995). Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *Journal of virology*, 69(6), 3584–3596.

Patel, A., Lee, H. O., Jawerth, L., Maharana, S., Janel, M., Hein, M. Y., Stoykov, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T. M., Pozniakovski, A., Poser, I., Maghelli, N., Royer, L. A., Weigert, M., Myers, E. W., Grill, S., Drechsel, D., Hyman, A. A., & Alberti, S. (2015). A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell*, 162(5), 1066–1077.

Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K. R., Huelga, S. C., Moran, J., Liang, T. Y., Ling, S. C., Sun, E., Wancewicz, E., Mazur, C., Kordasiewicz, H., Sedaghat, Y., Donohue, J. P., Shiue, L., Bennett, C. F., Yeo, G. W., & Cleveland, D. W. (2011). Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nature neuroscience*, 14(4), 459–468.

Portz, B., Lee, B. L., & Shorter, J. (2021). FUS and TDP-43 Phases in Health and Disease. *Trends in biochemical sciences*, 46(7), 550–563.

Prasad, A., Bharathi, V., Sivalingam, V., Girdhar, A., & Patel, B. K. (2019). Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 25.

Prasad, A., Sivalingam, V., Bharathi, V., Girdhar, A., & Patel, B. K. (2018). The amyloidogenicity of a C-terminal region of TDP-43 implicated in Amyotrophic Lateral Sclerosis can be affected by anions, acetylation and homodimerization. *Biochimie*, 150, 76–87.

Rao, S., Yin, H., & Weiss, J. (2003). Disruption of Glial Glutamate Transport by Reactive Oxygen Species Produced in Motor Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23(7), 2627–2633.

Ratti, A., & Buratti, E. (2016): Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *Journal of Neurochemistry*, 138, 95–111.

Rengifo-Gonzalez, J. C., El Hage, K., Clément, M. J., Steiner, E., Joshi, V., Craveur, P., Durand, D., Pastré, D., & Bouhss, A. (2021). The cooperative binding of TDP-43 to GU-rich RNA repeats antagonizes TDP-43 aggregation. *eLife*, *10*, e67605.

Riemenschneider, H., Guo, Q., Bader, J., Frottin, F., Farny, D., Kleinberger, G., Haass, C., Mann, M., Hartl, F. U., Baumeister, W., Hipp, M. S., Meissner, F., Fernández-Busnadiego, R., & Edbauer, D. (2022). Gel-like inclusions of C-terminal fragments of TDP-43 sequester stalled proteasomes in neurons. *EMBO reports*, *23*(6), e53890.

Rosa, X., MA, Prudencio, M., Koike, Y., Vatsavayai, S. C., Kim, G., Harbinski, F., Briner, A., Rodriguez, C. M., Guo, C., Akiyama, T., Schmidt, H. R., Cummings, B. B., Wyatt, D. K., Kurylo, K., Miller, G., Mekhoubad, S., N, S., Mekonnen, G., Ganser, L. R., . . . Gitler, A. D. (2022). TDP-43 represses cryptic exon inclusion in the FTD–ALS gene UNC13A. *Nature*, *603*(7899), 124–130.

Sabari BR, Dall'Agnesse A, Boija A, Klein IA, Coffey EL, Shrinivas K, Abraham BJ, Hannett NM, Zamudio AV, Manteiga JC, Li CH, Guo YE, Day DS, Schuijers J, Vasile E, Malik S, Hnisz D, Lee TI, Cisse II, Roeder RG, Sharp PA, Chakraborty AK, Young RA. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control.

Sahin C, Motso A, Gu X, et al. Mass Spectrometry of RNA-Binding Proteins during Liquid-Liquid Phase Separation Reveals Distinct Assembly Mechanisms and Droplet Architectures. *J Am Chem Soc.* 2023;145(19):10659-10668.

