

Université de Montréal

Influence de TDP-43 sur la régulation de hnRNP A1 : un impact potentiel sur la sclérose latérale amyotrophique

Par

Stéphanie Stabile

Département de neurosciences

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en sciences neurologiques

Décembre 2013

© Stéphanie Stabile, 2013

Résumé

La SLA est une maladie neurodégénérative fatale se déclenchant tardivement. Elle est caractérisée par la perte des neurones moteurs supérieurs et inférieurs. Jusqu'à présent, aucun traitement ne permet de ralentir ou de guérir la maladie de façon robuste. De récentes découvertes portant sur TDP-43 et hnRNP A1 y ont identifié des mutations reliées à des cas de SLA. Comme les deux possèdent de multiples fonctions dans le métabolisme de l'ARN, l'impact de ces mutations devient difficile à définir. Notre hypothèse est que TDP-43 régule hnRNP A1 et que les mutations causant la SLA dérégulent ce mécanisme, aboutissant ainsi à un impact majeur sur la vulnérabilité des neurones moteurs. Nos résultats démontrent que TDP-43 lie l'ARNm de hnRNP A1, mais n'affecte pas sa stabilité. En revanche, TDP-43 réprime l'expression de hnRNP A1. Ce mécanisme pourrait être appliqué *in vivo* où le ratio protéique hnRNP A1^B/A1 augmente chez les souris âgées et davantage chez les TDP-43^{A315T} dans la région cervicale et lombaire de la moelle épinière. Cette différence n'est pas causée par un défaut de l'épissage alternatif. Aussi, la mutation TDP-43^{A315T} serait davantage responsable de cette différence que la surexpression de TDP-43 (résultats obtenus en culture). L'impact d'une telle augmentation sur la cellule pourrait être la formation d'agrégats puisque la forme hnRNP A1^B possède quatre domaines de fibrillation de plus que hnRNP A1. Nos résultats pourraient donc fournir un mécanisme potentiel de la formation d'inclusions cytoplasmiques reconnues comme étant une des caractéristiques pathologiques principales de la SLA.

Mots clés : SLA, TDP-43, hnRNP A1, transcription, épissage alternatif, agrégation

Abstract

ALS is a fatal and late onset disease characterized by the selective loss of lower and upper motor neurons. Yet, there is no way to robustly slow or cure the disease. Recent discoveries concern TDP-43 and hnRNP A1 where mutations have been identified in ALS cases. Both have multiple functions in RNA metabolism, making the impact of mutations difficult to define. Our hypothesis is that TDP-43 regulates hnRNP A1 and that the ALS causative mutations deregulate this mechanism, having a major impact on the vulnerability of motor neurons. Our results demonstrate that TDP-43 binds hnRNP A1 mRNA, but does not affect its stability. In contrast, TDP-43 represses the expression of hnRNP A1. This mechanism could be applied *in vivo* where hnRNP A1^B/A1 protein ratio increases in aged mice and even more in TDP-43^{A315T} mice in the cervical and lumbar region of the spinal cord. This difference is not caused by a defect in alternative splicing. Also, the TDP-43^{A315T} mutation would be more responsible for this difference than the overexpression of TDP-43 (result from cell culture). The impact of that increased on the cell could be the formation of aggregates since the shape of hnRNP A1^B has four more areas of fibrillation than hnRNP A1. Our findings could thus provide a potential mechanism for the formation of cytoplasmic inclusions recognized as one of the main pathological features of ALS.

Key Words: ALS, TDP-43, hnRNP A1, transcription, alternative splicing, aggregation

Table des matières

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
DÉDICACE	XII
REMERCIEMENTS	XIII
INTRODUCTION	14
1. Sclérose latérale amyotrophique typique	14
1.1 Définition	14
1.2 Épidémiologie	14
1.3 Phénotypes	15
1.3.1 Neuropathologiques	15
1.3.1.1 Dégénérescence du système moteur	15
1.3.1.2 Présence d'agrégats protéiques	16
1.3.2 Cliniques	17
1.4 Étiologie	17
1.4.1 Gènes impliqués	18
1.4.2 Mécanismes moléculaires	19
2. Transactive response DNA-binding protein 43	21
2.1 Structure	21
2.2 Fonctions	22
2.3 Implication dans la SLA	24
2.3.1 Inclusions cytoplasmiques	24
2.3.2. Mutations	25

2.3.3 Dérégulation de la transcription et du métabolisme de l'ARN	26
3. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	26
3.1 Structure	26
3.2 Épissage alternatif de hnRNP A1	28
3.3 Fonctions générales	30
3.4 Implication dans la SLA	32
4. Les liens entre TDP-43 et hnRNP A1	32
4.1 Similarités structurelles	32
4.2 Similarités fonctionnelles	33
4.3 Implications dans la SLA	33
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	34
MATÉRIEL ET MÉTHODES	35
1. Cultures cellulaires et transfections	35
2. Co-immunoprécipitation protéine-ARN	35
3. Lyses cellulaires et analyse des immunoblots	36
4. Essai de la luciférase	37
5. Extraction d'ARN et RT-PCR	37
6. Hybridation fluorescente in situ	38
7. Viabilité cellulaire	39
8. Souris	39
9. Statistiques	40
RÉSULTATS	41
1. TDP-43 lie l'ARNm de hnRNP A1, mais n'affecte pas sa stabilité.	41
2. TDP-43 influence la transcription de hnRNP A1	42
3. Chez la souris, la présence de la forme hnRNP A1 ^B par rapport à hnRNP A1 est dérégulée avec l'âge dans la région cervicale et lombaire de la moelle épinière. Cette perturbation chez les souris âgées est exacerbée par la mutation TDP-43 ^{A315T} .	45

4. La perturbation au niveau du ratio protéique de hnRNP A1 ^B /A1 avec l'âge et la mutation TDP-43 ^{A315T} dans la région cervicale et lombaire de la moelle épinière de souris n'est pas due à l'épissage alternatif. _____	49
5. L'augmentation dans le ratio protéique hnRNP A1 ^B /hnRNP A1 chez les souris transgéniques TDP-43 ^{A315T} âgées de 10 mois, dans la région cervicale et lombaire de la moelle épinière, est probablement due à la mutation A315T plutôt qu'à la surexpression de TDP-43 d'après les résultats obtenus en culture cellulaire. _____	50
6. La forme pleine longueur hnRNP A1 ^B a un potentiel de fibrillation plus élevé que hnRNP A1. _____	51
DISCUSSION ET PERSPECTIVES _____	54
CONCLUSION _____	63
BIBLIOGRAPHIE _____	64
APPENDICE _____	LXXV
1. La diminution de l'expression de TDP-43 n'affecte pas la distribution globale des ARNm polyadénylés _____	lxxv
2. L'assemblage des granules de stress est assuré par G3BP et une diminution directe de son expression par ARNi rend les cellules neuronales (SK-N-SH) plus vulnérables au stress oxydatif que les cellules non-neuronales (HeLa). _____	lxxvii

Liste des tableaux

Tableau 1 | Causes génétiques de la SLA _____ 19

Liste des figures

Figure 1 Organisation du système moteur humain _____	16
Figure 2 Caractéristiques morphologiques de la SLA sous la forme d'inclusions intraneurales. _____	17
Figure 3 Mécanismes moléculaires de la perte des neurones moteurs dans la SLA _____	20
Figure 4 Structure de TDP-43 _____	22
Figure 5 Phosphorylation et localisation cytoplasmique de TDP-43 chez les patients FTLD. 24	
Figure 6 Mutations de TDP-43 _____	25
Figure 7 Schéma du transcrit primaire de hnRNP A1 _____	28
Figure 8 Rôle de hnRNP A1 dans son propre épissage alternatif _____	29
Figure 9 L'exclusion de l'exon 7B requiert plusieurs facteurs et éléments _____	30
Figure 10 TDP-43 lie l'ARNm de hnRNP A1, mais n'affecte pas sa stabilité. _____	42
Figure 11 TDP-43 est un répresseur de hnRNP A1 _____	44
Figure 12 Le ratio protéique hnRNP A1 ^B /hnRNP A1 est augmenté dans la région cervicale et lombaire de la moelle épinière chez les souris âgées de 10 mois. Cette augmentation est encore plus importante avec les souris transgéniques TDP-43 ^{A315T} . _____	48
Figure 13 Le ratio d'ARNm hnRNP A1 ^B /A1 est inchangé selon l'âge ou le génotype. ____	49
Figure 14 La mutation TDP-43 ^{A315T} , plutôt que la surexpression de TDP-43, serait impliquée dans le changement du ratio protéique hnRNP A1 ^B /A1 observé chez les souris TDP-43 ^{A315T} âgées de 10 mois. _____	51
Figure 15 hnRNP A1 ^B contient quatre domaines de fibrillation de plus que hnRNP A1. __	53
Figure 16 La sous-expression de TDP-43 induit une augmentation protéique de hnRNP A1 ^B cytoplasmique qui n'affecte pas la distribution globale d'ARNm polyadénylés _____	lxxvi
Figure 17 Les cellules neuronales sont plus vulnérables à une perturbation au niveau de l'assemblage des granules de stress _____	lxxix

Liste des abréviations

3'UTR : 3' untranslated region

ABL : c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase

ATXN2 : ataxin-2

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ADN : acide désoxyribonucléique,

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ARE : adenylate and uridylate-rich elements

BRCA2 : breast Cancer 2

CaMKII : Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II

C9ORF72 : chromosome 9 open reading frame 72

CE : conservative element

CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CLIP: cross-linking and immunoprecipitation

C-Myb : myeloblastosis oncogene

C-Myc : v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog

DNA : desoxyribonucleic acid

EAAT2 : excitatory amino acid transporter 2

ER: endoplasmic reticulum

FALS: familial amyotrophic lateral sclerosis

FBS : foetal bovin serum

FLAG : séquence DYKDDDDK

FTLD : frontal temporal lobar dementia

FUS/TLS : fused in sarcoma/translocated in liposarcoma

G3BP : ras GTPase-activating protein-binding protein

GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GFP : green fluorescent protein

GRR : glycine-rich region

hnRNP A1 : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1

HSPA01 : heat shock protein A 01

IL: interleukin

MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1

NES : nuclear export signal

NF1 : neurofibromatose 1

NGF : nerve growth factor

NLS : nuclear localization signal

NO : nitric oxide

OPTN : optineurin

PCR : polymerase Chain Reaction

PGE2: prostaglandin E2

RB1 : rétinoblastome 1

RISC : RNA-induced silencing complex

ROS : reactive oxygen species

RRM1 : RNA recognition motif 1

RRM2 : RNA recognition motif 2

RT : reverse transcription

SEM : standard error of the mean

siARN : ARN interférent

SLA : sclérose latérale amyotrophique

SLP : sclérose latérale primaire

snRNPs : smalls nuclear ribonucleoproteins

SOD1 : superoxide dismutase 1

SP-10 : spermatid-specific gene

SR : sérine arginine riche

TAR : transactivation response

TARDBP : transactivation response DNA-binding protein

TDP-43 : transactivation response DNA-binding protein 43

TIA-1 : T-cell intracellular antigen-1

TP : température pièce

UBQLN2 : ubiquilin-2

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Dédicace



*Pour tous ceux et celles qui luttent chaque
jour contre la SLA ainsi que pour leur
famille.*

Remerciements

Je voudrais particulièrement remercier ma directrice de recherche, Christine Vande Velde, pour m'avoir donné l'opportunité de vivre cette expérience unique et enrichissante. Merci pour votre motivation contagieuse qui m'a permis de continuer à croire à mon projet lors de moments plus difficiles. Merci aussi pour vos conseils précieux, votre disponibilité, votre support et votre compréhension qui m'ont aidée à faire évoluer mon projet et à repousser mes limites. Merci pour votre confiance.

Je tiens également à remercier mes collègues de travail. Anaïs Aulas, pour m'avoir appris toutes les techniques utilisées dans le laboratoire et avoir été une personne ressource à mon arrivée. Merci pour ton aide précieuse. Laurie Destroismaisons, pour toute l'aide inestimable que tu m'as donné au travers de mes expériences. Surtout, merci pour ton écoute et d'avoir été là pour moi. Sarah Peyrard, pour m'avoir transmis ton savoir sur toutes les techniques concernant les animaux ainsi que ton aide généreuse. Merci aussi pour ton écoute et ta compréhension. Merci également à Sarah Pickles pour tes chers appuis et conseils. Merci aussi à Guillaume Caron, Yousra Khalfallah et Sabrina Semmler pour votre aide. Un grand merci à tous pour votre esprit d'équipe et encouragements!

Un merci aussi particulier à ma famille : mon père, Gaëtan Stabile, qui m'a appris à ne jamais baisser les bras, à ma mère, France Fontaine, pour toutes ses petites attentions et à ma chère sœur, Karine Stabile, pour sa philosophie de un jour à la fois. Un grand merci aussi à ma complice, Stéphanie Delisle-Goudreau, pour nos douze ans d'*insides* qui m'ont permis de passer à travers de bien des étapes. Merci également à mon amour, Pier-Olivier Tringle, de m'avoir autant encouragée, d'être là pour moi, de toujours trouver les mots qu'il faut et de me rendre aussi heureuse. Enfin, merci à ma petite boule de poil pleine d'amour, mon chien le capitaine Haddock, pour tout le bonheur et la joie que tu mets dans ma vie.

Introduction

1. Sclérose latérale amyotrophique typique

1.1 Définition

Le neurologue Français Jean-Martin Charcot a été le premier à décrire la SLA comme étant une paralysie progressive et fatale dans les Leçons du Mardi de la Salpêtrière (Charcot et al. 1892). Il y souligne la présence de cicatrices et de durcissements (sclérose) au niveau des colonnes latérales de la moelle épinière (latérale). La dégénérescence et la mort des neurones moteurs les empêchent d'envoyer des impulsions aux muscles qui finissent ainsi par rétrécir et dépérir (amyotrophique). Elle porte depuis aussi son nom, maladie de Charcot, ou maladie de Lou Gehrig aux États-Unis en l'honneur du célèbre joueur de baseball américain qui en est décédé.

1.2 Épidémiologie

L'incidence de la SLA est de 2 cas sur 100 000 annuellement dans le monde, sauf pour les régions de la péninsule de Kii et Guam où l'incidence est plus élevée. Elle survient généralement entre 55 et 60 ans et frappe plus souvent les hommes que les femmes (Ferraiuolo et al. 2011). La progression de la maladie est extrêmement rapide. Aux États-Unis, l'espérance de vie d'environ 50 % des patients est de deux à trois ans à la suite du diagnostic (Vande et al. 2011). Le plus souvent, les patients décèdent à la suite d'un arrêt respiratoire causé par la dénervation des muscles qui y sont impliqués. Jusqu'à maintenant, seul le riluzole, un antagoniste du glutamate, permet d'améliorer l'espérance de vie de trois à six mois seulement (Lacomblez et al. 1996; Bensimon et al. 1994).

1.3 Phénotypes

1.3.1 Neuropathologiques

1.3.1.1 Dégénérescence du système moteur

Les neurones moteurs supérieurs (Figure 1, Shaw 2001), issus de la couche V au niveau des cellules de Betz du cortex moteur (aire 4 de Brodmann), projettent leur axone dans le corps calleux, le centre semi-ovale, la capsule interne, le pédoncule cérébral, le pontis de base, la pyramide médullaire et les colonnes latérales. Ce sont spécifiquement ces neurones moteurs supérieurs qui sont affectées par la dégénérescence axonale (Ravits et al. 2013).

Quant aux neurones moteurs inférieurs (Figure 1, Shaw 2001), ils sont plutôt issus du tronc cérébral et de la lame IX de Rexed de la corne antérieure de la colonne vertébrale. La dégénérescence axonale de leurs projections au niveau des racines antérieures et des nerfs périphériques conduit à la dénervation musculaire (Ravits et al. 2013).

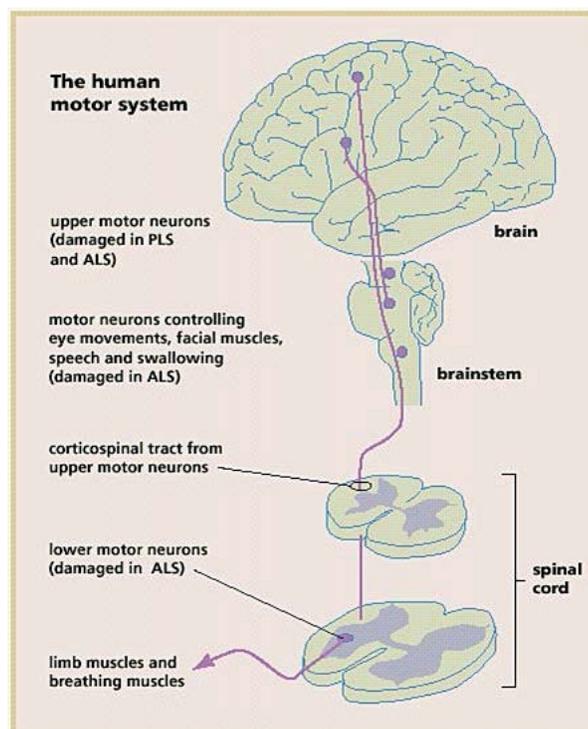


Figure 1 | Organisation du système moteur humain

Dans la SLA, les neurones moteurs supérieurs et inférieurs sont endommagés. Dans la SLP, les neurones moteurs seulement sont endommagés (Shaw, 2001).

Une modification de la forme et des fonctions des astrocytes produisant des débris cellulaires, l'acquisition d'une forme spongieuse de la région affectée ainsi que l'activation des microglies sont des phénomènes également observés. Jusqu'à présent, le fait que ces changements soient une cause ou une conséquence de la SLA est encore inconnu (Ravits et al. 2013).

1.3.1.2 Présence d'agrégats protéiques

Une des principales caractéristiques de la SLA est la présence d'agrégats protéiques dans les neurones moteurs de la moelle épinière. Toutefois, il est possible de les retrouver au sein d'autres régions du cerveau, tels que le cortex frontal et temporal ainsi que l'hippocampe et le cervelet (Al-Chalabi et al. 2012). Ces agrégats peuvent être divisés en deux catégories, soit les inclusions *skein-like*, ou les corps de Bunina (Figure 2, Charité Campus Virchow-Klinikum, 2009). Les inclusions *skein-like* réagissent positivement à l'anticorps anti-ubiquitine et ressemblent à des filaments désorganisés recouverts de petites granules (Piao et al. 2003) contrairement aux corps de Bunina qui sont plutôt éosinophiliques et prennent l'apparence de matériel dense et amorphe entouré de structures tubulaires et vésiculaires (Okamoto et al. 2008). Les constituants des inclusions *skein-like* sont SOD1 (Rosen et al. 1993), TDP-43 (Arai et al. 2006; Neumann et al. 2006), FUS/TLS (Kwiatkowski et al. 2009; Vance et al. 2009), OPTN (Hortobagyi et al. 2011), UBQLN2 (Williams et al. 2012), ATXN2 (Elden et al. 2010) et C9ORF72 (Al-Sarraj et al. 2011) alors que la cystatine C et la transferrine sont les principales composantes des corps de Bunina (Okamoto et al. 2008).

Il est donc clair que l'agrégation de protéines soit un phénomène important dans la pathologie de la SLA. Par contre, ni leur rôle, formation ou encore mécanisme d'action sont connus jusqu'à présent (Blokhuis et al. 2013).

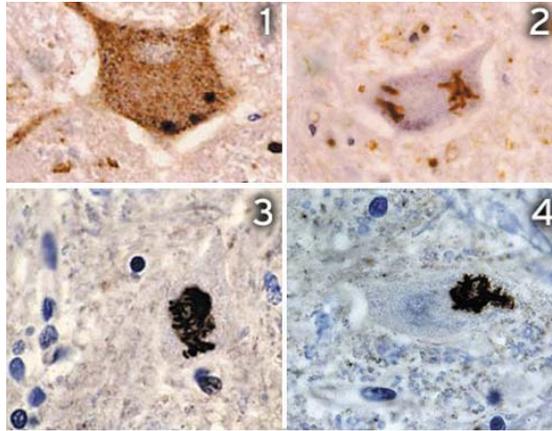


Figure 2 | Caractéristiques morphologiques de la SLA sous la forme d'inclusions intraneurales.

(1) Corps de Bunina (anticorps anti-cystatine) ; **(2-4)** Inclusions skein-like (anticorps anti-ubiquitine) (Charité Campus Virchow-Klinikum, 2009).

1.3.2 Cliniques

La SLA typique atteint à la fois les neurones moteurs supérieurs et les neurones moteurs inférieurs avec souvent une prédominance pour l'un ou l'autre. L'apparition des symptômes peut provenir de différentes régions du corps, à savoir les jambes, les bras et le bulbe rachidien. De cette façon, le patient ressent une faiblesse musculaire qui se traduit par une difficulté à marcher, à prendre des objets sans les échapper ou bien à parler, mastiquer ou avaler selon la région atteinte respectivement. Plus rarement, la SLA typique peut commencer par une faiblesse plutôt au niveau du tronc et/ou de la respiration. Le pronostique de la SLA typique est habituellement très pauvre (Ravit et al. 2013).

1.4 Étiologie

Les phénotypes cliniques décrits précédemment sont très différents, que ce soit en raison des régions affectées ou encore de la progression des symptômes. Pourtant, la cause peut autant être génétique (environ 10% des cas) que sporadique (environ 90% des cas), c'est-à-dire d'origine inconnue (Dion et al. 2009). Alors que chaque gène peut posséder son propre mécanisme pathogénique, les inclusions cytoplasmiques retrouvées dans les tissus

post-mortem de patients sont une des caractéristiques principales de la SLA sporadique (Neumann et al. 2006). Par conséquent, chaque phénotype peut avoir plusieurs mécanismes moléculaires possibles, expliquant toute la complexité de cette maladie neurodégénérative.

1.4.1 Gènes impliqués

Voici un tableau récapitulatif des gènes impliqués dans la SLA découverts jusqu'à présent (tableau 1, adapté de Robberecht et al. 2013). hnRNP A1 a été ajoutée dans ce tableau en raison de l'identification récente de mutations liées à la SLA (Kim et al. 2013). Son pourcentage estimé dans les cas de SLA familial n'est pas véritablement connu, mais une étude suggère que les mutations qui y sont associées soient rares (LeBer et al. 2013).

Mutant molecule	Gene locus	Inheritance	Estimated % of FALS
Enzyme			
Superoxide dismutase 1 (SOD1)	21q22.1	Dominant	20%
RNA-binding and/or processing protein dysfunction			
TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)	1p36.2	Dominant	1-5%
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1)	12q13.13	Dominant	Unknown
FUS	16p11.2	Dominant	1-5%
TATA-binding protein associated factor 15 (TAF15)	17q11.1-q11.2	Unknown	Unknown
Ewing sarcoma breakpoint region 1 (EWSR1)	Unknown	Unknown	Unknown
Angiogenin (ANG)	14q11.2	Dominant	<1%
Senataxin (SETX)	9q34	Dominant	Unknown
Repeat expansion			
Chromosome 9 open reading frame 72 (C9ORF72)	9p21.3-p13.3	Dominant	40-50%
Ataxin 2 (ATXN2)	12q24	Dominant	<1%
Proteostatic proteins			
Ubiquilin 2 (UBQLN2)	Xp11	Dominant	<1%
Optineurin (OPTN)	10p15-p14	Dominant	<1%
Sequestosome (SQSTM1)	5q35	Dominant	Unknown
Valosin-containing protein (VCP)	9p13	Dominant	<1%
Charged multivesicular body protein 2b (CHMP2B)	3p11	Dominant	Unknown
Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate 5-phosphatase (encoded by <i>FIG4</i>)	6q21	Dominant	Unknown
Excitotoxicity			
D-amino-acid oxidase (DAO)	12q24	Dominant	<1%
Cytoskeleton/cellular transport deficits			
Vesicle-associated membrane protein-associated protein B and C (VAPB)	20q13.3	Dominant	<1%
Peripherin	12q13.12	Sporadic	Unknown
Dynactin 1 (DCTN1)	2p13	Dominant	Unknown
Neurofilament heavy chain (NFH)	22q12.2	Dominant	Unknown
Profilin 1 (PFN1)	17p13.2	Dominant	Unknown
Uncertain			

Spatascin	15q21.1	Recessive	Unknown
Alsin	2q33.2	Recessive	<1%
Awaits identification	18q21	Dominant	Unknown
Awaits identification	20ptel-p13	Dominant	Unknown
Awaits identification	15q15.1-q21.1	Recessive	Unknown

Tableau 1 | Causes génétiques de la SLA

(Adapté de Robberecht et al. 2013).

Bien que les mutations retrouvées dans ces gènes ne représentent que 10% des cas de la SLA (Dion et al. 2009), plusieurs facteurs pourraient mener à une sous-représentation des cas de SLA familiale tel qu'une pénétrance incomplète de la maladie (Andersen et Al-Chalabi, 2011). Aussi, les cas de SLA familiale n'excluent pas la possibilité que des facteurs environnementaux, endogènes ou épigénétiques puissent intervenir dans la pathogénèse.

C'est sur TDP-43 et hnRNP A1 (en vert dans le tableau 1) que porte cette étude et elles sont décrites plus en détails aux sections 2 et 3 de l'introduction respectivement.

1.4.2 Mécanismes moléculaires

Incluant les facteurs génétiques décrits précédemment, plusieurs autres mécanismes moléculaires interagissent et mènent à la perte des neurones moteurs (Figure 3, Ferraiuolo et al. 2011). Il s'agit de stress oxydatif (créant des dommages et des changements dans la signalisation redox-sensible), de dysfonction mitochondriale (qui ont un rôle crucial à jouer dans la production d'énergie intracellulaire, l'homéostasie du calcium et l'apoptose), d'excitotoxicité (qui résulte d'un excès d'activation des récepteurs du glutamate), d'agrégation de protéines (voir section 1.3.1.2 et 3.4), de dérégulation dans le trafic endosomal (processus par lequel les molécules extracellulaires sont internalisées dans la cellule et livrées à un endroit précis), d'une détérioration du transport axonal (particulièrement important vu la longueur des axones), de la neuroinflammation (microglies activées et infiltration de lymphocytes), du stress au niveau du réticulum endoplasmique (processus permettant de corriger le mauvais repliement des protéines, mais dont l'activation prolongée peut mener à l'apoptose) et d'une dérégulation dans la transcription et le métabolisme des ARNs

(principalement lié aux mutations retrouvées dans les gènes codant pour TDP-43 (voir section 2 de l'introduction) et FUS) (Ferraiuolo et al. 2011).

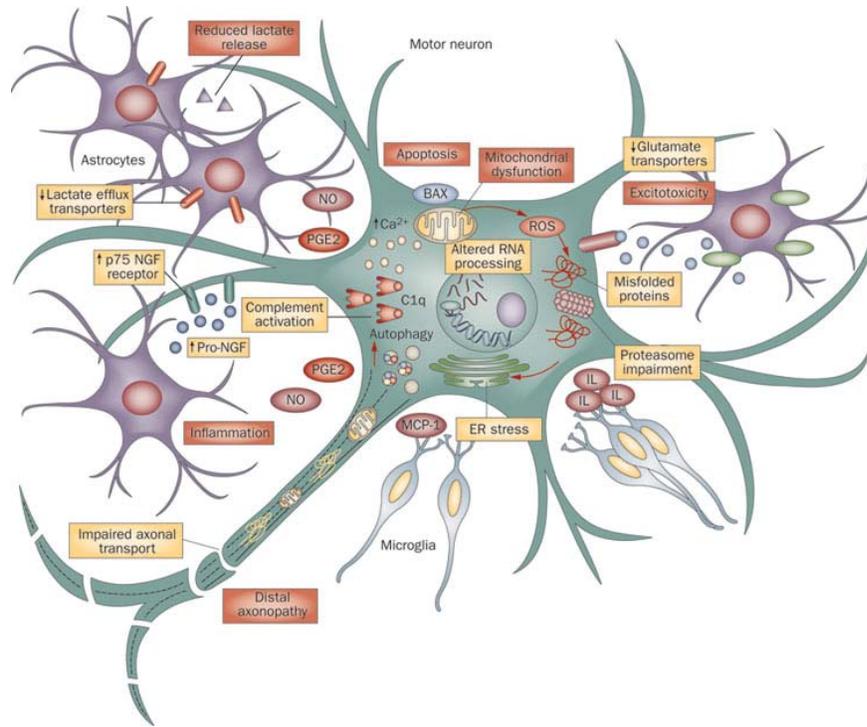


Figure 3 | Mécanismes moléculaires de la perte des neurones moteurs dans la SLA

La SLA est une maladie complexe qui fait intervenir l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire dans les neurones moteurs et la dérégulation d'interactions avec les cellules gliales voisines. Les microglies activent une cascade inflammatoire via la sécrétion de MCP- 1 et d'autres cytokines. Les astrocytes contribuent à la blessure du motoneurone à travers divers mécanismes, y compris la libération de médiateurs de l'inflammation tels que le NO et de PGE2 ; la réduction de l'expression et de l'activité de la recapture du transporteur du glutamate EAAT2; une libération réduite de lactate et l'activation de la signalisation des récepteurs pro-NGF-p75. Les neurones moteurs peuvent également subir une dérégulation de la transcription et un traitement d'ARN anormal qui, avec une surproduction de ROS, contribuent à un repliement aberrant des protéines. Les protéines aberrantes peuvent former des agrégats, conduisant à la dépréciation du protéasome et au stress du RE et, finalement, l'activation de

l'autophagie et voies apoptotiques. L'altération mitochondriale et la dérégulation de la manipulation de calcium sont deux composants principaux de la lésion des neurones moteurs qui entraînent également l'activation de la cascade apoptotique. Un défaut dans le transport axonal peut contribuer à un déficit énergétique dans l'axone distal et l'axonopathie *dying-back* que l'on observe dans la SLA. Les neurones moteurs peuvent produire et sécréter des sous-unités du complément qui sont des signaux importants du stress cellulaire à cellules voisines (Farraiuolo et al. 2011).

2. Transactive response DNA-binding protein 43

2.1 Structure

La protéine TDP-43 est ubiquitaire. Elle est encodée par le gène *TARDBP* situé sur le chromosome 1 (1p36.22). Ce gène est constitué de six exons. Les exons deux à six sont traduits afin de générer la forme majeure de la protéine TDP-43 de 414 acides aminés, soit de 43 kDa (Pesiridis et al. 2009).

La structure de TDP-43 est représentée à la figure 4 ci-dessous (adaptée de Janssens et Broeckhoven, 2013). Elle comporte une extrémité de la région N-terminale nécessaire à la dimérisation de TDP-43 ainsi qu'à sa fonction d'épissage alternatif (Zhang et al. 2013). Elle comprend aussi des signaux de localisation et d'exportation nucléaire (NLS et NES) assurant ainsi son entrée et sa sortie du noyau. La délétion de l'un ou de l'autre entraîne l'agrégation cytoplasmique ou nucléaire de TDP-43 respectivement (Winton et al. 2008). Sa structure comprend aussi deux motifs de reconnaissance à l'ARN (RRM1 et RRM2) qui permettent la liaison de TDP-43 aux différents acides nucléiques, plus spécifiquement ceux qui sont riches en séquences répétées d'uracile et de guanine (Ayala et al. 2005; Buratti et al. 2001). Elle comprend également une région riche en glutamate et asparagine (Q/N) qui joue un rôle important dans l'agrégation de TDP-43 (Fuentelba et al. 2012; Budini et al. 2012). Enfin, son domaine riche en glycine (GRR) est important pour son interaction avec d'autres protéines de la famille des hnRNPs (Buratti et al. 2005) et est aussi le lieu de la plupart des mutations (voir section 2.3.2).

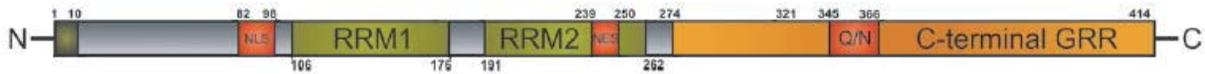


Figure 4 | Structure de TDP-43

Représentation schématique de la structure de TDP-43 avec ses domaines protéiques. TDP-43 comprend un NLS et NES, deux motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM1 et RRM2) et une région riche en glycine C-terminal (GRR) (Adaptée de Janssens et Broeckhoven, 2013).

2.2 Fonctions

TDP-43 fait partie de la famille des hnRNPs et joue donc un rôle important dans le métabolisme des ARNs, incluant la régulation de la transcription, de l'épissage alternatif et des micros ARNs. C'est aussi une protéine nucléocytoplasmique impliquée dans les granules de stress et le transport des ARNs. Ces fonctions sont brièvement décrites ci-dessous (Lagier-Tourenne et al. 2010).

TDP-43 peut être un facteur de transcription, lequel peut activer ou réprimer l'expression d'un gène. Son nom vient de *TAR DNA-binding protein* et d'un poids moléculaire de 43 kDa. TAR est un élément régulateur situé dans la longue répétition terminale du VIH-1. L'ARN TAR forme une boucle nécessaire à l'activation par Tat et autres facteurs. Par contre, d'autres facteurs peuvent se lier à l'ADN TAR afin de réguler son expression. C'est par un essai de retardation sur gel que le groupe Ou et al. (1995) a découvert TDP-43 comme étant une protéine capable de lier les séquences riches en pyrimidine de l'ADN TAR, et non de l'ARN TAR, via ses motifs de reconnaissance à l'ARN. Avec un essai *in vitro* de transcription, ils ont découvert que TDP-43 est un répresseur de TAR indépendamment de Tat probablement en bloquant l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription qui, une fois produit, répond à Tat. Un autre groupe (Acharya et al. 2006) a établi le rôle de TDP-43 dans la répression de la transcription d'une autre cible, soit le gène *arcv-1* codant pour SP-10. Leurs résultats indiquent que TDP-43 lie les motifs GTGTGT du promoteur *arcv-1* et que la partie N-terminale du RRM1 de TDP-43 soit essentielle à la répression de l'expression du gène. Ils ont aussi démontré le rôle de TDP-43 dans la répression de l'expression d'un gène pour deux types de promoteurs (*arcv-1* et *c-fos*) ainsi que deux types cellulaires (GC-2 de souris et HeLa

d'humains). Ceci suggère l'implication de TDP-43 dans la régulation de la transcription d'autres gènes cibles.

Le rôle de TDP-43 dans l'épissage alternatif a également été démontré. Brièvement, l'épissage alternatif est le procédé par lequel les exons sont inclus ou exclus de l'ARN mature. Par exemple, TDP-43 promeut l'exclusion de l'exon 9 du CFTR, un gène impliqué dans la fibrose kystique, via sa liaison à des répétitions UG au site d'épissage en 3', fonction d'ailleurs reliée à la pénétrance de la maladie (Buratti et al. 2001; Buratti et al. 2004). Cette capacité de liaison aux séquences introniques riches en UG près d'un exon impliqué dans l'épissage alternatif afin d'en promouvoir son exclusion a également été démontré pour l'exon 3 de l'apolipoprotéine A-II (Mercado et al. 2005). TDP-43 peut donc favoriser l'exclusion d'un exon, mais peut aussi favoriser son inclusion comme il l'a été démontré avec SMN2. Plus précisément, les deux RRM de TDP-43 sont essentiels afin d'inclure l'exon 7 d'SMN2 (Bose et al. 2008).

TDP-43 est aussi connue pour réguler la stabilité de certains transcrits via leur 3'UTR. La dégradation du transcrit se fait majoritairement par la voie des exosomes qui sont des complexes d'exonucléases pour au moins une certaine partie des ARNm de mammifères (Chen et al. 2001; Mukherjee et al. 2002). Jusqu'à présent, TDP-43 est connue pour être une protéine déstabilisatrice en se liant à la 3'UTR du NFL et de lui-même. L'interaction de TDP-43 avec la 3'UTR du NFL implique les RRM 1 et 2 de TDP-43 ainsi que des motifs UG présents dans la boucle de la 3'UTR (Volkening et al. 2009). Quant à l'interaction de TDP-43 avec sa propre 3'UTR, il s'agit d'un mécanisme d'autorégulation visant à contrôler le niveau de ses transcrits. Dans ce cas, TDP-43 lie des régions spécifiques dans sa 3'UTR qui ne sont pas des motifs répétés en UG continus. La région C-terminale de TDP-43 assure également le bon fonctionnement de cette boucle de rétroaction négative (Ayala et al. 2011).

Une autre façon de réguler la durée de vie d'un transcrit est l'action des micros ARNs. Ce sont de petits ARN régulateurs post-transcriptionnels qui peuvent s'apparenter à un autre ARNm et le conduire ainsi à la dégradation via le complexe RISC. TDP-43 a également été

identifié comme faisant partie des complexes Drosha et Dicer, lesquels contribuent à la formation des micros ARN (Gregory et al. 2004; Fukuda et al. 2007).

Bien que principalement nucléaire, la protéine TDP-43 est également capable de se déplacer du noyau au cytoplasme et *vice versa* afin d'assurer ses fonctions multiples (Ayala et al. 2004; Zinszner et al. 1997). De plus, elle est une composante importante des granules de stress où elle forme des complexes avec des ARNm et autres hnRNPs (Freidman et al. 2010; Colombrita et al. 2009). Enfin, TDP-43 est impliquée dans le transport des ARNs vers la terminaison axonale ou les épines dendritiques afin de permettre une traduction protéique locale comme avec le neurofilament humain à faible poids moléculaire NF-L (Strong et al. 2007; Moisse et al. 2009).

2.3 Implication dans la SLA

2.3.1 Inclusions cytoplasmiques

TDP-43 est le constituant majeur des inclusions cytoplasmiques observées dans les tissus post-mortem de patients atteints de la SLA et de la FTLD (Figure 5, Zhou et al. 2010) au niveau des neurones moteurs et des cellules gliales (Arai et al. 2006; Neumann et al. 2006). Cette protéine se retrouve sous la forme fragmentée, ubiquitinée et phosphorylée. Par contre, ces inclusions sont également retrouvées dans d'autres maladies neurodégénératives tels que la maladie d'Huntington, d'Alzheimer et de Parkinson, plaçant TDP-43 comme étant un joueur clé au sein de ces maladies (Lagier-Tourenne et al. 2010). Ces dernières font ainsi partie des protéinopathies de TDP-43.