Sanders, D. W., Kedersha, N., Lee, D. S. W., Strom, A. R., Drake, V., Riback, J. A., Bracha, D., Eeftens, J. M., Iwanicki, A., Wang, A., Wei, M. T., Whitney, G., Lyons, S. M., Anderson, P., Jacobs, W. M., Ivanov, P., & Brangwynne, C. P. (2020). Competing Protein-RNA Interaction Networks Control Multiphase Intracellular Organization. *Cell*, *181*(2), 306–324.e28.

Santamaria, N., Alhothali, M., Alfonso, M. H., Breydo, L., & Uversky, V. N. (2017). Intrinsic disorder in proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *74*(7), 1297–1318.

Sato, C., Barthélemy, N. R., Mawuenyega, K. G., Patterson, B. W., Gordon, B. A., Jockel-Balsarotti, J., Sullivan, M., Crisp, M. J., Kasten, T., Kirmess, K. M., Kanaan, N. M., Yarasheski, K. E., Baker-Nigh, A., Benzinger, T. L. S., Miller, T. M., Karch, C. M., & Bateman, R. J. (2018). Tau Kinetics in Neurons and the Human Central Nervous System. *Neuron*, *97*(6), 1284–1298.e7.

Schmidt, H. B., & Rohatgi, R. (2016). In Vivo Formation of Vacuolated Multi-phase Compartments Lacking Membranes. *Cell reports*, *16*(5), 1228–1236.

Schwenk, J., Pérez-Garci, E., Schneider, A., Kollwe, A., Gauthier-Kemper, A., Fritzius, T., Raveh, A., Dinamarca, M. C., Hanuschkin, A., Bildl, W., Klingauf, J., Gassmann, M., Schulte, U., Bettler, B., & Fakler, B. (2016). Modular composition and dynamics of native GABAB receptors identified by high-resolution proteomics. *Nature neuroscience*, *19*(2), 233–242.

Sephton, C. F., Cenik, B., Cenik, B. K., Herz, J., & Yu, G. (2012). TDP-43 in central nervous system development and function: clues to TDP-43-associated neurodegeneration. *Biological chemistry*, *393*(7), 589–594.

Sephton, C. F., Cenik, C., Kucukural, A., Dammer, E. B., Cenik, B., Han, Y., Dewey, C. M., Roth, F. P., Herz, J., Peng, J., Moore, M. J., & Yu, G. (2011). Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes. *The Journal of biological chemistry*, *286*(2), 1204–1215.

Serber, Z., & Ferrell, J. E., Jr (2007). Tuning bulk electrostatics to regulate protein function. *Cell*, *128*(3), 441–444.

Shaya, O. A., Yang, P., Ni, R., Zhao, Y., & Piva, A. (2018). A New Dataset for Source Identification of High Dynamic Range Images. *Sensors*, *18*(11), 3801.

Shibata, T., Nishinaka, T., Mikawa, T., Aihara, H., Kurumizaka, H., Yokoyama, S., & Ito, Y. (2001). Homologous genetic recombination as an intrinsic dynamic property of a DNA structure induced by RecA/Rad51-family proteins: a possible advantage of DNA over RNA as genomic material. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(15), 8425–8432.

Shin, Y., & Brangwynne, C. P. (2017). Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science (New York, N.Y.)*, *357*(6357), eaaf4382.

Sidibé, H., Khalfallah, Y., Xiao, S., Gómez, N. B., Fakim, H., Tank, E. M. H., Di Tomasso, G., Bareke, E., Aulas, A., McKeever, P. M., Melamed, Z., Destroimaisons, L., Deshaies, J. E., Zinman, L., Parker, J. A., Legault, P., Tétreault, M., Barmada, S. J., Robertson, J., & Vande Velde, C. (2021). TDP-43 stabilizes G3BP1 mRNA: relevance to amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology*, *144*(11), 3461–3476.

Simpson, E. P., Henry, Y. K., Henkel, J. S., Smith, R. G., & Appel, S. H. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology*, *62*(10), 1758-1765.