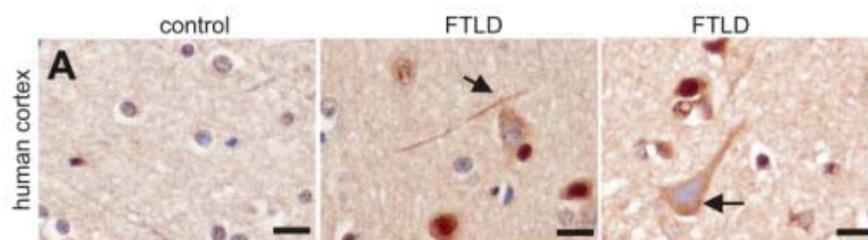


Figure 5 | Phosphorylation et localisation cytoplasmique de TDP-43 chez les patients FTLD.

(A) L'immunohistochimie démontre la phosphorylation et la localisation cytoplasmique de TDP-43 (flèches) dans le cerveau des patients FTLD, mais pas chez les sujets témoins. Les sections préparées à la paraffine ont été colorées avec un anticorps polyclonal contre TDP-43 phosphorylée en aa409/410 (Zhou et al. 2010).

2.3.2. Mutations

La découverte de mutations dans *TARDBP* fût le premier lien potentiel entre les inclusions cytoplasmiques et les protéinopathies de TDP-43 (Sreedharan et al. 2008; Kabashi et al. 2008). La majorité des mutations se retrouvent dans la partie C-terminale de TDP-43, soit la région riche en glycine (Figure 6, adaptée de Janssens et Broeckhoven, 2013). Ce sont tous des mutations faux-sens, sauf Tyr374X (Daoud et al. 2009). Elles ont été rapportées dans 4-5% des cas de SLA familiale sans mutation dans *SOD1* ainsi que dans 0-2% des cas de la SLA sporadique (Daoud et al. 2009; Hühlein, et al. 2008; Kirby et al. 2010; Tsai, et al. 2011).

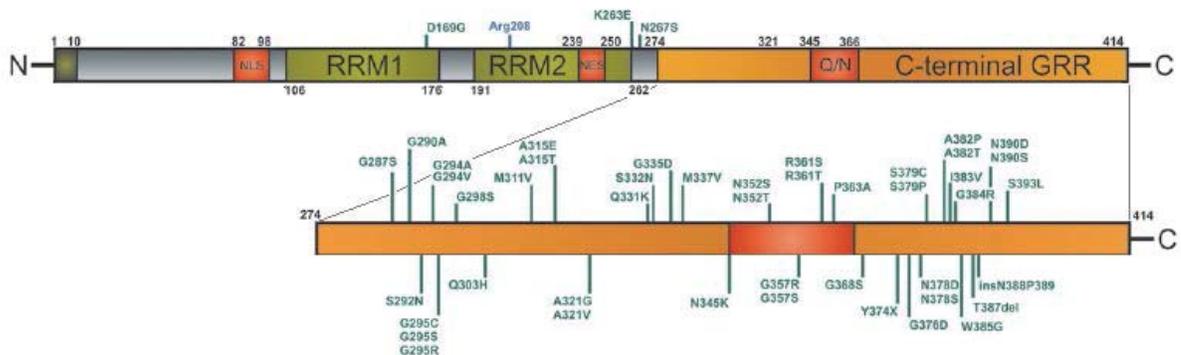


Figure 6 | Mutations de TDP-43

Représentation schématique de la structure de TDP-43 avec la localisation des mutations associées aux maladies. De nombreuses mutations dans *TARDBP* ont été identifiées chez les patients ayant la SLA sporadique ou familiale, mais rarement chez les patients avec la FTLD (Adaptée de Janssens et Broeckhoven, 2013).

2.3.3 Dérégulation de la transcription et du métabolisme de l'ARN

TDP-43 est le constituant principal des inclusions cytoplasmiques observées dans les tissus post-mortem de patients atteints de la SLA (Arai et al. 2006; Neumann et al. 2006). L'accumulation de TDP-43 dans le cytoplasme est concomitante avec la diminution de TDP-43 dans le noyau. Ceci pourrait engendrer un gain (acquisition de nouvelles cibles cytoplasmiques) ou une perte de fonction (perte des cibles nucléaires habituelles), ou les deux, (Lagier-Tourenne et Cleveland, 2009; Lee et al. 2012; Baloh, 2011). L'impact d'un tel dysfonctionnement de TDP-43 doit être majeur en raison de ses cibles nombreuses : TDP-43 lie un peu plus que le tiers des ARNs dans le cerveau humain (Tollervey et al. 2011), pas moins de 4 000 ARNs dans les cellules corticales du rat (Sephton et al. 2010) et sa sous-expression induit un changement dans l'abondance de plus de 600 ARNs et le motif d'épissage de 965 ARNs au niveau du cerveau de souris adulte (Polymenidou et al. 2011). De plus, TDP-43 lie les séquences riches en UG, préférentiellement celles qui sont longues et introniques et, considérant que les introns particulièrement longs sont une des caractéristiques principales des neurones, ceci pourrait expliquer en partie pourquoi ces cellules sont plus vulnérables que d'autres (Polymenidou et al. 2011; Tollervey et al. 2011).

La dérégulation de la transcription et du métabolisme de l'ARN comme étant un des mécanismes de SLA est un concept émergeant depuis la découverte des agrégats de protéines contenant majoritairement TDP-43 (voir section 2.3.1) et des mutations dans les gènes qui codent pour d'autres protéines liant l'ARN tel que FUS, TAF15, EWSR1, ANG et SETX (voir tableau 1).

3. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1

3.1 Structure

Les familles classiques des hnRNPs comprennent les hnRNPs A aux hnRNPs U qui sont classées selon leurs similarités structurelles (Michelle et al. 2012). Ainsi, la plupart possèdent un domaine de reconnaissance à l'ARN avec ou sans région riche en glycine ainsi qu'avec ou

sans *leucine zipper motif*. Les hnRNPs, avec les histones, font partie des protéines les plus abondantes dans le noyau et hnRNP A1, qui fait partie de la sous-famille des hnRNP A/B, constitue avec hnRNP A2 60% des protéines hnRNPs (Beyer et al. 1977).

Le transcrit primaire de hnRNP A1, représenté à la figure 7 (Bekenstein et Soreq, 2013), peut donner lieu à deux protéines : l'une avec l'exon 7B, soit hnRNP A1^B ayant 372 acides aminés, l'autre sans l'exon 7B, hnRNP A1 ayant 320 acides aminés (Buvoli et al. 1990). Les lignes qui joignent l'exon 7 à l'exon 7B, l'exon 7B à l'exon 8 et l'exon 7 à l'exon 8 représentent les différentes possibilités d'épissage alternatif que peut subir le transcrit hnRNP A1. Structuellement, hnRNP A1^B diffère de hnRNP A1 de par une extension de son domaine riche en glycine.

Les différentes parties de la structure de hnRNP A1 et A1^B (Figure 7) comportent deux régions de reconnaissance à l'ARN (UP1), une région riche en glycine (RGG domain) et une région M9. Brièvement, RRM1 et RRM2 possèdent des séquences similaires, mais des fonctions bien distinctes (Mayeda et al. 1998). Ces derniers lient les ARNs de manière indépendante (Casas-Finet et al. 1993). Sa région riche en glycine, quant à elle, présente des séquences arginine-glycine-glycine riches entrecoupées d'autres résidus, principalement aromatiques, lui permettant de lier des ARNs (Nadler et al. 1991) avec une affinité (Kiledjian et Dreyfuss, 1992; Mears et Rice, 1996) et une force différentes (Damgaard et al. 2002; Kumar et Wilson 1990; Nadler et al. 1991). Ce domaine riche en glycine a également la capacité de lier des protéines (Fisette et al. 2010). Enfin, M9 est à la fois une séquence de localisation (Siomi et Dreyfuss, 1995) et d'exportation nucléaire (Michael et al. 1995), étant ainsi responsable du transport de hnRNP A1 du noyau au cytoplasme via le pore du complexe nucléaire et *vice versa*.

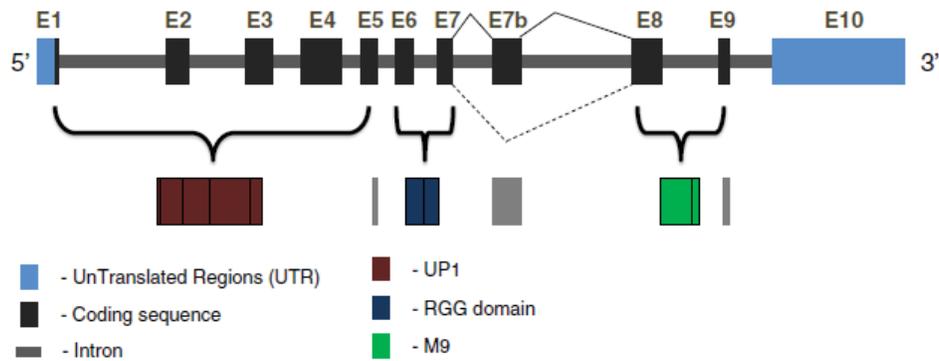


Figure 7 | Schéma du transcrit primaire de hnRNP A1

Les exons sont marqués par des boîtes avec une couleur bleu pâle pour l'UTR et noir pour la séquence codante. Les exons liés à la protéine UP1, la RRG et le domaine M9 sont illustrés en marron, bleu et vert respectivement. Les lignes pointillées montrent l'épissage responsable du variant de 320 acides aminés qui manque l'exon 7B et 52 acides aminés du domaine riche en glycine. Les lignes pleines montrent l'épissage du variant de 372 acides aminés contenant l'exon 7B (adapté de Bekenstein et Soreq, 2013).

3.2 Épissage alternatif de hnRNP A1

L'inclusion d'un exon dans l'ARN mature dépend de la fréquence et de la force des éléments *cis* qui recrutent les facteurs *trans* (Hertel et al. 2008; Wang et Burge, 2008). Dans le cas de l'épissage du transcrit primaire de hnRNP A1, les éléments *cis* se retrouvent dans les introns 7 et 7B (soit entre les exons 7 et 7B ou entre les exons 7B et 8 respectivement) et les facteurs *trans* sont des molécules de hnRNP A1 elles-mêmes. D'autres facteurs pourraient se lier aux éléments *cis*, mais sont inconnus jusqu'à présent. hnRNP A1 est donc capable de jouer un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif et d'en être aussi la cible.

D'abord, la région riche en glycine permet à hnRNP A1 d'interagir avec elle-même et a une activité de recrutement à un brin d'ARN (Kumar et Wilson, 1990; Pontius et Berg, 1990; Munroe et Dong, 1992, Casas-Finet et al. 1993; Portman et Dreyfuss, 1994; Cartegni et al. 1996). Ainsi, les éléments *cis* dans les introns 7 et 7B, soit CE1a (Chabot et al. 1997) et CE4 respectivement, lient des molécules de hnRNP A1 en raison de leurs sites de liaison de haute affinité pour ces dernières (Blanchette et Chabot, 1999). Ensuite, le domaine riche en glycine

de ces molécules de hnRNP A1 interagissent et provoquent ainsi un changement de conformation en forme de boucle permettant le rapprochement du site d'épissage en 5' de l'exon 7 avec celui du site d'épissage en 3' de l'exon 8 (Figure 8, Blanchette et Chabot, 1999). Toutefois, la distribution des sites de liaison à hnRNP A1 près des jonctions d'épissage en 5' et 3' d'introns contenus dans certains gènes de mammifères (*BRCA2*, *RB1*, *NF1*, *c-myb*, troponine T et *abl*) est très élevée. De cette façon, le processus décrit précédemment doit avoir lieu avant qu'une molécule de hnRNP A1 n'interagisse avec une autre molécule de hnRNP A1 dans le même intron afin d'exclure certains segments, du moment que les autres facteurs impliqués soient près (Blanchette et Chabot, 1999).

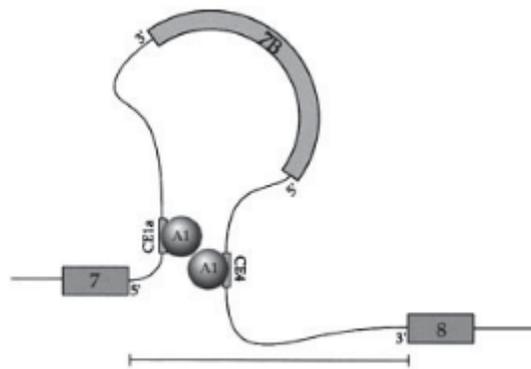


Figure 8 | Rôle de hnRNP A1 dans son propre épissage alternatif

Dans l'ARN pré-messager de hnRNP A1, une interaction entre les molécules de hnRNP A1 liées à CE1a et CE4 amènerait le site d'épissage de l'exon 7 plus près du site d'épissage de l'exon 8, augmentant la fréquence de l'exclusion de l'exon 7B. La barre indique la distance séparant la paire distale des sites d'épissage (adapté de Blanchette et Chabot, 1999).

Puisque l'évolution favorise la forme hnRNP A1 plutôt que hnRNP A1^B (Han et al. 2010), des mécanismes semblent avoir été mis en place afin de prévenir la formation de paires entre les exons 7 et 7B ainsi que 7B et 8 tels que décrits précédemment. En ce qui concerne l'évitement de paires entre les exons 7 et 7B, un élément jusqu'à présent inconnu lie le CE4 afin de réprimer le site d'épissage en 3' de l'exon 7B (Blanchette et Chabot, 1999). Quant à la prévention de paires entre les exons 7B et 8, un mécanisme différent est emprunté. En effet,

un élément dans l'intron 7B, soit CE6IO, est complémentaire à la région d'épissage en 5' de l'exon 7B et forme du même coup un duplex très stable. La reconnaissance du site d'épissage en 5' de l'exon 7B par les U1 snRNPs est par conséquent moins efficace (Blanchette et Chabot, 1997).

Un résumé de tous les mécanismes décrits précédemment est présenté à la figure 9 (Blanchette et Chabot, 1999).

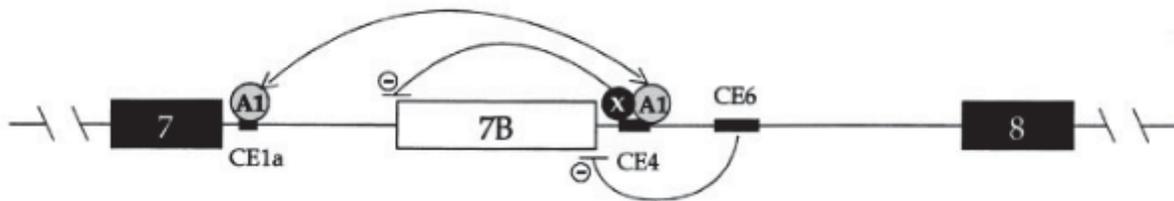


Figure 9 | L'exclusion de l'exon 7B requiert plusieurs facteurs et éléments

Les boîtes et les lignes fines représentent les exons et les introns, respectivement. Une interaction entre les molécules de hnRNP A1 liées à CE1a et CE4 amènerait le site d'épissage de l'exon 7 plus près du site d'épissage de l'exon 8, augmentant la fréquence de l'exclusion de l'exon 7B. La reconnaissance du site d'épissage de l'exon 7B est compromise par une structure secondaire avec l'élément CE6 (Blanchette et Chabot, 1997), tandis que le site d'épissage de l'exon 7B est réprimé par un facteur lié à CE4m (Blanchette et Chabot, 1999).

3.3 Fonctions générales

hnRNP A1 détient de multiples fonctions dans le métabolisme de l'ADN et de l'ARN tels que la maintenance de la longueur et de l'activité des télomères, la régulation transcriptionnelle et de l'épissage alternatif, ainsi que la biogénèse des micro-ARNs. Ces fonctions sont brièvement expliquées ci-dessous (révisées dans Bekenstein et Soreq, 2013; Jean-Philippe et al. 2013).

D'abord, hnRNP A1 joue un rôle majeur dans le contrôle de la longueur et la maintenance des télomères (LaBranche et al. 1998). Par conséquent, elle protège les

chromosomes de la dégradation et de la fusion dans le cas où ils seraient reconnus comme étant de l'ADN endommagé lors de la division cellulaire (Blackburn, 2001).

hnRNP A1 participe aussi à la régulation transcriptionnelle en se liant à des structures quadruplex d'ADN, ce qui les déstabilise et facilite la transcription (Paramasivam et al. 2009). Elle peut aussi activer ou réprimer un gène en se liant à leur promoteur comme dans le cas de l'apolipoprotéine E (Campillos et al. 2003) et de la thymidine kinase (Lau et al. 2000), respectivement.

De plus, hnRNP A1 contribue à la régulation de l'épissage selon différents mécanismes (Jean-Philippe et al. 2013). Elle possède aussi un effet antagoniste aux protéines de la famille SR en activant l'épissage distal en 5' (Caceres et Krainer, 1993; Okunola et Krainer, 2009). Elle interagit également avec hnRNP H via la RRG pour faciliter l'épissage (Fisette et al. 2010). Certaines activités spécifiques telles que l'hybridation ARN-ARN ou encore la liaison protéine-ARN peuvent influencer la sélection des sites d'épissage (Mayeda et al. 1994). Effectivement, l'activité d'hybridation ARN-ARN peut faciliter l'épissage soit en augmentant les interactions entre les snARNs et l'ARN pré-messager, soit en changeant la conformation de ce dernier (Krainer et al. 1990; Monroe et Dong, 1992; Lee et al. 1993; Portman et Dreyfuss, 1994). Quant à l'activité de liaison protéine-ARN, elle peut influencer le mécanisme par lequel l'épissage alternatif est régulé. hnRNP A1^B, par rapport à hnRNP A1, possède la même activité d'hybridation ARN-ARN, mais a une activité de liaison à l'ARN plus élevée (Mayeda et al. 1994). Dans ce cas, il est possible que hnRNP A1^B, liant plus fortement l'ARN pré-messager, empêche la reconnaissance de d'autres facteurs d'épissage avec ce dernier. Par conséquent, hnRNP A1^B a une activité d'épissage alternatif beaucoup plus faible que hnRNP A1 (Mayeda et al. 1994).

En plus, bien que principalement nucléaire, hnRNP A1 a la possibilité de se déplacer entre le noyau et le cytoplasme où elle a été retrouvée liée à des ARNs pré-messager (Pinol-Roma et Dreyfuss, 1992). Elle assure donc leur transport du noyau au cytoplasme dans le but que ces derniers soient traduits en protéines (Reed and Hurt, 2002).

Enfin, hnRNP A1 est impliquée dans la biogénèse des micro-ARNs. Ces derniers sont des régulateurs post-transcriptionnels capables de cesser l'expression d'un gène, soit en diminuant la demi-vie du transcrit, soit en réduisant l'efficacité de sa traduction (Bekenstein et Soreq, 2013). Un seul micro ARN peut avoir un effet sur une centaine de transcrits et ce, de façon très spécifique (révisé dans Kim, 2005).

3.4 Implication dans la SLA

Les granules de stress se forment très rapidement lorsque survient un stress afin de minimiser les dommages cellulaires (Buchan et al. 2011). Ce sont les domaines similaires à celui des prions qui permettent aux interactions protéine-protéine de se faire rapidement (Gilks et al. 2004). Par contre, bien que ce processus soit normalement réversible, certains facteurs, comme les mutations, peuvent influencer la probabilité que ces protéines puissent passer à un stade où ils pourraient former des agrégats irréversibles et pathogéniques (Li et al. 2013).

hnRNP A1 s'assemble normalement dans les granules de stress à la suite d'un stimulus (Guil et al. 2006). Aussi, elle possède un domaine similaire à celui des prions dans sa région riche en glycine, d'après l'algorithme d'Alberti et al. (2009). Toutefois, cette région n'est pas repliée selon FoldIndex et n'est pas prédisposée non plus à former des prions selon l'algorithme de Toombs et al. (2010). Par contre, des mutations, retrouvées dans le cœur du domaine similaire à celui des prions, augmentent la probabilité de former des fibrilles amyloïdes d'après le ZipperDB, générant un excès d'incorporation de hnRNP A1 au sein des granules de stress pouvant conduire à la formation d'inclusions cytoplasmiques (Kim et al. 2013).

4. Les liens entre TDP-43 et hnRNP A1

4.1 Similarités structurelles

En comparant la structure de TDP-43 (section 2.1) avec celle de hnRNP A1 (section 3.1), il est possible de remarquer qu'elles se ressemblent beaucoup. En effet, ces deux protéines

possèdent deux motifs de reconnaissance à l'ARN ainsi qu'un domaine riche en glycine en C-terminal. C'est d'ailleurs ce qui leur confère des fonctions similaires dans le métabolisme de l'ADN et de l'ARN.

4.2 Similarités fonctionnelles

Les fonctions de TDP-43 et hnRNP A1, décrites à la section 2.2 et 3.3 respectivement, sont chacune connues dans le métabolisme de l'ARN et de l'ADN. Effectivement, ces deux protéines sont impliquées dans la régulation de la transcription. Elles sont aussi reconnues principalement comme des inhibiteurs de l'épissage alternatif. Elles sont également engagées dans la biogénèse des micros ARN. TDP-43 et hnRNP A1 sont des protéines essentiellement nucléaires, mais qui peuvent aussi faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. D'ailleurs, les deux sont retrouvées dans les granules de stress à la suite d'un stimulus. Toutefois, peu est connu de leur interaction. Huelga et al. (2012) définissent une coopération nécessaire à la régulation de l'épissage alternatif par les hnRNPs d'après une analyse intégrative de tout le génome. En outre, cette coopérativité a été démontrée précisément avec l'épissage du gène de la *CFTR* par Buratti et al. (2005). En effet, leurs résultats démontrent que l'interaction de la région C-terminale de TDP-43 avec hnRNP A1 soit essentielle afin d'assurer l'exclusion de l'exon 9 de la *CFTR*.

4.3 Implications dans la SLA

Des mutations causant la SLA ont été retrouvées dans les gènes *TARDBP* et *hnRNP A1* (voir sections 2.3.2 et 3.4 respectivement). Ces dernières peuvent donc avoir un impact considérable sur la transcription et le métabolisme de l'ARN. Étant donné que les sites de liaison pour TDP-43 et hnRNP A1 dans les introns se retrouvent principalement dans les introns longs, soit une des caractéristiques principales des neurones, ceci pourrait expliquer en partie pourquoi ces cellules seraient davantage vulnérables que les autres (Polymenidou et al. 2011; Tollervey et al. 2011; Martinez-Contreras et al. 2006). Les mécanismes reliant les mutations de TDP-43 et de hnRNP A1 à la SLA restent encore à définir. La présente étude s'intéresse à l'association des rôles de TDP-43 avec ceux de hnRNP A1 dans un mécanisme pouvant mener à la pathologie.

Hypothèse et objectifs de l'étude

TDP-43 et hnRNP A1 sont des protéines jouant un rôle crucial dans le bon fonctionnement du métabolisme de l'ADN et de l'ARN. Jusqu'à présent, le seul lien fonctionnel à avoir déjà été établi est la liaison essentielle de la région C-terminale riche en glycine de TDP-43 avec hnRNP A1 afin d'assurer l'exclusion de l'exon 9 de la CFTR impliquée dans la fibrose kystique (Buratti et al. 2005).

Ainsi, *notre hypothèse est que TDP-43 régule hnRNP A1 et que les mutations causant la SLA dérèglent ce mécanisme aboutissant à la vulnérabilité des neurones moteurs.*

Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences en culture vont d'abord être effectuées afin d'évaluer, d'une part, le mécanisme par lequel TDP-43 régulerait hnRNP A1 et, d'autre part, l'impact que la mutation TDP-43^{A315T} pourrait avoir sur cette dernière. Cet effet va également être vérifié *in vivo* à l'aide de souris non-transgéniques et transgéniques TDP-43^{A315T}. Les conséquences possibles que l'impact pourrait avoir sur la cellule vont aussi être analysées dans un contexte de la SLA.

Matériel et méthodes

1. Cultures cellulaires et transfections

Les cellules HeLa ont été cultivées dans du milieu *Dulbecco's modified Eagle* (Invitrogen) supplémenté avec 10 % de sérum fœtal de bovin et 1 % de glutamine. Les cellules ont été incubées à 37 °C, 5 % CO₂.

Pour les transfections avec ARN interférent, une quantité de 125 pmol de siARN a été transfectée à l'aide de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Le contrôle utilisé possède une séquence faible en GC (# 12935-200, Invitrogen) et la séquence du siTDP-43 humain utilisée est 5'- AAGAUGAGAACGAUGAGCCCAUUGA-3'; du siG3BP est 5'-GCGCAUUAACAGUGGGGAAUUA-3' et du siFUS est 5'-CGGGACAGCCCAUGAUUAAUUUGUA-3'. Les cellules ont été collectées 72 heures post-transfection.

En ce qui concerne les transfections avec les plasmides, une quantité de 150 ng pour les plasmides pEGFP-N1, pEGFP-N1 TDP-43^{WT} ou de pEGFP-N1 TDP-43^{A315T} et de 300 ng pour les plasmides Myc ou hnRNP A1-Myc (générosité de Benoit Chabot, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, CA) a été transfectée à l'aide de la lipofectamine LTX (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Les cellules ont été collectées 24 heures post-transfection.

2. Co-immunoprécipitation protéine-ARN

Les cellules ont été récoltées dans du PBS et lysées dans du tampon de lyse (50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 0.5 % Triton X-100, 1 :1000 d'inhibiteurs de protéases (10 mg/mL Leupeptin, 10 mg/mL Pepstatin A, 10 mg/mL Chymostatin) et préparé dans de l'eau DEPC) en les passant 10 fois dans une seringue 25 G puis 5 fois dans une seringue 18 G. Les cellules ont ensuite été incubées (5 min, TP) et centrifugées à la vitesse maximale. Les surnageants ont été mis ensemble et la concentration en protéines a été déterminée par *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific). Les lysats pré-clarifiés (3-7 mg de protéines au total) ont été immunoprécipités toute la nuit avec l'anticorps monoclonal de souris TDP-43 (Abnova) ou

avec l'anticorps monoclonal de souris FLAG (Sigma) comme contrôle. Les immunoprécipités liés à des billes magnétiques ont été traités avec de la DNase (Qiagen) et l'ARN a alors été récupéré par Trizol (Invitrogen). Des quantités égales d'ARN ont été rétro-transcrits via le *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen). L'ADNc résultant a été amplifié par PCR standard utilisant les amorces suivantes: TDP-43 exon 2 F: 5'-ACCGAAGACCTGAAAGAG-3'; TDP-43 exon 3 R: 5'-GGAAGTTTGCAGTCACACCAT-3'; hnRNP A1 exon 4 F: 5'-GGGCTTTGCCTTTGTAACCT-3'; hnRNP A1 exon 6 R: 5'-ACGACCGAAGTTGTCATTCC-3'; CaMKII R: 5'-CCACAGGGGCTTTAGGAGA-3' F: 5'-GCTGCTGCCGCTTTTGTGA-3'; HSPA10 R: 5' TGAAGGAGACAGCCGAAAGT-3'; F: 5'-TGCATCAGTATAGAAACAAGGAA-3' (l'expérience au complet a été réalisée par Anaïs Aulas).

3. Lyses cellulaires et analyse des immunoblots

Pour les lyses cellulaires totales, les cellules ont été récoltées dans du PBS froid, lysées avec le tampon de lyse RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 1 % déoxycholate de sodium, 1 :1000 d'inhibiteurs de protéases (10 mg/mL Leupeptin, 10 mg/mL Pepstatin A, 10 mg/mL Chymostatin)), incubées (10 min sur glace, puis 10 min RT) et centrifugées (16 000 g, 5 min, 4 °C). Le surnageant a été conservé.

Quant aux extractions nucléocytoplasmiques, les cellules ont été récoltées dans du PBS froid et lysées de façon à obtenir deux fractions, une nucléaire et une cytoplasmique, en utilisant le *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit* (Thermo Scientific) selon les directives du fabricant.

En ce qui a trait aux lyses à partir de tissus, ces derniers ont été homogénéisés dans 5 volumes de tampon de lyse (50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 :1000 d'inhibiteur de protéases (10 mg/mL Leupeptin, 10 mg/mL Pepstatin A, 10 mg/mL Chymostatin)), puis les détergents (1 % NP40, 1 % SDS) ont été ajoutés. Les homogénats ont été incubés (10 min, TP) et ensuite centrifugés (vitesse maximale, 10 min, 4 °C). Le surnageant a été conservé.

Enfin, pour l'analyse des immunoblots, la concentration en protéines a d'abord été déterminée par le *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific). Une quantité égale de protéines (15 µg pour les expériences avec les cellules, 15 µg pour le noyau et 30 µg pour le cytoplasme pour les expériences avec les fractions noyau/cytoplasme et 50 µg pour les expériences avec les tissus) ont été séparées par western blot. Les anticorps suivants ont été utilisés pour révéler les protéines correspondantes : lapin anti-TDP-43 (1 :40 000; ProteinTech), souris anti-TDP-43 (1 :1000; Abcam), lapin anti-hnRNP A1 et A1^B (1 :1 000 pour les cellules, 1:100 pour les tissus; Cell Signaling Technology), souris anti-Myc (1 :5 000; Sigma), lapin anti-GFP (1 :5 000; Covance), lapin anti-SOD1 Cu/Zn (1 :2 000 pour les cellules, 1 :10 000 pour les tissus; Assay Designs) et souris anti-Actine (1 :1 200 000; MP Biomedicals). Les blots ont été visualisés avec le *Pierce Enhanced Chemiluminescent Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific). La quantification des bandes a été faite par densitométrie à l'aide de Photoshop. Étant donné que le niveau protéique de hnRNP A1^B soit beaucoup plus faible que celui de hnRNP A1, les expositions qui ont servi à quantifier ces deux protéines ne sont pas les mêmes de façon à ce que les signaux évalués ne soient pas saturés. Le ratio protéique hnRNP A1^B/A1 a ensuite été calculé.

4. Essai de la luciférase

Les cellules ont d'abord été transfectées avec les ARNs interférents pendant 48 hrs, puis avec les plasmides GAPDH, hnRNP A1, R01 (Promoteur) et GAPDH, hnRNP A1, R03 (3'UTR) de SwitchGear Genomics à l'aide de FUGene (Promega) selon les directives du fabricant pendant 24 hrs. Les réactifs du LightSwitch Assay (Promega) ont ensuite été ajoutés d'après les instructions du fabricant et l'activité de la luciférase a été lue à l'aide d'un luminomètre (*Synergy H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader* de BioTek).

5. Extraction d'ARN et RT-PCR

Les extractions d'ARN à partir des cellules ou des tissus ont été réalisées avec le *RNeasy mini Kit* ou le *RNeasy Lipid Tissue mini Kit* (Qiagen) respectivement d'après les instructions du fabricant.

Les transcriptions inverses ont été faites à partir d'une quantité égale d'ARN pour tous les échantillons et en utilisant le *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) selon les directives du fabricant.

Pour les PCR non-quantitatives, la *Red Hot Taq* a été employée (Thermo Scientific) selon les directives du fabricant ainsi que les amorces suivantes : hnRNP A1 exon 7 F: 5'-GTGGCTTTGGTGGCAGC-3'; hnRNP A1 exon 8 R: 5'-TCCCTTCATCGGCCCAAATTGG-3'.

Quant aux PCR quantitatives, des amorces TaqMan reconnaissant les deux formes de hnRNP A1 humain (Hs01656228_s1; Life Technologies) ont été utilisées.

6. Hybridation fluorescente *in situ*

Les cellules ayant été cultivées sur des lamelles ont été fixées 72 hrs post-transfection avec du formaldéhyde (4 %, 15 min), puis perméabilisées au méthanol froid (-20°C, 10 min). Les cellules ont ensuite été incubées avec de l'éthanol 70 % (10 min) et du Tris 1 M pH 8 (5 min). Après, elles ont été incubées avec 1,3 ng/ul de l'oligo d(T) – Alexa 488 (Invitrogen) dilué dans le tampon d'hybridation (0,0005 % BSA, 1 mg/ml d'ARN de levure, 10 % dextran sulfate, 25 % formamide dans du 2 X SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M citrate de sodium)) dans une chambre humide (1 h, 37°C). Les cellules ont ensuite été lavées une fois dans du 4 X SSC (0,6 M NaCl, 0,06 M citrate de sodium), une fois dans du 2 X SSC puis une fois dans du 2 X SSC + 0,1 % TritonX-100 pendant 2 min pour chaque lavage. Les cellules ont ensuite été marquées par du TO-PRO-3 (1 :300 dilué dans du 2 X SSC + 0,1 % TritonX-100) (5 min, TP). Après, les cellules ont été lavées une fois avec du 2 X SSC, puis montées sur des lames avec du *ProLong antifade reagent* (Invitrogen). Les images ont été prises sur le microscope confocal Leica SP5.

Avec le programme de Leica SP5, il est possible de tracer une ligne dans l'image afin d'obtenir en chaque point de cette droite l'intensité de la fluorescence pour chacun des lasers. De cette façon, une droite a été tracée sur un minimum de 25 cellules par condition (siContrôle et siTDP-43) en passant du cytoplasme, au noyau, puis au cytoplasme en évitant les vacuoles. Ainsi, avec le changement drastique dans l'intensité de la fluorescence bleue représentant le noyau, il a été possible de déterminer les intensités de la fluorescence verte

représentant les ARNs polyadénylés nucléaires ou cytoplasmiques. De cette façon, la moyenne des intensités nucléaires ou cytoplasmiques ont été calculées et la somme de ces intensités a été considérée comme étant de 100 %. Ainsi, le pourcentage des ARNs polyadénylés dans le noyau a été calculé comme suit :

$$\frac{\text{Moyenne des intensité dans le noyau}}{\text{Moyenne des intensité dans le noyau} + \text{moyenne des intensité dans le cytoplasme}} \times 100$$
 alors que le pourcentage des ARNs polyadénylés dans le cytoplasme a été calculé avec :
$$\frac{\text{Moyenne des intensité dans le cytoplasme}}{\text{Moyenne des intensité dans le noyau} + \text{moyenne des intensité dans le cytoplasme}} \times 100$$
 pour chaque conditions.

Pour ce qui est de la taille du noyau cellulaire, elle a été calculée en faisant la moyenne de l'aire de chacune des cellules déterminée par Image J.

7. Viabilité cellulaire

La diminution de l'expression de TDP-43, G3BP et FUS a été réalisée sur des cellules HeLa et SK-N-SH. Elles ont été stressées, ou non stressées, 48 hr post-transfection avec de l'arsenite de sodium (0,5 mM, 30 min, 37°C; Sigma). La mort cellulaire a été évaluée par exclusion au trypan bleu 24 ou 48 heures à la suite du stress (ou non).

8. Souris

Des souris non-transgéniques et transgéniques TDP-43^{A315T} âgées de trois et dix mois, indépendamment de leur genre, ont d'abord été anesthésiées à l'isoflurane, puis immédiatement sacrifiées par décapitation selon le protocole approuvé par le Comité Institutionnel de la protection des animaux du CHUM. Les tissus ont rapidement été prélevés et congelés par *snap-freeze* à l'azote liquide avant d'être conservés à -80 °C au minimum une nuit. L'un ou l'autre des hémisphères corticaux a servi pour l'extraction de protéines ou d'ARN. Quant à la moelle épinière, elle a été divisée longitudinalement en deux, dont l'une ou l'autre des parties a servi pour l'extraction de protéines ou d'ARN, puis en trois selon la région cervicale, thoracique et lombaire.

9. Statistiques

Tous les résultats ont été analysés avec le «Student t test». Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM).

Résultats

1. TDP-43 lie l'ARNm de hnRNP A1, mais n'affecte pas sa stabilité.

L'interaction entre TDP-43 et hnRNP A1 a déjà été démontrée au niveau protéique seulement (Buratti et al. 2005). Dans le but de déterminer si TDP-43 lie l'ARNm de hnRNP A1, une co-immunoprécipitation protéine-ARN a été effectuée à partir de cellules HeLa (Figure 10A, produite par Anaïs Aulas et Laurie Destroismaisons). L'immunoblot contre TDP-43 démontre la spécificité et l'efficacité de l'expérimentation. Les transcriptions inverses suggèrent une co-immunoprécipitation de TDP-43 avec l'ARNm de hnRNP A1 en accord avec le contrôle positif et négatif de la réaction, soit TDP-43 et HSPA4 respectivement. Effectivement, TDP-43 est capable d'autoréguler ses propres niveaux d'ARN en liant sa 3'UTR (Ayala et al. 2011). Par conséquent, en accord avec la spécificité, l'efficacité et les contrôles de la réaction, il est possible de suggérer l'interaction entre TDP-43 et l'ARNm de hnRNP A1. Ainsi, comme la liaison de TDP-43 à divers ARNm afin d'influencer leur stabilité a déjà été démontrée, notamment en ce qui concerne son autorégulation (Ayala et al. 2011), mais aussi pour le neurofilament à faible poids moléculaire (Volkening et al. 2009), il est possible que l'interaction suggérée entre TDP-43 et l'ARNm de hnRNP A1 puisse avoir un effet sur la demi-vie de cette dernière. Afin de vérifier l'effet potentiel de TDP-43 sur la stabilité de l'ARNm de hnRNP A1, un traitement à l'actinomycine D (inhibiteur de la polymérase II) a été effectué sur des cellules HeLa. Les cellules ont d'abord subi une forte diminution de l'expression de TDP-43 (Figure 10B) et ensuite un traitement à l'actinomycine D sur des périodes de temps différentes (0, 2, 4 et 8 h). Les ARNm ont ensuite été extraits, rétro-transcrits et amplifiés par PCR quantitative avec des amorces spécifiques pour hnRNP A1. La demi-vie de hnRNP A1, lorsque l'expression de TDP-43 est diminuée, n'est pas significativement différente par rapport au contrôle (Figure 10C). Ainsi, TDP-43 n'a pas d'effet sur la stabilité de l'ARNm de hnRNP A1.