Sreedharan, J., Blair, I. P., Tripathi, V. B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J. C., Williams, K. L., Buratti, E., Baralle, F., de Belleruche, J., Mitchell, J. D., Leigh, P. N., Al-Chalabi, A., Miller, C. C., Nicholson, G., & Shaw, C. E. (2008). TDP-43 mutations in familial

and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5870), 1668–1672.

Sternburg, E. L., da Silva, L. A. G., & Dormann, D. (2022). Post-translational modifications on RNA-binding proteins: accelerators, brakes, or passengers in neurodegeneration?. *Trends in biochemical sciences*, 47(1), 6-22.

Sun, M., Bell, W. R., LaClair, K. D., Ling, J., Han, H., Kageyama, Y., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Wong, P. C., & Chen, L. Q. (2017). Cryptic exon incorporation occurs in Alzheimer's brain lacking TDP-43 inclusion but exhibiting nuclear clearance of TDP-43. *Acta Neuropathologica*, 133(6), 923-931.

Sun, X., Duan, Y., Qin, C., Li, J., Duan, G., Deng, X., Ni, J., Cao, X., Xiang, K., Tian, K., Chen, C., Li, A., & Fang, Y. (2018). Distinct multilevel misregulations of Parkin and PINK1 revealed in cell and animal models of TDP-43 proteinopathy. *Cell Death and Disease*, 9(10).

Sun, Y., & Chakrabarty, A. (2017). Phase to Phase with TDP-43. *Biochemistry*, 56(6), 809–823.

Tariq, A., Lin, J., Jackrel, M. E., Hesketh, C. D., Carman, P. J., Mack, K. L., Weitzman, R., Gambogi, C., Hernandez Murillo, O. A., Sweeny, E. A., Gurpinar, E., Yokom, A. L., Gates, S. N., Yee, K., Sudesh, S., Stillman, J., Rizo, A. N., Southworth, D. R., & Shorter, J. (2019). Mining Disaggregase Sequence Space to Safely Counter TDP-43, FUS, and α -Synuclein Proteotoxicity. *Cell reports*, 28(8), 2080–2095.e6.

Tauber, D., Tauber, G., Khong, A., Van Treeck, B., Pelletier, J., & Parker, R. (2020). Modulation of RNA Condensation by the DEAD-Box Protein eIF4A. *Cell*, 180(3), 411–426.e16.

Tian, Y., Wang, Y., Jablonski, A. M., Hu, Y., Sugam, J. A., Koglin, M., Stachel, S. J., Zhou, H., Uslaner, J. M., & Parmentier-Batteur, S. (2021). Tau-tubulin kinase 1 phosphorylates TDP-43 at disease-relevant sites and exacerbates TDP-43 pathology. *Neurobiology of disease*, 161, 105548.

Tollervey, J. R., Curk, T., Rogelj, B., Briese, M., Cereda, M., Kayikci, M., König, J., Hortobágyi, T., Nishimura, A. L., Zupunski, V., Patani, R., Chandran, S., Rot, G., Zupan, B., Shaw, C. E., & Ule, J. (2011). Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nature neuroscience*, 14(4), 452–458.

Tompa, P., & Fersht, A. (2009). *Structure and function of intrinsically disordered proteins*. CRC press.

Tsoi, P. S., Choi, K. J., Leonard, P. G., Sizovs, A., Moosa, M. M., MacKenzie, K. R., Ferreon, J. C., & Ferreon, A. C. M. (2017). The N-Terminal Domain of ALS-Linked TDP-43 Assembles without Misfolding. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 56(41), 12590–12593.

Tsoi PS, Quan MD, Ferreon JC, Ferreon ACM. Aggregation of Disordered Proteins Associated with Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(4):3380.

Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K. L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P. N., Blair, I. P., Nicholson, G., de Belleruche, J., Gallo, J. M., ... Shaw, C. E. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5918), 1208–1211.

Vernon, R. M., Chong, P. A., Tsang, B., Kim, T. H., Bah, A., Farber, P., Lin, H., & Forman-Kay, J. D. (2018). Pi-Pi contacts are an overlooked protein feature relevant to phase separation. *eLife*, 7, e31486.

Wainger, B. J., Macklin, E. A., Vucic, S., McIllduff, C. E., Paganoni, S., Maragakis, N. J., ... & Cudkovic, M. E. (2021). Effect of ezogabine on cortical and spinal motor neuron excitability in amyotrophic lateral sclerosis: a randomized clinical trial. *JAMA neurology*, 78(2), 186-196.

Wagey, R., Pelech, S. L., Duronio, V., & Krieger, C. (2002). Phosphatidylinositol 3-Kinase : Increased Activity and Protein Level in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 71(2), 716-722.

Walker, A. K., Spiller, K. J., Ge, G., Zheng, A., Xu, Y., Zhou, M., Tripathy, K., Kwong, L. K., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2015). Functional recovery in new mouse models of ALS/FTLD after clearance of pathological cytoplasmic TDP-43. *Acta neuropathologica*, 130(5), 643–660.

Wang, A., Conicella, A. E., Schmidt, H. B., Martin, E. W., Rhoads, S. N., Reeb, A. N., Nourse, A., Ramirez Montero, D., Ryan, V. H., Rohatgi, R., Shewmaker, F., Naik, M. T., Mittag, T., Ayala, Y. M., & Fawzi, N. L. (2018). A single N-terminal phosphomimic disrupts TDP-43 polymerization, phase separation, and RNA splicing. *The EMBO journal*, 37(5), e97452.

Wang, C., Duan, Y., Duan, G., Wang, Q., Zhang, K., Deng, X., Qian, B., Gu, J., Ma, Z., Zhang, S., Guo, L., Liu, C., & Fang, Y. (2020). Stress Induces Dynamic, Cytotoxicity-Antagonizing TDP-43 Nuclear Bodies via Paraspeckle LncRNA NEAT1-Mediated Liquid-Liquid Phase Separation. *Molecular cell*, 79(3), 443–458.e7.

Wang, I. F., Guo, B. S., Liu, Y. C., Wu, C. C., Yang, C. H., Tsai, K. J., & Shen, C. K. (2012). Autophagy activators rescue and alleviate pathogenesis of a mouse model with proteinopathies of the TAR DNA-binding protein 43. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(37), 15024–15029.

Wang, I. F., Wu, L. S., & Shen, C. K. (2008). TDP-43: an emerging new player in neurodegenerative diseases. *Trends in molecular medicine*, *14*(11), 479–485.

Wang, P., Wander, C. M., Yuan, C., Bereman, M. S., & Cohen, T. J. (2017). Acetylation-induced TDP-43 pathology is suppressed by an HSF1-dependent chaperone program. *Nature Communications*, *8*(1).

Wang, W., Li, L., Lin, W. L., Dickson, D. W., Petrucelli, L., Zhang, T., & Wang, X. (2013). The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Human molecular genetics*, *22*(23), 4706–4719.

Webster, C. R., Smith, E., Shaw, C., & De Vos, K. J. (2017). Protein Homeostasis in Amyotrophic Lateral Sclerosis : Therapeutic Opportunities ? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*.

Weskamp, K., & Barmada, S. J. (2018). TDP43 and RNA instability in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research*, *1693*, 67–74.

Winton, M. J., Igaz, L. M., Wong, M. M., Kwong, L. K., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2008). Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *The Journal of biological chemistry*, *283*(19), 13302–13309.

Winton, M. J., Igaz, L. M., Wong, M. M., Kwong, L. K., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2008). Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *The Journal of biological chemistry*, *283*(19), 13302–13309.

Witzel, S., Maier, A., Steinbach, R., Grosskreutz, J., Koch, J. C., Sarikidi, A., Petri, S., Günther, R., Wolf, J., Hermann, A., Prudlo, J., Cordts, I., Lingor, P., Löscher, W. N., Kohl, Z., Hagenacker, T., Ruckes, C., Koch, B., Spittel, S., Günther, K., ... German Motor Neuron Disease Network (MND-NET) (2022). Safety and Effectiveness of Long-term Intravenous Administration of Edaravone for Treatment of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA neurology*, *79*(2), 121–130.