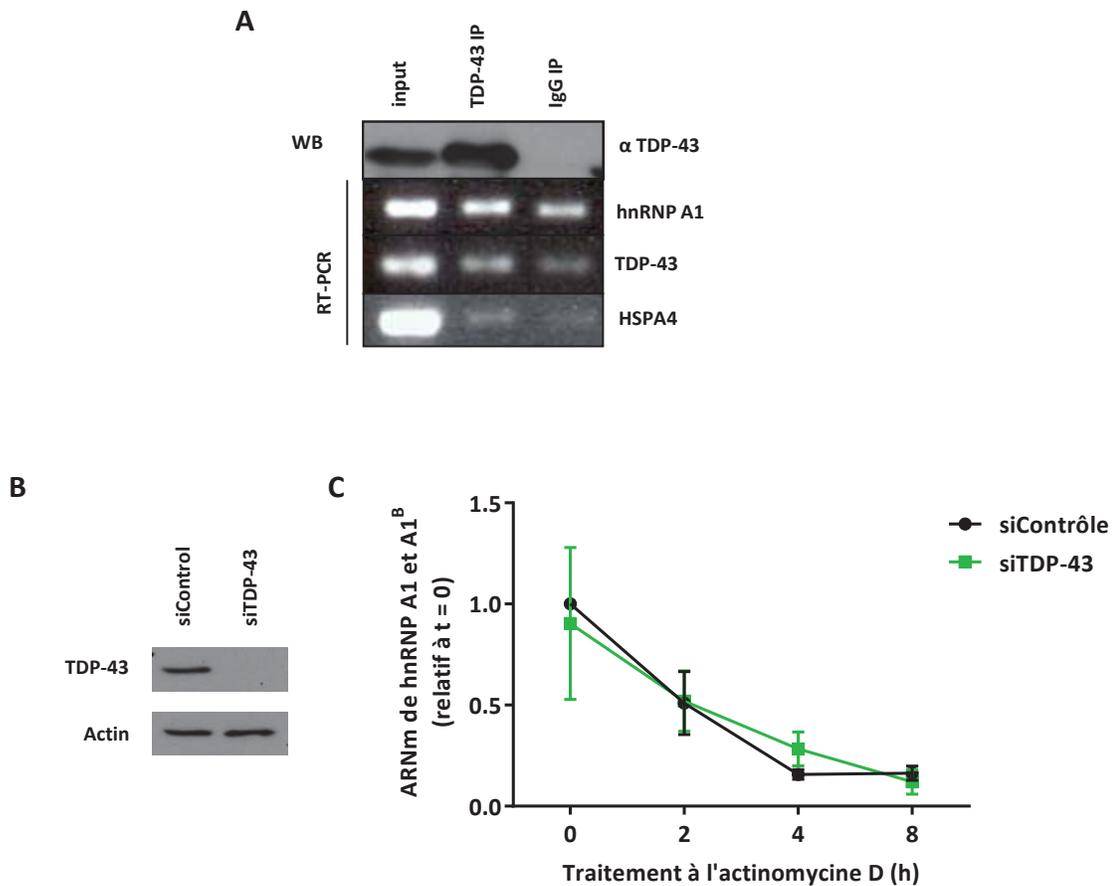


Figure 10 | TDP-43 lie l'ARNm de hnRNP A1, mais n'affecte pas sa stabilité.

A) Co-immunoprécipitation protéine-ARN de TDP-43. L'immunoblot de TDP-43 montre l'efficacité et la spécificité de la réaction. Les transcriptions inverses (RT-PCR) présentent les transcrits associés ou pas à TDP-43 qui ont été immunoprécipités, extraits, rétro-transcrits et amplifiés pour hnRNP A1, TDP-43, et HSPA4. **B)** Immunoblot des lysats cellulaires totaux contre TDP-43 afin de vérifier l'efficacité de la transfection. **C)** Stabilité de l'ARNm de hnRNP A1 mRNA selon un traitement à l'actinomycine D selon les différentes périodes de temps indiquées.

2. TDP-43 influence la transcription de hnRNP A1

TDP-43 peut réprimer l'expression du gène *TAR* du VIH (Ou et al. 1995) ainsi que le gène *arcv1* codant pour SP-10 (Acharya et al. 2006). Dans le but de déterminer si TDP-43 est un

régulateur transcriptionnel de hnRNP A1, un essai luciférase a été réalisé sur des cellules HeLa. Brièvement, une diminution de l'expression de TDP-43 par ARN interférent a été effectuée, suivie de l'expression des plasmides contenant le gène de la luciférase placé en aval du promoteur ou en amont de la 3'UTR de hnRNP A1. L'activité relative de la luciférase fait référence à la normalisation de l'activité du promoteur et de la 3'UTR de hnRNP A1 par rapport aux contrôles positifs (promoteur ou 3'UTR de GAPDH) et négatifs (R01 et R03) ainsi qu'au siContrôle. Avec la diminution de l'expression de TDP-43, l'activité relative de la luciférase du promoteur de hnRNP A1 a été augmentée par rapport au siContrôle. Plus spécifiquement, l'activité relative de la luciférase représentant la région du promoteur de hnRNP A1 a été augmentée de 1,99 (\pm 0,45) fois ($p = 0,03$) (Figure 11A). Aucun changement n'a été observé en ce qui concerne la 3'UTR (Figure 11B). Aussi, les contrôles utilisés pour cette expérience ne sont pas affectés par la diminution de l'expression de TDP-43 tel qu'attendu. Ainsi, ces résultats suggèrent que TDP-43 soit un répresseur de hnRNP A1. Afin de valider ces résultats, l'impact de la diminution de l'expression de TDP-43 sur le niveau des protéines et d'ARNm de hnRNP A1 et A1^B a été évalué à partir de cellules HeLa. Une réduction robuste de l'expression de TDP-43 par ARN interférent a d'abord été accomplie (Figure 11C). Ensuite, la sous-expression de TDP-43 a augmenté le niveau protéique des deux formes de hnRNP A1 par rapport au siContrôle (Figure 11D). Spécifiquement, le niveau de la protéine hnRNP A1 a augmenté de 1,52 (\pm 0,11) fois ($p = 0,005$). De plus, bien que ce ne soit pas significatif ($p = 0,09$), une tendance a aussi été détectée pour hnRNP A1^B (1,39 (\pm 0,23) fois). En utilisant des amorces détectant les deux formes de hnRNP A1, une augmentation de leur niveau d'ARNm a aussi été observée avec la réduction de l'expression de TDP-43 par rapport au siContrôle (Figure 11E). Plus précisément, le niveau d'ARNm de hnRNP A1 et A1^B a augmenté significativement de 4,21 (\pm 1,04) fois ($p = 0,02$). De cette façon, ces résultats appuient l'essai de la luciférase sur le rôle de TDP-43 dans la répression de l'expression de hnRNP A1.

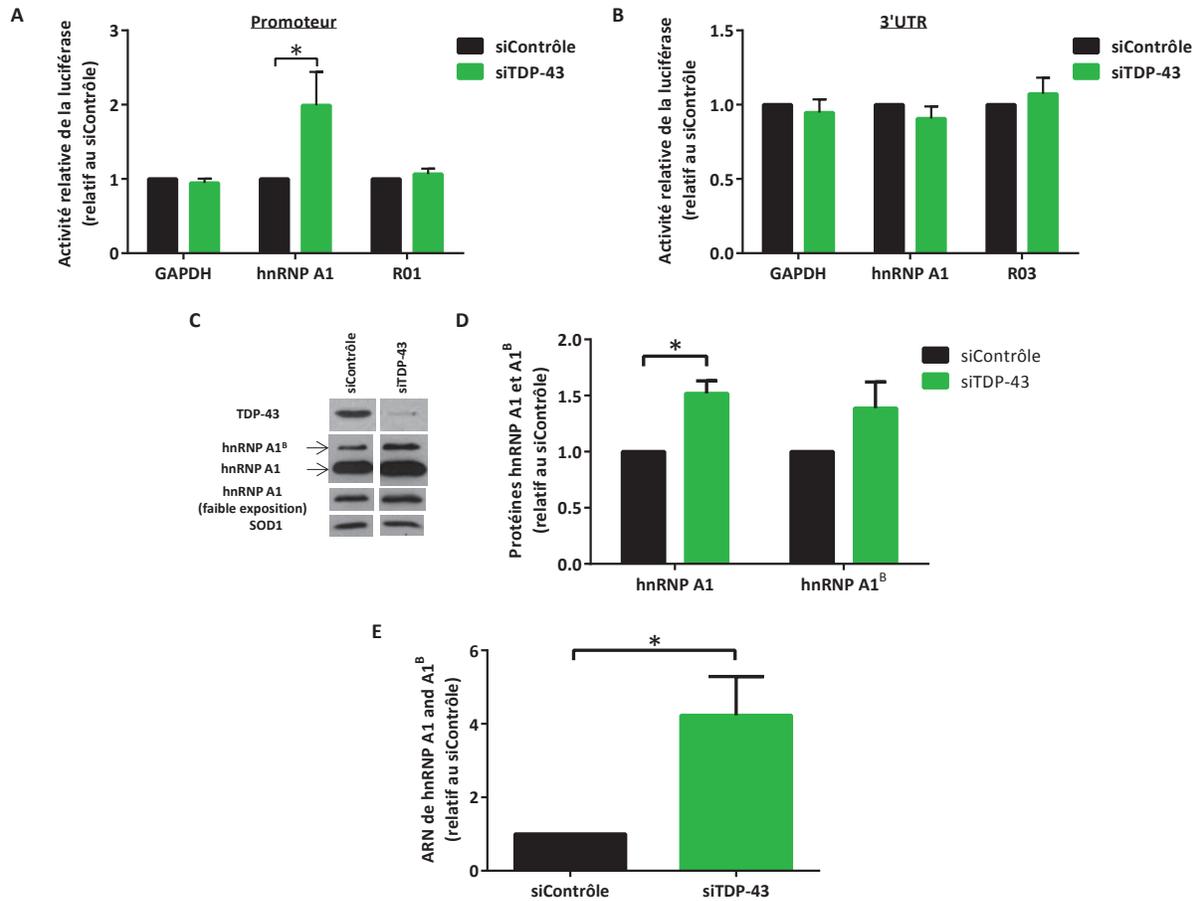


Figure 11 | TDP-43 est un répresseur de hnRNP A1

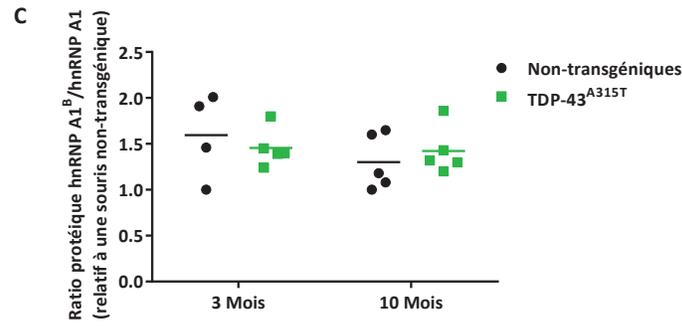
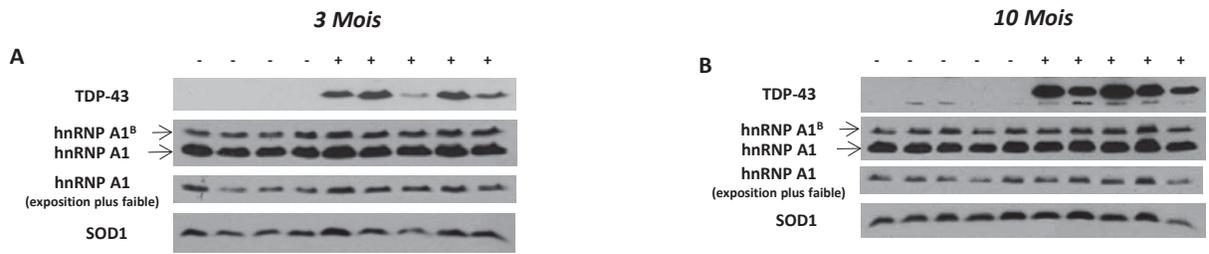
Les cellules ont été traitées avec un ARN interférent pour TDP-43 ou un contrôle brouillé. **A**) Activité relative de la luciférase du promoteur de hnRNP A1, du contrôle positif GAPDH et du contrôle négatif R01. La moyenne de quatre expériences indépendantes est représentée \pm SEM ($p \leq 0,05$). **B**) Activité relative de la luciférase du 3'UTR de hnRNP A1, du contrôle positif GAPDH et du contrôle négatif R03. La moyenne de trois expériences indépendantes est représentée \pm SEM. **C**) Immunoblots des lysats cellulaires totaux pour TDP-43, afin de vérifier l'efficacité de la transfection, et contre hnRNP A1 et A1^B. SOD1 sert de contrôle pour le chargement. **D**) Quantification par densitométrie des immunoblots. La moyenne de trois expériences indépendantes est représentée \pm SEM ($p \leq 0,05$). **E**) PCR quantitative utilisant des amorces TaqMan spécifiques détectant les deux formes de hnRNP A1. La moyenne de trois expériences indépendantes \pm SEM est représentée ($p \leq 0,05$).

3. Chez la souris, la présence de la forme hnRNP A1^B par rapport à hnRNP A1 est dérégulée avec l'âge dans la région cervicale et lombaire de la moelle épinière. Cette perturbation chez les souris âgées est exacerbée par la mutation TDP-43^{A315T}.

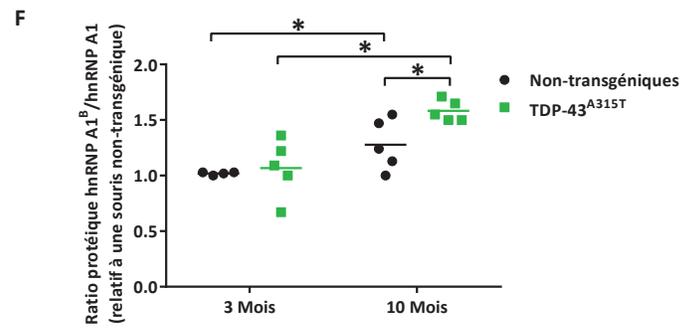
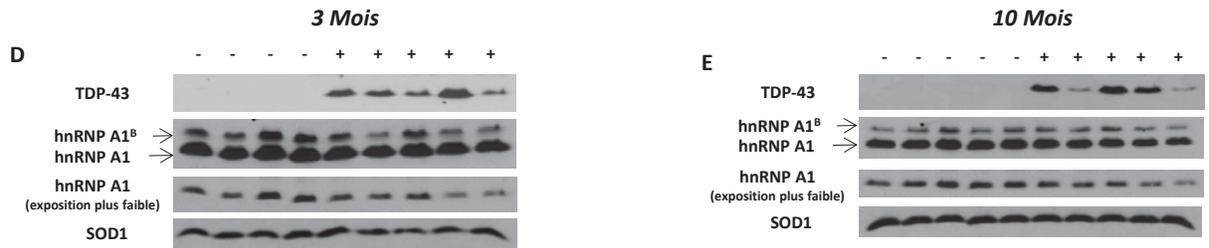
Bien que TDP-43 soit principalement nucléaire, cette protéine peut être retrouvée comme étant la composante majoritaire d'inclusions cytoplasmiques retrouvées dans les tissus post-mortem de patients atteints de la SLA (Arai et al. 2006; Neumann et al. 2006). Ceci pourrait donc entraîner une perte de fonction nucléaire (ou un gain de fonction cytoplasmique). Ainsi, d'après les données précédentes obtenues des expériences sur des cultures cellulaires, lesquelles suggèrent un effet répresseur de TDP-43 sur hnRNP A1, la mauvaise localisation de TDP-43 pourrait provoquer l'augmentation des niveaux de hnRNP A1 et de hnRNP A1^B chez les souris TDP-43^{A315T} âgées de 10 mois, lesquelles possèdent des inclusions cytoplasmiques (Swarup et al. 2011). Étant donné que la vérification d'un tel effet transcriptionnel soit difficile *in vivo*, l'impact de l'âge et de la mutation TDP-43^{A315T} sur la production de la forme hnRNP A1^B et hnRNP A1 ont d'abord été évalués au niveau protéique. Pour ce faire, des extractions de protéines ont été réalisées à partir du cortex et de la région cervicale et lombaire de la moelle épinière (régions enrichies en neurones moteurs). Ces tissus proviennent de souris non-transgéniques et transgéniques TDP-43^{A315T} âgées de trois et dix mois. Le génotype des souris non-transgéniques (-) et transgéniques (+) a été confirmé à l'aide d'un anticorps spécifique à la protéine humaine de TDP-43 (Figure 12A, B, D, E, G et H). Contrairement à ce qui était attendu, aucun changement n'a été observé au niveau protéique des formes hnRNP A1^B et hnRNP A1 ni selon l'âge, ni selon le génotype (données non présentées). Toutefois, TDP-43 est capable de réguler ses propres niveaux d'ARNm et, conséquemment, de ses protéines. Étant donné qu'hnRNP A1 possède une structure et des fonctions très similaires, il est possible qu'elle puisse elle aussi s'autoréguler. Ainsi, comme un effet compensatoire puisse survenir entre les formes hnRNP A1^B et hnRNP A1, la comparaison du niveau protéique de hnRNP A1^B par rapport à celle de hnRNP A1 a alors

semblé plus appropriée. Pour ce faire, le ratio hnRNP A1^B/A1 a été considéré. Dans ce cas, aucun changement significatif n'a été observé au niveau du cortex, que ce soit en comparant les souris de par leur génotype ou leur âge (Figure 12A, B et C). Par contre, dans la région cervicale et lombaire, le ratio protéique hnRNP A1^B/A1 a été augmenté non seulement avec l'âge, mais également avec le génotype des souris. En effet, dans la partie cervicale de la moelle épinière et selon l'âge d'une part, le ratio hnRNP A1^B/A1 a été augmenté de 26% ($p = 0,03$) chez les souris non-transgéniques et de 51% ($p = 0,002$) chez les souris TDP-43^{A315T} (Figure 12F). Cet effet est encore plus robuste au niveau de la région lombaire, c'est-à-dire que le ratio protéique hnRNP A1^B/A1 a été augmenté de 48% ($p = 0,02$) chez les souris non-transgéniques et de 84% ($p = 0,0002$) chez les souris TDP-43^{A315T} (Figure 12I). D'une autre part, dans la partie cervicale et selon le génotype, aucun changement n'a été observé chez les souris âgées de trois mois entre les non-transgéniques et transgéniques TDP-43^{A315T} alors qu'une augmentation de 30% ($p = 0,01$) a été observée chez les souris âgées de dix mois entre les non-transgéniques et TDP-43^{A315T} (Figure 12F). Cet effet est encore plus grand au niveau de la partie lombaire, soit de 40% ($p = 0,03$) et aucun changement n'a été observé chez les souris âgées de trois mois selon le génotype (Figure 12I). Ainsi, chez la souris, le niveau protéique de la forme hnRNP A1^B est augmenté par rapport à celui de hnRNP A1 avec l'âge dans la région cervicale et lombaire de la moelle épinière. Cette perturbation chez les souris âgées est exacerbée chez les souris TDP-43^{A315T}.

Cortex



Région cervicale de la
moelle épinière



**Région lombaire de la
moelle épinière**

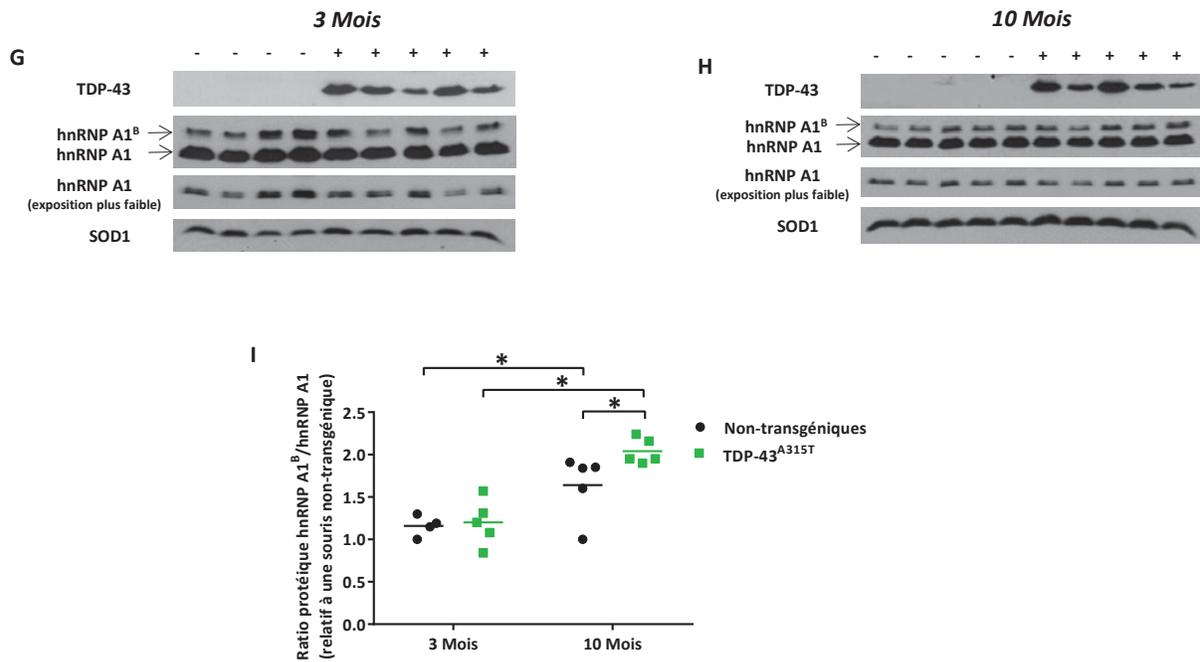


Figure 12| Le ratio protéique hnRNP A1^B/hnRNP A1 est augmenté dans la région cervicale et lombaire de la moelle épinière chez les souris âgées de 10 mois. Cette augmentation est encore plus importante avec les souris transgéniques TDP-43^{A315T}.

(A, B, D, E, G, H) Immunoblots des homogénats totaux pour hnRNP A1 et A1^B, TDP-43 spécifique pour l'humain afin de confirmer les souris non-transgéniques (-) et transgéniques (+), et SOD1 comme contrôle de chargement. (C, F, I) Quantification du ratio protéique hnRNP A1^B/A1 par densitométrie (p ≤ 0,05). (A, D, G) Souris âgées de 3 mois. (B, E, H) Souris âgées de 10 mois.

4. La perturbation au niveau du ratio protéique de hnRNP A1^B/A1 avec l'âge et la mutation TDP-43^{A315T} dans la région cervicale et lombaire de la moelle épinière de souris n'est pas due à l'épissage alternatif.

La production de la forme hnRNP A1 se fait à partir de l'exclusion de l'exon 7B de la forme hnRNP A1^B au niveau de l'ARN pré-messager. Le mécanisme permettant l'obtention de ces deux formes est l'épissage alternatif. Afin de déterminer si le changement dans le ratio protéique de hnRNP A1^B/A1 observé chez les souris est dû à un épissage alternatif incorrect, le ratio de hnRNP A1^B/A1 au niveau de l'ARNm a été évalué. Pour ce faire, une RT-PCR a été réalisée. Brièvement, les ARNm ont été extraits à partir de la région lombaire de la moelle seulement (puisque c'est dans cette région que l'effet est le plus robuste) des souris de trois et dix mois, puis rétro-transcrits et amplifiés par PCR en utilisant des amorces permettant de différencier, de par leur nombre de paires de bases, hnRNP A1 (157 pb) et A1^B (316 pb) (Figure 13A). Aucun changement significatif n'a été observé dans le ratio d'ARNm de hnRNP A1^B/A1, ni entre les souris non-transgéniques et transgéniques TDP-43^{A315T}, ni entre les souris de 3 et 10 mois (Figure 13B). Par conséquent, l'altération dans le ratio protéique hnRNP A1^B/A1 n'est possiblement pas due à un effet d'épissage alternatif.

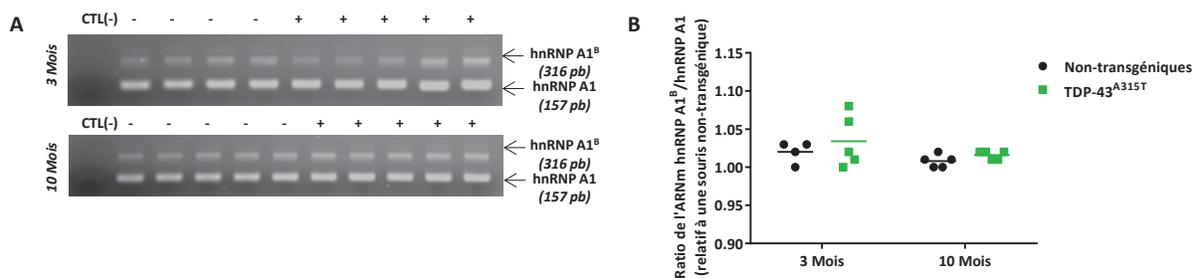


Figure 13 | Le ratio d'ARNm hnRNP A1^B/A1 est inchangé selon l'âge ou le génotype.

A) RT-PCR dont les bandes à 316 pb et 157 pb représentent les formes hnRNP A1^B et A1 respectivement. Gel du haut : souris de trois mois. Gel du bas : souris de dix mois. **B)**

Quantification par densitométrie du ratio d'ARNm hnRNP A1^B/A1 relativement à une souris non-transgéniques pour chaque groupe d'âge.

5. L'augmentation dans le ratio protéique hnRNP A1^B/hnRNP A1 chez les souris transgéniques TDP-43^{A315T} âgées de 10 mois, dans la région cervicale et lombaire de la moelle épinière, est probablement due à la mutation A315T plutôt qu'à la surexpression de TDP-43 d'après les résultats obtenus en culture cellulaire.

En raison de circonstances imprévisibles (probablement l'extinction de l'expression du gène), les souris TDP-43^{WT} n'étaient pas disponibles afin de vérifier si l'augmentation dans le ratio protéique hnRNP A1^B/hnRNP A1 chez les souris transgéniques TDP-43^{A315T} âgées de 10 mois, dans la région cervicale et lombaire de la moelle épinière, soit due à la mutation A315T ou à la surexpression de TDP-43. Le moyen alternatif qui a été utilisé consiste en la production d'une faible expression de plasmides ayant une étiquette GFP vide (mock) ou contenant la forme normale (TDP-43^{WT}) ou mutée (TDP-43^{A315T}) de TDP-43 dans des cellules HeLa (Figure 14A). Aucun changement significatif n'a été observé dans le ratio protéique hnRNP A1^B/A1, que ce soit avec l'expression du mock, de TDP-43^{WT} ou de TDP-43^{A315T} par rapport aux cellules non-transfectées. Par contre, une tendance dans l'augmentation du ratio protéique hnRNP A1^B/A1 de $1,54 \pm 0,34$ fois ($p = 0,08$) a été observé avec la surexpression de TDP-43^{A315T}. Ainsi, la mutation serait davantage en cause que la surexpression de TDP-43 concernant les résultats obtenus chez la souris.

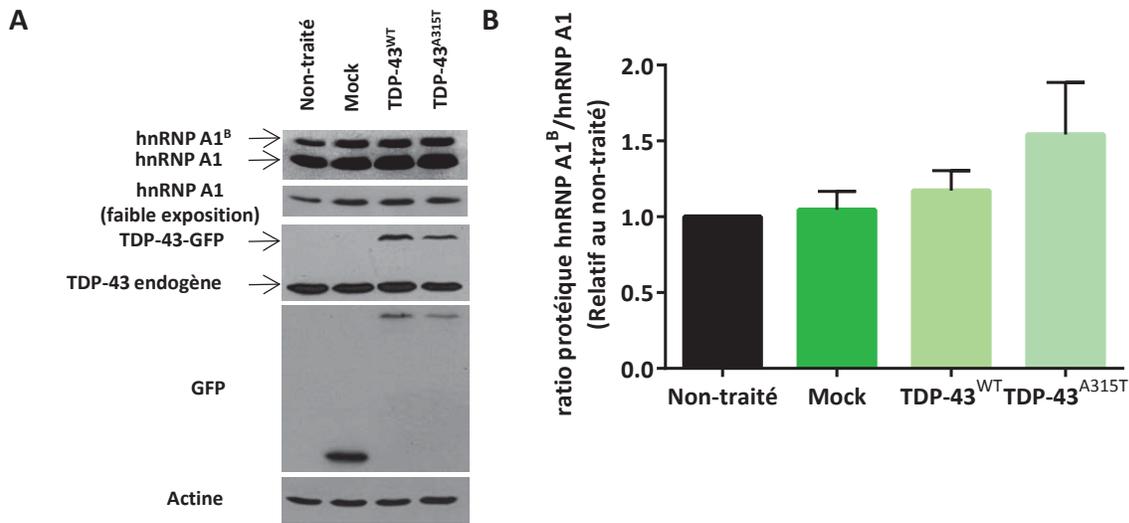


Figure 14 | La mutation TDP-43^{A315T}, plutôt que la surexpression de TDP-43, serait impliquée dans le changement du ratio protéique hnRNP A1^B/A1 observé chez les souris TDP-43^{A315T} âgées de 10 mois.

Les cellules ont été transfectées transitoirement ou non (non-traité) avec les plasmides pEGFP-N1 (mock), pEGFP-N1 TDP-43^{WT} ou pEGFP-N1 TDP-43^{A315T}. **A)** Immunoblots des lysats cellulaires totaux pour TDP-43, GFP, hnRNP A1 et A1^B, et actine comme contrôle de chargement. **B)** Quantification par densitométrie du ratio protéique hnRNP A1^B/A1 par rapport aux cellules non-traitées. La moyenne de quatre expériences indépendantes \pm SEM est représentée.

6. La forme pleine longueur hnRNP A1^B a un potentiel de fibrillation plus élevé que hnRNP A1.

Les inclusions cytoplasmiques retrouvées dans les tissus post-mortem sont une des caractéristiques principales de la SLA. À savoir si elles sont la cause ou la conséquence de la maladie reste encore à être déterminé. Une des composantes connues de ces inclusions est TDP-43 (Arai et al. 2006; Neumann et al. 2006). L'abondance de cette protéine est hautement régulée et une légère perturbation dans celle-ci peut mener à un dysfonctionnement cellulaire (révisé dans Robberecht et Philips, 2013). Étant donné que hnRNP A1^B et A1 possèdent une structure et des fonctions très similaires à celles de TDP-43,

il est possible qu'elles fassent aussi partie de ces inclusions, contribuant à la maladie. Effectivement, des mutations trouvées dans le domaine similaire aux prions de hnRNP A1, augmentant la probabilité de former des fibrilles amyloïdes, ont été rapportées (Kim et al. 2013). Toutefois, aucune analyse de ce genre n'a été réalisée dans la littérature pour hnRNP A1^B jusqu'à présent. Pourtant, hnRNP A1^B diffère structurellement de hnRNP A1 par sa région riche en glycine plus longue et dont la séquence de l'exon 7B en plus est située dans le cœur du domaine similaire à celui des prions. Dans le but de déterminer si hnRNP A1^B a une probabilité plus élevée de former des fibrilles amyloïdes, l'analyse de sa séquence par Zipper DB a été réalisée (<http://services.mbi.ucla.edu/zipperdb/intro>, Thompson et al. 2006; Nelson et al. 2005; Kuhlman et al. 2000; Sawaya et al. 2007). Il s'agit d'une base de données qui analyse les séquences protéiques putatives pour les segments à forte propension de fibrillation (énergie de Rosetta sous le seuil de -23kcal/mol) qui pourraient former une « fermeture éclair stérique », c'est-à-dire deux feuilles bêta auto-complémentaires donnant lieu à l'échine des fibrilles amyloïdes. Quatre domaines sous le seuil de -23kcal/mol, indiqués par un astérisque, ont été retrouvés dans l'exon 7B de hnRNP A1^B (en haut) que hnRNP A1 ne possède pas (exons 7 et 8, en bas) (Figure 15). Par conséquent, puisque le potentiel fibrillaire de hnRNP A1^B est plus élevé que celui de hnRNP A1, l'augmentation dans le ratio protéique hnRNP A1^B/A1 observé chez les souris pourrait contribuer à la formation d'agrégats tels que ceux retrouvés dans les tissus post-mortem de patients atteints de la SLA.

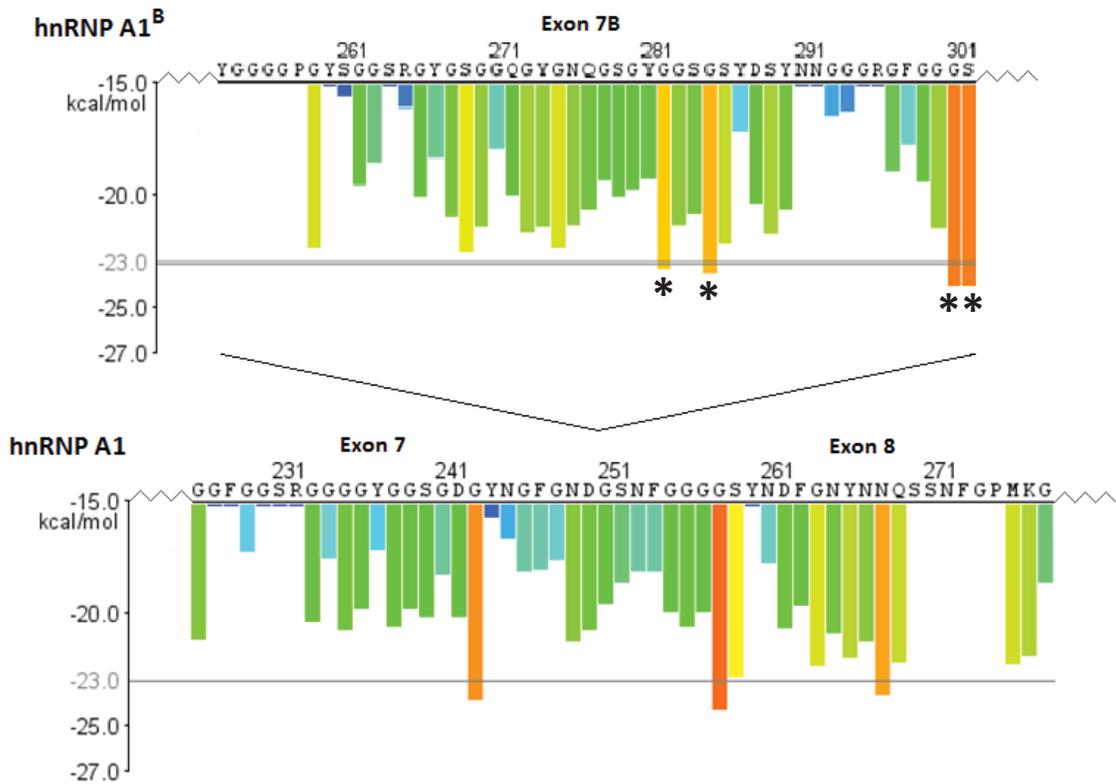


Figure 15 | hnRNP A1^B contient quatre domaines de fibrillation de plus que hnRNP A1.

Analyse des séquences de l'exon 7B de hnRNP A1^B (en haut) et d'une partie de la séquence des exons 7 et 8 de hnRNP A1 (en bas) par Zipper DB. Les résidus sont représentés par l'axe des x. Chaque barre de l'histogramme représente un hexapeptide et est coloré selon son énergie de Rosetta. Toutes les barres en orange et en rouge sont sous le seuil de -23 kcal/mol et prédisposées à former des fibrilles (ZipperDB). Ces domaines pour hnRNP A1^B sont indiqués par des astérisques (*).

Discussion et perspectives

L'abondance de TDP-43 est hautement régulée, si bien qu'une légère perturbation de celle-ci pourrait mener à un dysfonctionnement cellulaire (révisé dans Robberecht et Philips, 2013). Or, la proximité de TDP-43 avec hnRNP A1, tant au niveau structurel que fonctionnel, suggère qu'une perturbation dans les niveaux de hnRNP A1 puisse aussi être très néfaste pour la cellule. Étant donné l'étendue de l'implication de TDP-43 dans la SLA, son rôle transcriptionnel possible (Ou et al. 1995; Acharya et al. 2006) et son interaction protéique parfois essentielle avec hnRNP A1 (Buratti et al. 2005), nous avons émis l'hypothèse que TDP-43 puisse réguler hnRNP A1. Par conséquent, les mutations qui sont associées à TDP-43, ou un déséquilibre dans son abondance, pourraient altérer les niveaux de hnRNP A1, menant ainsi à un impact majeur sur la vulnérabilité des neurones moteurs. Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences sur des cellules HeLa ont d'abord été réalisées afin de définir, d'une part, de quelle façon TDP-43 régulerait hnRNP A1. D'autre part, des expériences sur des souris ont été effectuées afin de vérifier l'impact *in vivo* de TDP-43^{A315T} sur les niveaux de hnRNP A1. L'impact que ces changements pourraient avoir sur le fonctionnement cellulaire a aussi été considéré.

De façon plus détaillée, les expériences réalisées sur les cellules HeLa indiquent que TDP-43 lie l'ARNm de hnRNP A1 sans en affecter sa stabilité. Elles démontrent aussi que TDP-43 est un répresseur de hnRNP A1 et que la diminution de l'expression de TDP-43 entraîne donc une augmentation des niveaux d'ARNm et protéiques de hnRNP A1^B et A1. Chez les souris âgées de 10 mois, c'est plutôt le ratio protéique hnRNP A1^B/A1 qui augmente bien qu'aucun effet de l'épissage alternatif ne soit en cause. Cette augmentation est d'autant plus importante chez les souris portant la mutation TDP-43^{A315T} impliquée dans la SLA, ce qui est probablement dû à la mutation elle-même plutôt qu'à la surexpression de TDP-43 (d'après les expériences effectuées avec des cellules HeLa). Ces changements observés chez la souris pourraient avoir un impact sur la formation d'inclusions telles qu'observées dans les tissus

post-mortem de patients atteints de la SLA puisque hnRNP A1^B a un potentiel de fibrillation plus élevé que hnRNP A1.