Woerner, A. C., Frottin, F., Hornburg, D., Feng, L. R., Meissner, F., Patra, M., Tatzelt, J., Mann, M., Winklhofer, K. F., Hartl, F. U., & Hipp, M. S. (2016). Cytoplasmic protein

aggregates interfere with nucleocytoplasmic transport of protein and RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6269), 173–176.

Wu, X., Cai, Q., Shen, Z., Chen, X., Zeng, M., Du, S., & Zhang, M. (2019). RIM and RIM-BP Form Presynaptic Active-Zone-like Condensates via Phase Separation. *Molecular cell*, 73(5), 971–984.e5.

Yoshizawa, T., Ali, R., Jiou, J., Fung, H. Y. J., Burke, K. A., Kim, S. J., Lin, Y., Peeples, W. B., Saltzberg, D., Soniat, M., Baumhardt, J. M., Oldenbourg, R., Sali, A., Fawzi, N. L., Rosen, M. K., & Chook, Y. M. (2018). Nuclear Import Receptor Inhibits Phase Separation of FUS through Binding to Multiple Sites. *Cell*, 173(3), 693–705.e22.

Yu, H., Lu, S., Gasior, K., Singh, D., Vazquez-Sanchez, S., Tapia, O., D, T., Beccari, M. S., Yates, J. R., Da Cruz, S., Newby, J. M., Lafarga, M., Gladfelter, A. S., Villa, E., & Page, D. C. (2021). HSP70 chaperones RNA-free TDP-43 into anisotropic intranuclear liquid spherical shells. *Science*, 371(6529).

Yu, H., Lu, S., Gasior, K., Singh, D., Vazquez-Sanchez, S., Tapia, O., Toprani, D., Beccari, M. S., Yates, J. R., 3rd, Da Cruz, S., Newby, J. M., Lafarga, M., Gladfelter, A. S., Villa, E., & Cleveland, D. W. (2021). HSP70 chaperones RNA-free TDP-43 into anisotropic intranuclear liquid spherical shells. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6529), eabb4309.

Zacco, E., Graña-Montes, R., Martin, S. R., de Groot, N. S., Alfano, C., Tartaglia, G. G., & Pastore, A. (2019). RNA as a key factor in driving or preventing self-assembly of the TAR DNA-binding protein 43. *Journal of molecular biology*, 431(8), 1671–1688.

Zhang, C., Lu, T., Zhang, Y., Li, J., Tarique, I., Wen, F., Chen, A., Wang, J., Zhang, Z., Zhang, Y., Shi, D. L., & Shao, M. (2021). Rapid generation of maternal mutants via oocyte transgenic expression of CRISPR-Cas9 and sgRNAs in zebrafish. *Science advances*, 7(32), eabg4243.

Zhang, L., Chen, Y., Liu, M., Wang, Y., & Peng, G. (2020). TDP-43 and Limbic-Predominant Age-Related TDP-43 Encephalopathy. *Frontiers in aging neuroscience*, 11, 376.

Zhang, L., Chen, Y., Liu, M., Wang, Y., & Peng, G. (2020). TDP-43 and Limbic-Predominant Age-Related TDP-43 Encephalopathy. *Frontiers in aging neuroscience*, 11, 376.

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

Zhang, Y. J., Xu, Y. F., Cook, C., Gendron, T. F., Roettges, P., Link, C. D., Lin, W. L., Tong, J., Castanedes-Casey, M., Ash, P., Gass, J., Rangachari, V., Buratti, E., Baralle, F., Golde, T. E., Dickson, D. W., & Petrucelli, L. (2009). Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(18), 7607–7612.

Zinszner, H., Sok, J., Immanuel, D., Yin, Y., & Ron, D. (1997). TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling. *Journal of cell science*, *110* (Pt 15), 1741–1750.

Zuo, X., Zhou, J., Li, Y., Wu, K., Chen, Z., Luo, Z., ... & Fu, X. D. (2021). TDP-43 aggregation induced by oxidative stress causes global mitochondrial imbalance in ALS. *Nature structural & molecular biology*, *28*(2), 132-142.

Titre : Impact de la phosphorylation du domaine C-terminal de TDP-43 sur son auto-association : implications dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA)

Mots clés : Protéines de liaison à l'ARN, TDP-43, maladies neurodégénératives, agrégation protéique, auto-association de TDP-43, phosphorylation, criblage de molécules

Résumé : L'agrégation des protéines est une caractéristique de nombreux troubles neurodégénératifs, y compris la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Cette maladie se caractérise par l'accumulation cytoplasmique de *TAR DNA-binding protein 43* (TDP-43), une protéine de liaison à l'ARN, dans les motoneurons des malades. Malheureusement, il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour cette affection dévastatrice. Dans cette étude, nous avons développé une approche *in cellulo* automatisée afin de quantifier l'autoassemblage de TDP-43 dans le cytoplasme en utilisant les microtubules des cellules HeLa comme nanoplateformes. Pour cela, nous avons combiné le microscope à haut contenu (HCS) et la technique du *Microtubule Bench*, déjà breveté par le laboratoire SABNP, afin de reconstituer les autoassemblages cytoplasmiques de TDP-43, en fonction de l'état de phosphorylation de son domaine C-terminal. Nous avons validé cette approche automatisée en évaluant l'impact de mutations phosphomimétiques sur l'autoassociation de TDP-43. Nos résultats ont permis de montrer que l'hyperphosphorylation C-terminale, favorise la réduction des autoassemblages cytoplasmiques ainsi que la diminution du recrutement de TDP-43 dans les granules de

Un premier test de criblage a permis d'identifier 16 molécules hits, dont 14 inhibiteurs de kinases qui réduisent les autoassemblages phospho-dépendants de TDP-43, et 2 inhibiteurs de phosphatases qui ont l'effet inverse. Nous avons sélectionné 13 composés afin de réaliser des tests de criblage *in cellulo* supplémentaires sur des cellules HeLa et NSC-34. Nous avons obtenu une corrélation claire entre l'effet des composés sur les autoassemblages cytoplasmiques de TDP-43 et sur le transport nucléo-cytoplasmique de TDP-43. En effet, nos résultats démontrent que les inhibiteurs de kinases sélectionnés régulent négativement les niveaux nucléaires de la forme sauvage de TDP-43, tandis que l'inverse est observé avec les inhibiteurs de phosphatases sélectionnés. Nos résultats ont également démontré que les inhibiteurs de kinases perturbent l'import nucléaire de la forme sauvage de TDP-43, ce qui est également le cas pour la forme hypo-phosphorylée de TDP-43 en conditions non-traitée. Enfin, nous avons constaté que la forme hypo-phosphorylée de TDP-43 favorise les autoassemblages cytoplasmiques de TDP-43 dans le cytoplasme, ce qui pourrait expliquer l'accumulation cytoplasmique et la perte de l'importation nucléaire. En conclusion,

stress (GS) en conditions de stress aigu de type arsénite. En revanche, en conditions de stress léger, le recrutement de TDP-43 dans les GS est indépendant de la phosphorylation. Nos expériences ont permis de mettre en évidence pour la première fois, un effet de l'état de phosphorylation sur la localisation subcellulaire de TDP-43. La phosphorylation de TDP-43 a tendance à retenir la protéine dans le noyau tandis que l'hypo-phosphorylation favorise l'accumulation cytoplasmique de TDP-43. Une fois les phénotypes associés à la phosphorylation identifiés, nous avons tentés de les corriger avec des petites molécules. Pour cela, nous avons mis au point une plateforme de criblage, et cribler 134 composés issus d'une librairie commerciale dont 98 inhibiteurs de kinases et 36 inhibiteurs de phosphatases.