L'interaction protéine-protéine entre TDP-43 et hnRNP A1 a déjà été démontrée (Buratti et al. 2005). Ici, l'interaction entre la protéine TDP-43 et l'ARNm de hnRNP A1 a été démontrée par co-immunoprécipitation dans les cellules HeLa (Figure 10A). Par contre, cette méthode n'a pas permis d'identifier la séquence de l'ARNm de hnRNP A1 à laquelle TDP-43 se lie. Pour ce faire, une expérience de CLIP serait appropriée. Il serait en effet avantageux de définir ces sites de liaison puisqu'ils pourraient fournir des indices sur le rôle que TDP-43 pourrait avoir sur hnRNP A1 ainsi que l'effet de mutations. Étant donné que TDP-43 puisse lier la 3'UTR d'autres ARNm afin d'influencer leur stabilité (Ayala et al. 2011; Volkening et al. 2009), nous avons supposé que TDP-43 puisse faire de même avec hnRNP A1. Par contre, les expériences utilisant un traitement à l'actinomycine D, soit un inhibiteur de la polymérase II, pendant différentes périodes de temps ont démontré le contraire par l'obtention de demi-vies similaires entre les conditions contrôles et celles ayant subi une diminution de l'expression de TDP-43 (Figure 10 B, C). Toutefois, afin de confirmer que TDP-43 n'aie aucun effet sur la stabilité de hnRNP A1, il serait préférable de refaire deux des trois expériences réalisées avec le traitement à l'actinomycine D. Effectivement, d'après celles-ci, l'augmentation des niveaux d'ARNm de hnRNP A1 n'avait pas été observée avec la diminution de l'expression de TDP-43 par rapport au contrôle pour les échantillons n'ayant subi aucun traitement, contrairement à ce qui était attendu (Figure 11). Ceci peut être dû au fait que les échantillons d'ARNm provenant de ces deux expériences avaient été repris d'autres expériences antérieures, ce qui apporte la possibilité qu'ils aient subi de la dégradation. Pour ce qui est de la troisième expérience, qui avait été réalisée à partir d'extraits d'ARNm frais, l'augmentation du niveau d'ARNm de hnRNP A1 avec la diminution de l'expression de TDP-43 par rapport au contrôle avec les échantillons non-traités à l'actinomycine D avait bel et bien été observée. Les demi-vies pour cette expérience ne semblaient pas différentes, supportant l'idée que TDP-43 n'aie aucun effet sur la stabilité de hnRNP A1. Par contre, afin de confirmer ces propos, il serait préférable de refaire au

minimum deux expériences avec des échantillons frais. Il serait aussi intéressant d'investiguer davantage sur la conséquence de cette liaison entre la protéine TDP-43 et l'ARNm de hnRNP A1. Par exemple, TDP-43 est connu pour son rôle dans l'épissage alternatif. En effet, TDP-43 a la capacité de lier les séquences introniques riches en UG près d'un exon impliqué dans l'épissage alternatif et d'en promouvoir son exclusion comme il a été démontré pour la CFTR, un gène impliqué dans la fibrose kystique (Buratti et al. 2001; Buratti et Baralle 2001; Ayala et al. 2006) et l'apolipoprotéine A-II (Mercado et al. 2005). Il serait donc possible que TDP-43 puisse aussi influencer l'épissage alternatif de hnRNP A1, lequel mènerait à la forme pleine longueur hnRNP A1^B ou à la forme manquant l'exon 7B, hnRNP A1. Dans le but de vérifier si TDP-43 aurait un effet direct sur l'épissage alternatif de hnRNP A1, la réalisation d'un essai d'épissage *in vitro* serait appropriée. Elle consisterait en l'observation de la sélection du site d'épissage proximal ou distal de hnRNP A1 sur des lignées dont la sous-expression de TDP-43 est induite ou non et ce, en fonction de l'ajout d'une concentration croissante de TDP-43 recombinant. Si tel est le cas, la détermination des régions de TDP-43 impliquées dans cette fonction serait envisageable. Des plasmides exprimant des protéines tronquées de TDP-43, tel que TDP-43 sans sa région riche en glycine, ou comportant différentes mutations, pourraient alors être utilisés.

TDP-43 peut réprimer l'expression du gène *TAR* du VIH (Ou et al. 1995) ainsi que le gène *arcv1* codant pour SP-10 (Acharya et al. 2006). Par conséquent, afin de vérifier si TDP-43 pourrait réguler hnRNP A1 via un mécanisme transcriptionnel, un essai luciférase utilisant le promoteur ou la 3'UTR de hnRNP A1 a été effectué sur des cellules HeLa en conditions contrôle ou avec la diminution de l'expression de TDP-43 (Figure 11 A, B). Ces expériences ont indiqué que TDP-43 est un répresseur de hnRNP A1 par l'augmentation de l'activité de la luciférase avec son promoteur lorsque l'expression de TDP-43 est diminuée par rapport au contrôle. Aucun changement n'a été observé en ce qui concerne la 3'UTR de hnRNP A1, ce qui appuie le fait que TDP-43 ne régule pas la stabilité de l'ARNm de hnRNP A1. L'augmentation dans les niveaux d'ARNm et protéiques de hnRNP A1^B et A1 lorsque l'expression de TDP-43 est diminuée par ARNi appuient également le fait que TDP-43 soit un

répresseur de hnRNP A1 (Figure 11 C, D, E). Il serait aussi intéressant de réaliser des essais complémentaires afin de confirmer l'effet direct de TDP-43 sur la régulation transcriptionnelle de hnRNP A1. Par exemple, à la suite de la diminution de l'expression de TDP-43 par ARNi, une cotransfection, utilisant le plasmide rapporteur de la luciférase fusionné avec le promoteur de hnRNP A1 et le plasmide TDP-43^{WT}, pourrait être effectuée. Si l'interaction entre TDP-43 et la région promotrice de hnRNP A1 est directe, alors une diminution de l'activité de la luciférase, par rapport à celle n'ayant pas subi l'ajout du plasmide TDP-43^{WT}, serait attendue. Le plasmide TDP-43^{WT} pourrait par la suite être remplacé par d'autres plasmides de TDP-43 portant des mutations afin d'observer leur effet sur la régulation transcriptionnelle de hnRNP A1.

Jusqu'à présent, les résultats de cette étude démontrent que TDP-43 lie l'ARNm de hnRNP A1 sans pour autant en affecter sa stabilité. Ils indiquent également que TDP-43 régule transcriptionnellement hnRNP A1 en réprimant son expression. Dans le but de vérifier si ce mécanisme est toujours valide chez la souris ainsi que l'effet de la mutation TDP-43^{A315T}, des extractions protéiques ont été réalisées à partir de différents tissus tels que le cortex ainsi que la région cervicale et lombaire de la moelle épinière, enrichies en neurones moteurs. Dans ce cas-ci, une augmentation du ratio protéique hnRNP A1^B/A1 a été observée chez les souris âgées de 10 mois comparativement à celles de 3 mois, laquelle est d'autant plus marquée chez les souris transgéniques TDP-43^{A315T}. Ceci signifie que le changement du niveau protéique de hnRNP A1^B est plus important que celui de hnRNP A1. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus en culture où le changement du niveau protéique de hnRNP A1^B est similaire à celui de hnRNP A1 avec la diminution de l'expression de TDP-43 (Figure 11 C, D). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que chez la souris, contrairement aux cellules HeLa, la dégradation de hnRNP A1^B soit plus rapide que celle de hnRNP A1, menant ainsi au ratio hnRNP A1^B/A1 plus élevé observé. Effectivement, les modèles d'études étant très différents, il se peut que les cellules HeLa, qui sont des cellules cancéreuses, aient développé des mécanismes différents de ceux des cellules neuronales. Afin de vérifier si la demi-vie de hnRNP A1^B est effectivement plus élevée que celle de hnRNP A1, des

expériences utilisant le cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, pourraient être réalisées sur des cellules HeLa et des cultures de neurones moteurs. De cette façon, l'augmentation du ratio protéique observé chez les souris âgées, dont l'effet est encore plus robuste chez les souris TDP-43^{A315T}, pourrait être due à une perte de fonction dans la répression de hnRNP A1, puis à une dégradation plus lente de hnRNP A1^B par rapport à hnRNP A1.

Une autre possibilité pouvant expliquer l'augmentation dans le ratio protéique hnRNP A1^B/A1 des souris âgées TDP-43^{A315T} serait un défaut dans l'épissage alternatif menant à ces deux formes. Dans ce cas, il s'agirait soit d'une activation du maintien de la forme hnRNP A1^B par rapport à hnRNP A1, ou d'une inhibition de la conversion de hnRNP A1^B en hnRNP A1. Afin de déterminer l'implication de l'épissage alternatif dans l'obtention de ces résultats, le ratio d'ARNm hnRNP A1^B/A1 a été évalué. Aucune différence significative n'a été observée, que ce soit selon l'âge ou le génotype (Figure 13). Toutefois, il est à noter que le fond noir n'est pas uniforme et que le colorant inférieur ajouté arrive à la même hauteur que la bande de hnRNP A1. Pour éviter ce problème, il aurait fallu ajouter du colorant supérieur et éviter une exposition non uniforme lors de la prise de photo. Afin de s'assurer de la validité de ces résultats, il serait préférable de refaire la transcription inverse et la PCR. Ceci est très important puisqu'il s'agit de la détermination du mécanisme par lequel TDP-43 régulerait hnRNP A1 *in vivo*. Toutefois, en considérant les données obtenues jusqu'à présent, le fait que l'épissage alternatif ne semble pas être en cause favorise un mécanisme transcriptionnel tel qu'observé en culture.

Ensuite, étant donné qu'un déséquilibre dans l'abondance de TDP-43 puisse mener à un dysfonctionnement cellulaire, l'augmentation plus prononcée du ratio hnRNP A1^B/A1 chez les souris âgées TDP-43^{A315T} par rapport aux souris non-transgéniques peut être due à la surexpression de TDP-43 ou à la mutation A315T. Pour le savoir, il aurait fallu comparer le ratio protéique hnRNP A1^B/A1 des souris TDP-43^{A315T} avec des souris TDP-43^{WT}. Dans le cas d'un changement similaire du ratio protéique, la surexpression de TDP-43 aurait été responsable ou *vice versa*. En raison de circonstances imprévisibles (probablement

l'extinction de l'expression du gène), les souris TDP-43^{WT} n'étaient pas disponibles afin d'effectuer une telle comparaison. C'est pourquoi l'utilisation de plasmides exprimant TDP-43^{WT} ou TDP-43^{A315T} ont été employés en culture (HeLa). D'après ces résultats, aucune différence significative n'a été observée entre les deux, bien qu'une tendance dans l'augmentation du ratio pour TDP-43^{A315T} semble alors favoriser la mutation plutôt que la surexpression de TDP-43. Par contre, il s'agit de transfections transitoires et, si l'efficacité de transfection est faible, il n'est pas surprenant que les effets ne soient pas significatifs. Effectivement, l'efficacité des transfections a été évaluée à 30%, ce qui est relativement faible. Comme les plasmides ont une étiquette GFP, les cellules transfectées seulement pourraient être sélectionnées à l'aide du FACS. L'effet de TDP-43^{WT} ou TDP-43^{A315T} sur le ratio protéique hnRNP A1^B/A1 serait alors beaucoup plus représentatif.

L'impact de l'augmentation du ratio protéique hnRNP A1^B/A1 observé chez les souris âgées et davantage chez les TDP-43^{A315T} sur la formation possible d'agrégats a aussi été mis en évidence au cours de cette étude en raison d'un potentiel fibrillaire plus élevée chez hnRNP A1^B que hnRNP A1. Une autre expérience qui permettrait d'appuyer ces résultats serait d'évaluer la formation d'amyloïdes *in vitro*. L'essai consiste à incuber à 25 °C 0-12 h des peptides représentant une partie de la séquence de l'exon 7B pour hnRNP A1^B (contenant les régions où l'énergie de Rosetta est sous le seuil de -23 kcal/mol, voir les astérisques à la Figure 15) et une partie de l'exon 6 par exemple pour hnRNP A1 avec de la Thioflavine-T. Il s'agit d'un composé largement utilisé pour détecter et quantifier la présence d'amyloïdes puisqu'il devient fluorescent lorsqu'ils sont en contact avec ceux-ci. De cette façon, en accord avec les données obtenues de l'analyse ZipperDB, la fluorescence provenant de la Thioflavine-T devrait être plus élevée à la suite de son incubation avec hnRNP A1^B plutôt qu'avec hnRNP A1. Il serait ensuite très intéressant de vérifier directement la présence de tels agrégats. Par exemple, il serait possible d'effectuer de l'immunohistochimie sur des coupes de la partie lombaire de la moelle épinière des souris à trois et dix mois non-transgéniques et transgéniques. L'utilisation d'un anticorps spécifique au TDP-43 humain permettrait de confirmer le génotype des souris et sa localisation nucléaire ou

cytoplasmique. L'emploi d'un anticorps reconnaissant majoritairement la forme hnRNP A1^B permettrait de vérifier, d'une part, s'il y a des agrégats contenant cette forme chez les souris âgées de dix mois comparativement aux souris âgées de trois mois et, d'autre part, s'il y a plus d'agrégats dans les souris âgées de dix mois transgéniques par rapport aux non-transgéniques. Il serait aussi intéressant d'utiliser des marqueurs de granules de stress tels que TIA-1 afin de vérifier le modèle selon lequel les inclusions cytoplasmiques pathologiques sont reliées aux granules de stress. Ce dernier est expliqué plus en détail ci-dessous.

Les cellules eucaryotes ont des dispositifs de protection envers des stress oxydatifs, thermiques ou génotoxiques par exemple; les granules de stress (Anderson et Kedersha, 2008-2009). Ce sont des domaines cytoplasmiques contenant des ARNm dont leur traduction est temporairement arrêtée dans le but de maximiser les ressources de la cellule durant l'exposition au stress (Lindquist, 1981). Bien que ce processus soit normal et nécessaire à la survie cellulaire, un dysfonctionnement de cette réponse serait possiblement lié au déclenchement de certaines maladies neurodégénératives.

Effectivement, trois observations supportent l'hypothèse selon laquelle un dysfonctionnement dans les mécanismes de formation des granules de stress aboutirait à la formation d'agrégats reliés à certaines maladies neurodégénératives. Ainsi, dans le cadre de la SLA, les agrégats caractéristiques de la pathologie sont positifs pour TDP-43 (Ramaswami et al. 2013) et colocalisent avec les marqueurs des granules de stress (Liu-Yesucevitz et al. 2010; Wolozin, 2012). Ensuite, les protéines liant l'ARNm s'assemblent normalement dans les granules de stress lors d'un stimulus, mais deviennent pathogéniques lorsqu'elles sont mutées (Dormann et al. 2010; Guil et al. 2006). Enfin, les allèles pathogènes de la plupart de ces protéines liant l'ARNm, lorsqu'ils sont exprimés en culture cellulaire, génèrent des agrégats pouvant être reliés à des granules de stress (Liu-Yesucevitz et al. 2010; Wolozin, 2012; Kim et al. 2005).

De cette façon, par quel mécanisme les granules de stress, nécessaires à la survie cellulaire, peuvent devenir des inclusions pathologiques pour la cellule? En fait, les protéines

liant l'ARNm permettent de les recruter rapidement dans les granules de stress, supposément afin de minimiser les dommages qui y sont liés. Ces protéines possèdent dans leur structure un domaine similaire à celui des prions qui leur permettent de se rassembler rapidement (Gilks et al. 2004; Couthouis et al. 2011; Gitler et Shorter, 2011; King et al. 2012; Kim et al. 2013). Normalement, ces interactions sont réversibles, ce qui permet le désassemblage des granules de stress une fois le stimulus terminé. Toutefois, différents facteurs pourraient influencer ces interactions vers un stade de non-retour, c'est-à-dire que les granules de stress pourraient se transformer en des complexes similaires, mais avec un assemblage amyloïde, puis finalement en inclusions pathologiques. Ces facteurs peuvent être des mutations pouvant exacerber l'assemblage des granules de stress, la formation des amyloïdes ou encore pouvant en minimiser la clairance par autophagie lequel, d'ailleurs, décline avec l'âge (Ramaswami et al. 2013). Enfin, ces inclusions cytoplasmiques deviennent toxiques puisqu'elles perturbent la « ribostasie » de la cellule, c'est-à-dire « la production et la régulation appropriée du transcriptome cellulaire, ce qui a des effets en aval sur l'homéostasie des protéines » (traduit directement de Ramaswami et al. 2013).

Les résultats de la présente étude peuvent être incorporés dans le modèle proposé ci-dessus. Effectivement, TDP-43 et hnRNP A1 sont tous les deux des protéines liant l'ARNm. Elles possèdent aussi dans leurs structures des domaines similaires aux prions et ont la faculté de s'assembler normalement dans les granules de stress en cas de stimulus.

Ainsi, en accord avec le modèle proposé ci-dessus, il se peut que la mutation A315T affectant TDP-43 puisse promouvoir la formation des granules de stress, lesquels pourraient être transformés en complexes similaires, mais avec un assemblage amyloïde en raison de l'augmentation de la protéine hnRNP A1^B qu'elle occasionne. Effectivement, d'après l'analyse de Zipper DB, hnRNP A1^B comprend quatre domaines de fibrillation supplémentaires par rapport à hnRNP A1, et ceci serait peut-être suffisant pour faire pencher la balance vers un stade de la « non-réversibilité ». Mayeda et al. 1994 ont publié une étude démontrant par *filter binding assay* que hnRNP A1^B a une activité de liaison à l'ARN plus élevée que hnRNP A1 corroborant notre hypothèse puisque l'habileté de liaison à l'ARN serait impliquée dans la

toxicité menant à la pathologie (Ramaswami et al. 2013). En plus, certains gènes qui codent pour des protéines liant l'ARN se retrouvent mutés et impliqués dans la pathologie. En plus, plusieurs expériences effectuées avec la levure et la drosophile supportent cette idée. Par exemple, des mutations favorisant ou défavorisant la liaison de ces protéines à des ARNs ont démontré une augmentation ou une diminution de leur toxicité respectivement (Daigle et al. 2013; Johnson et al. 2009; Sun et al. 2011; Voigt et al. 2010). Enfin, comme l'autophagie, qui permet leur clairance, décline avec l'âge, les complexes amyloïdes pourraient devenir des inclusions pathologiques.

Les inclusions pathologiques pourraient être toxiques en affectant la ribostasie de la cellule. D'abord, ces inclusions renferment non seulement les protéines mutées liant l'ARN, mais aussi les ARNs qui y sont liés. Ces derniers deviennent ainsi indisponibles pour la traduction, provoquant un déséquilibre dans l'homéostasie protéique. Elles comportent également des micros ARNs et des facteurs de régulation, lesquels ne peuvent plus assurer leurs fonctions de traduction, localisation ou encore de dégradation d'autres ARNs (Ramaswami et al. 2013).

La toxicité des inclusions aurait un plus grand impact sur les neurones. Effectivement, étant donné qu'ils sont incapables de se régénérer, ils seraient donc plus sensibles à l'accumulation de ces dommages cellulaires. En plus, les neurones ont déjà un nombre plus élevée d'ARNs non traduits au niveau des dendrites et de l'axone, ce qui les prédisposent davantage à l'agrégation. Enfin, les neurones moteurs forment un circuit en chaîne de façon à créer un effet domino dans la transmission de cellules en cellules de la mort cellulaire. (Ramaswami et al. 2013).

Conclusion

Chez les souris âgées, le ratio protéique hnRNP A1^B/A1 est augmenté et encore davantage chez les souris TDP-43^{A315T}. Cette perturbation n'est pas due à un défaut de l'épissage alternatif menant à ces deux formes, mais peut-être à un mécanisme de répression de la transcription de hnRNP A1 par TDP-43 tel que déterminé en culture. Étant donné que la forme hnRNP A1^B par rapport à hnRNP A1 a une probabilité plus élevée de former des amyloïdes, nos résultats pourraient donc fournir un mécanisme potentiel de la formation d'inclusions cytoplasmiques reconnues comme étant une des caractéristiques pathologiques principales de la SLA. Ensemble, ces résultats suggèrent que les mutations de TDP-43 pourraient entraîner, avec l'âge, l'accumulation d'agrégats contenant hnRNP A1^B pouvant mener aux inclusions cytoplasmiques observées dans les tissus post-mortem des patients atteints de la SLA. Étant donné que ces inclusions cytoplasmiques pourraient être toxiques pour la cellule et que les neurones moteurs seraient des cellules plus vulnérables, cette étude pourrait contribuer à l'avancement des connaissances sur l'initiation de la SLA menant à la perte des neurones moteurs.