nos études suggèrent que la réduction des autoassemblages cytoplasmiques de TDP-43, en modulant l'état de phosphorylation de son domaine CTD, pourrait constituer une stratégie prometteuse pour restaurer la localisation nucléaire de TDP-43 dans la SLA et dans d'autres protéinopathies associées à TDP-43. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives de criblage à haut débit afin d'identifier des composés ciblant TDP-43 et son autoassemblage. Cela contribuera au développement de thérapies ciblées visant à atténuer les manifestations pathologiques associées à l'accumulation cytoplasmique de TDP-43.

Title : Impact of phosphorylation of the C-terminal domain of TDP-43 on its self-assembly : implications in amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

Keywords : RNA-binding proteins, TDP-43, neurodegenerative diseases, protein aggregation, TDP-43 self-association, phosphorylation, molecule screening

Abstract : Protein aggregation is a feature of many neurodegenerative disorders, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS). This disease is characterized by cytoplasmic accumulation of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43), an RNA-binding protein, in patients' motor neurons. Unfortunately, there is no curative treatment for this devastating condition. In this study, we developed an automated *in cellulo* approach to quantify TDP-43 self-assembly in the cytoplasm using HeLa cell microtubules as nanoplatforms. To this end, we combined the High Content Screening Microscope (HCS) and the Microtubule Bench technique, already patented by the SABNP laboratory, to reconstitute the cytoplasmic self-assemblies of TDP-43, depending on the phosphorylation state of its C-terminal domain. We validated this automated approach by assessing the impact of phosphomimetic mutations on TDP-43 self-association. Our results showed that C-terminal hyper-phosphorylation promotes reduced cytoplasmic self-assembly and reduced recruitment of TDP-43 to stress granules (GS) under conditions of acute arsenite stress. In contrast, under mild stress conditions, TDP-43 recruitment to GS is independent of phosphorylation. Our experiments revealed, for the first time, A first screening test identified 16 hit compounds, including 14 kinase inhibitors that reduce TDP-43 phospho-dependent self-assembly, and 2 phosphatase inhibitors that have the opposite effect. We selected 13 compounds for further *in cellulo* screening in HeLa and NSC-34 cells. We obtained a clear correlation between the effect of the compounds on TDP-43 cytoplasmic self-assemblies and on TDP-43 nucleocytoplasmic transport. Indeed, our results demonstrate that selected kinase inhibitors negatively regulate nuclear levels of wild-type TDP-43, while the opposite is observed with selected phosphatase inhibitors. Our results also demonstrated that kinase inhibitors disrupt the nuclear import of the wild-type form of TDP-43, which is also the case for the hypo-phosphorylated form of TDP-43 under untreated conditions. Finally, we found that the hypo-phosphorylated form of TDP-43 promotes cytoplasmic self-assemblies of TDP-43 in the cytoplasm, which could explain the cytoplasmic accumulation and loss of nuclear import. In conclusion, our studies suggest that reducing TDP-43 cytoplasmic self-assemblies, by modulating the phosphorylation state of its CTD domain, could be a promising strategy to restore

the presence of a phosphorylation status on the subcellular localization of TDP-43. Phosphorylation of TDP-43 tends to retain the protein in the nucleus, while hypophosphorylation promotes cytoplasmic accumulation of TDP-43. Once we had identified the phenotypes associated with phosphorylation, we attempted to correct them with small molecules. To this end, we developed a screening platform and screened 134 compounds from a commercial library, including 98 kinase inhibitors and 36 phosphatase inhibitors.

TDP-43 nuclear localization in ALS and other TDP-43-associated proteinopathies. Our results open new prospects for high-throughput screening to identify compounds targeting TDP-43 and its self-assembly. This will contribute to the development of targeted therapies aimed at alleviating the pathological manifestations associated with cytoplasmic accumulation of TDP-43.