Bibliographie

Acharya, K.K et al. (2006) "Cis-requirement for the maintenance of round spermatid-specific transcription." Dev Biol **295**:781-790.

Al-Chalabi, A. et al. (2012). "The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis." Acta Neuropathol **124**:339-352.

Al-Sarraj, S. et al. (2011). "p62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTL and MND/ALS." Acta Neuropathol **122**:691-702.

Anderson, P. et Kedersha, N. (2008). "Stress granules: the Tao of RNA triage." Trends Biochem Sci **33**:141-150.

Anderson, P. et Kedersha, N. (2009). "Stress granules." Curr Biol **19**:R397–R398.

Arai, T. et al. (2006). "TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in fronto-temporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." Biochem Biophys Res Commun **351**:602-611.

Aulas, A. et al. (2012). "TDP-43, but not FUS, contribute to stress granule assembly via G3BP." Mol Neurodegrad **7**:54.

Avendaño-Vázquez, S.E. et al. (2012). "Autoregulation of TDP-43 mRNA levels involves interplay between transcription, splicing, and alternative polyA site selection." Genes Dev **26**:1679-1684.

Ayala, Y.M. et al. (2005). "Human, Drosophila, and C. elegans TDP43: nucleic acid binding properties and splicing regulatory function." J Mol Biol **348**:575–588.

Ayala, Y.M. et al. (2006). "TDP43 depletion rescues aberrant CFTR exon 9 skipping." FEBS Lett **580**:1339–1344.

Ayala, Y.M. et al. (2008). "Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43." J Cell Sci **121**:3778–3785.

Ayala, Y.M. et al. (2011). "TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop." EMBO J **30**:277-278.

Baloh, R.H. (2011). "TDP-43: the relationship between protein aggregation and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration." FEBS J **278**:3539–3549.

Bekenstein, U. et Soreq, H. (2013). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in health and neurodegenerative disease: From structural insights to post-transcriptional regulatory roles." Mol Cell Neurosci **56**:436-446.

Bensimon, G. et al. (1994). "A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group." N Engl J Med **330**:585-591.

Beyer, A.L. et al. (1977). "Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles." Cell **11**:127–138.

Blackburn, E.H. (2001). "Switching and signaling at the telomere." Cell **106**:661–673.

Blanchette, M. et Chabot, B. (1997). "A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B." RNA **3**:405-419.

Blanchette, M. et Chabot, B. (1999). "Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization." EMBO J **18**(7):1939-1952.

Blokhuis, A.M. et al. (2013). "Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis." Acta Neuropathol **125**:777-794.

Bose, J.K. et al. (2008). "TDP-43 overexpression enhances exon 7 inclusion during the survival of motor neuron pre-mRNA splicing." J Biol Chem **283**:28852-9.

Buchan, J.R. et al. (2008). "P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Biol **183**:441–455.

Buchan, J.R. et al. (2011). "Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Sci **124**:228-239.

Budini, M. et al. (2012). "Cellular model of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) aggregation based on its C-terminal Gln/Asn-rich region." J Biol Chem **287**:7512–7525.

Buratti, E. and Baralle, F.E. (2001). "Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9." J Biol Chem **276**:36337–36343.

Buratti, E. et al. (2001). "Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote *in vitro* and *in vivo* CFTR exon 9 skipping." EMBO J **20**:1774–1784.

Buratti, E. et al. (2004). "Nuclear factor TDP-43 binds to the polymorphic TG repeats in CFTR intron 8 and causes skipping of exon 9: a functional link with disease penetrance." Am J Hum Genet **74**:1322-5.

Buratti, E. et al. (2005). "TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing." J Biol Chem **280**:37572–37584.

Buvoli et al. (1990). "Alternative splicing in the human gene for the core protein A1 generates another hnRNP protein." EMBO J **9**:1229-1234.

Caceres, J.F. et Krainer, A.R. (1993). "Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains." EMBO J **12**:4715–4726.

Campillos, M. et al. (2003). "Specific interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 with the –219T allelic form modulates APOE promoter activity." Nucleic Acids Res **31**:3063–3070.

Cartegni, L. et al. (1996). "hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins." J Mol Biol **259**:337–348.

Casas-Finet, J.R. et al. (1993). "Mammalian heterogeneous ribonucleoprotein A1 and its constituent domains. Nucleic acid interaction, structural stability and self-association." J Mol Biol **229**:873–889.

Chabot, B. et al. (1997). "An Intron Element Modulating 5' Splice Site Selection in the hnRNP A1 Pre-mRNA Interacts with hnRNP A1." Mol Cell Biol **17**(4):1776-1786.

Charcot, J.M. et al. (1892). "Leçons du mardi à la Salpêtrière : Policlinique, 1887-1888." Aux bureaux du progrès médical, **1** :501 p.

Charité Campus Virchow-Klinikum (2009). "The rudiments of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)". Hyperlien: <http://www.english.als-charite.de/VM/ALS/Clinicalpicture/Basics/tabid/1228/language/en-US/Default.aspx>

Chen, C.Y, et al. (2001). "AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs." Cell **107**:451-464.

Colombrita C. et al. (2009). "TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult." J Neurochem **111**:1051–1061.

Couthouis, J. et al. (2011). "A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes." Proc Natl Acad Sci USA **108**:20881–20890.

Daigle, J.G. et al. (2013). "RNA-binding ability of FUS regulates neurodegeneration, cytoplasmic mislocalization and incorporation into stress granules associated with FUS carrying ALS-linked mutations." Hum Mol Genet **22**:1193–1205

Damgaard, C.K. et al. (2002). "hnRNP A1 controls HIV-1 mRNA splicing through cooperative binding to intron and exon splicing silencers in the context of a conserved secondary structure." RNA **8**:1401–1415.

Daoud, H. et al. (2009). "Contribution of *TARDBP* mutations to sporadic amyotrophic lateral sclerosis." J Med Genet **46**:112-114.

Dewey, C.M. et al. (2010). "TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor." Mol Cell Biol **31**:1098–1108.

Dion, PA. et al. (2009). "Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms." Nat Rev Genet **10**:769-82.

Dormann, D. et al. (2010). "ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import." EMBO J **29**:2841–2857.

Dreyfuss, G. et al. (1993). "hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA." Annu Rev Biochem **62**:289-321.

Elden, A.C. et al. (2010). "Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS." Nature **466**:1069-1075.

Ferraiuo, L. et al. (2011). "Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis." Nat Rev Neurol **7**:616-630.

Fisette, J.F. et al. (2010). "hnRNP A1 and hnRNP H can collaborate to modulate 5' splice site selection." RNA **16**:228–238.

Freibaum B.D. et al. (2010) "Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery." J Proteome Res **9**:1104–1120.

Fuentealba, R.A. et al. (2010). "Interaction with polyglutamine aggregates reveals a Q/N-rich domain in TDP-43." J Biol Chem **285**:26304–26314.

Fukuda, T. et al. (2007). "DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs." Nat Cell Biol **9**:604–611.

Dr. Geser, F. et al. (2010). "Pathological 43-kDa Transactivation Response DNA-Binding Protein in Older Adults With and Without Severe Mental Illness." Arch Neurol **67**(10):1238-1250.

Gilk, N. et al. (2004). "Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1." Mol Biol Cell **15**:5383-5398.

Gitler, A.D., et J. Shorter. (2011). "RNA-binding proteins with prion-like domains in ALS and FTLD-U." Prion **5**:179–187.

Gregory, R.I. et al. (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." Nature **432**:235–240.

Guil, S. et al. (2006). "hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response." Mol Cell Biol **26**:5744-5758.

Han, S.P. et al. (2012). "Functional implications of the emergence of alternative splicing in hnRNP A/B transcripts." RNA **16**:1760-1768.

Hertel, K.J. (2008). "Combinatorial control of exon recognition." J Biol Chem **283**:1211-1215.

Hortobagyi, T. et al. (2011). "Optineurin inclusions occur in a minority of TDP-43 positive ALS and FTLD-TDP cases and are rarely observed in other neurodegenerative disorders." Acta Neuropathol **121**:519-527.

Huelga, S.C. et al. (2012). "Integrative genome-wide analysis reveals cooperative regulation of alternative splicing by hnRNP proteins." Cell Rep **1**(2):167-178.

Hühlein, P. et al. (2008). "Two German kindreds with familial amyotrophic lateral sclerosis due to *TARDBP* mutations." Arch Neurol **65**:1185-1189.

Jean-Philippe, J. et al. (2013). "hnRNP A1: The Swiss Army Knife of Gene Expression." Int J Mol Sci **14**: 18999-19024.

Johnson, B.S. et al. (2009). "TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity." J Biol Chem **284**: 20329–20339.

Kabashi, E. et al. (2008). "TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis." Nat Genet **40**:572-574.

Kedersha, N. et al. (2005). "Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling." J Cell Biol **169**:871-884.

Kiledjian, M. et Dreyfuss, G. (1992). "Primary structure and binding-activity of the Hnrnp U-protein — binding Rna through Rgg box." EMBO J **11**:2655–2664.

Kirby, J. et al. (2010). "Broad clinical phenotypes associated with TAR-DNA binding protein (*TARDBP*) mutations in amyotrophic lateral sclerosis." Neurogenet **11**:217-225.

Kim, V.N. (2005). "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing." Nat Rev Mol Cell Biol **6**:376–385.

Kim, H.J. et al. (2013). "Prion-like domain mutations in hnRNPs cause multisystem proteinopathy and ALS." Nature **495**(7442):467-473.

King, O.D. et al. (2012). "The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease." Brain Res **1462**:61–80.

Krainer, A.R. et al. (1990). "Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells." Genes Dev **4**:1158-1171.

Kuhlman, B. et Baker, D. (2000). "Native protein sequences are close to optimal for their structures." PNAS **97**:10383-10388.

Kumar, A. et Wilson, S.H. (1990). "Studies of the strand-annealing activity of mammalian hnRNP complex protein A1." Biochemistry **29**:10717–10722.

Kwiatkowski, TJ Jr. et al. (2009). "Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis." Science **323**:1205-1208.

Kwon, S. et al. (2007). "The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response." Genes Dev **21**:3381-3394.

LaBranche, H. et al. (1998). "Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase." Nat Genet **19**:199-202.

Lacomblez, L. et al. (1996). "Doseranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II." Lancet **347**:1425-31.

Lagier-Tourenne, C. et Cleveland, D.W. (2009). "Rethinking ALS: the FUS about TDP-43." Cell **136**:1001–1004.

Lagier-Tourenne, C. et al. (2010). "TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration." Hum Mol Genet **19**:R46-74.

Lau, J.S. et al. (2000). "Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as regulators of gene expression through interactions with the human thymidine kinase promoter." J Cell Biochem **79**:395–406.

LeBer et al. (2013). "hnRNP A2/B1 and hnRNP A1 mutations are rare in patients with "multisystem proteinopathy" and frontotemporal lobar degeneration phenotypes." Neurobiol Aging S0197-4580(13)00418-1.

Lee, C.G. et al. (1993). "RNA annealing activity is intrinsically associated with U2AF." J Biol Chem **268**:13472–13478.

Lee, E.B. et al. (2012). "Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration." Nat Rev Neurosci **13**:38–50.

Li, Y.R et al. (2013). "Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis." J Cell Biol **201**(3):361-372.

Lindquist, S. (1981). "Regulation of protein synthesis during heat shock." Nature **293**:311-314.

Liu-Yesucevitz, L. et al. (2010). "Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue." PLoS ONE **5**:e13250.

Liu-Yesucevitz, L. et al. (2011). "Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue." Plos One **5**(10):e13250.

Martinez-Contreras, R. (2006). "Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing." Plos Biol **4**:e21.

Matunis, E. L. et al. (1992). "Characterisation of the major hnRNP proteins from *Drosophila melanogaster*." J Cell Biol **116**:257-269.

Mayeda, A. et al. (1994). "Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins." EMBO J **13**(22):5483-5495.

Mayeda, A. et al. (1998). "Distinct functions of the closely related tandem RNA-recognition motifs of hnRNP A1." RNA **4**:1111–1123.

- Mears, W.E. et Rice, S.A. (1996). "The RGG box motif of the herpes simplex virus ICP27 protein mediates an RNA-binding activity and determines in vivo methylation." J Virol **70**:7445–7453.
- McDonald, K.K. et al. (2011). "TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1." Hum Mol Genet **20**:1400–1410.
- Mercado P.A. et al. (2005). "Depletion of TDP 43 overrides the need for exonic and intronic splicing enhancers in the human apoA-II gene." Nucleic Acids Res **33**:6000–6010.
- Michael, W.M. et al. (1995). "A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway." Cell **83**:415–422.
- Michelle, L. et al. (2012). "hnRNP and hnRNP-Like Proteins in Splicing Control: Molecular Mechanisms and Implication in Human Pathologies." RNA Binding Prot **1**:1-25.
- Moisse K. et al. (2009). "Cytosolic TDP-43 expression following axotomy is associated with caspase 3 activation in NFL-/- mice: support for a role for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury." Brain Res **1296**:176–186.
- Mukherjee, D. et al. (2002). "The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements." EMBO J **21**:165-174.
- Munroe, S.H. et Dong, X.F. (1992). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 catalyzes RNA.RNA annealing." Proc Natl Acad Sci USA **89**:895–899.
- Nadler, S.G. et al. (1991). "Interactions of the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein and its proteolytic derivative, UP1, with RNA and DNA: evidence for multiple RNA binding domains and salt-dependent binding mode transitions." Biochemistry **30**:2968–2976.
- Nelson, R. et al. (2005). "Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils." Nature **435**:773-778.
- Neumann, M. et al. (2006). "Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." Science **314**:130-133.
- Okamoto, K. et al. (2008). "Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis." Neuropath **28**:109-115.
- Okunola, H.L. et Krainer, A.R. (2009). "Cooperative-binding and splicing-repressive properties of hnRNP A1." Mol Cell Biol **29**:5620–5631.

Ou, S.H. et al. (1995). "Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs." J Virol **69**:3584–3596.

Paramasivam, M. et al. (2009). "Protein hnRNP A1 and its derivative Up1 unfold quadruplex DNA in the human KRAS promoter: implications for transcription." Nucleic Acids Res **37**:2841–2853.

Parker, S.J. et al. (2012). "Endogenous TDP-43 localized to stress granules can subsequently form protein aggregates." Neurochem Int **60**:415-424.

Pesiridis, G.S. et al. (2009). "Mutations in TDP-43 link glycine-rich domain functions to amyotrophic lateral sclerosis." Hum Mol Genet **18**:156-162.

Piao, Y.S. et al. (2003). "Neuropathology with clinical correlations of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: 102 autopsy cases examined between 1962 and 2000." Brain Pathol **13**(1):10-22.

Pinol-Roma, S. et Dreyfuss, G. (1992). "Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm." Nature **355**:730–732.

Polymenidou, M. et al. (2011). "Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43." Nat Neurosci **4**(4):459-68

Pontius, B.W. et Berg, P. (1990). "Renaturation of complementary DNA strands mediated by purified mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 protein: implications for a mechanism for rapid molecular assembly." Proc Natl Acad Sci USA **87**:8403–8407.

Portman, D.S. et Dreyfuss, G. (1994). "RNA annealing activities in HeLa nuclei." EMBO J **13**:213–221.

Ravits, J. et al. (2013). "Deciphering amyotrophic lateral sclerosis: What phenotype, neuropathology and genetics are telling us about pathogenesis." Nat Inst. Health **14**:5-18.

Reed, R. et Hurt, E. (2002). "A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing." Cell **108**:523–531.

Robberecht, W. et al. (2013). "The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis." Nat Rev Neurosci **14**:248-264.

Rosen, DR. et al. (1993). "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis." Nature **362**:59-62.

Rutherford, N.J. et al. (2008). "Novel mutations in *TARDBP* (TDP-43) in patient with familial amyotrophic lateral sclerosis." *Plos Genet* 4:e1000193.

Sawaya, M.R. et al. (2007). "Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers." *Nature* 447:453-457.

Sephton, C.F. et al. (2010). "Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes." *J Biol Chem* 286:1204-1215.

Shaw, P.J. (2001). "Genetic inroads in familial ALS." *Nat Genet* 29(2):103-4.

Siomi, H. et Dreyfuss, G. (1995). "A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein." *J Cell Biol* 129:551-560.

Sreedharan, J. et al. (2008). "TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Science* 319:1668-1672.

Strong, M.J. et al. (2007). "TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein." *Mol Cell Neurosci* 35:320-327.

Sun, Z. et al. (2011). "Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS." *PLoS Biol* 9:e1000614.

Swarup, V. et al. (2011). "Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments." *Brain* 134:2610-2626.

Swisher, K.D. et Parker, R. (2010). "Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*." *PLoS One* 5:e10006.

Tollervey, J.R. et al. (2011). "Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43." *Nat Neurosci* 14(4):452-458.

Thompson, M.J. et al. (2006). "The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins." *PNAS* 103:4074-4078.

Tsai, C.-P. et al. (2011). "*FUS*, *TARDBP* and *SOD1* mutations in Taiwanese cohort with familial ALS." *Neurobiol Aging* 32: 553e13-55321.

Vance, C. et al. (2009). "Mutations in *FUS*, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6." *Science* 323:1208-1211.

Vande Velde, C. et al. (2011). "Amyotrophic lateral sclerosis: new genes, new models, and new mechanisms." Biol Rep **3**:18.

Voigt, A. et al. (2010). "TDP-43-mediated neuron loss in vivo requires RNA-binding activity." PLoS ONE **5**:e12247.

Volkening, H. et al. (2009). "Tar DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43), 14-3-3 proteins and copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) interact to modulate NFL mRNA stability. Implications for altered RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)." Brain Res **1305**:168-182.

Wang, I.F. et al. (2012). "The self-interaction of native TDP-43 C terminus inhibits its degradation and contributes to early proteinopathies." Nat Commun **3**:766.

Wang, Z.F. et Burge, C.B. (2008). "Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code." RNA **14**:802-813.

Williams, KL. Et al. (2012). "UBQLN2/ubiquilin 2 mutation and pathology in familial amyotrophic lateral sclerosis." Neurobiol Aging **33**:2527 e2523-2510.

Winton, M.J. et al. (2008). "Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation." J Biol Chem **283**:13302–13309.

Wolozin, B. (2012). "Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration." Mol Neurodegener **7**:56.

Zhang et al. (2013). "The dual functions of the extreme N-terminus of TDP-43 in regulating its biological activity and inclusion formation." Hum Mol Gen **22**:3112-22.

Zhou, H. et al. (2010). "Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene." Plos Genet **6**:e1000887.

Zinszner H. et al. (1997). "TLS (FUS) binds RNA *in vivo* and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling." J Cell Sci **110**:1741–1750.

Zipper DB (2013), UCLA-DOE, HHMI, University of California, Los Angeles. Hyperlien: <http://services.mbi.ucla.edu/zipperdb/intro>

Appendice

1. La diminution de l'expression de TDP-43 n'affecte pas la distribution globale des ARNm polyadénylés

D'après les résultats obtenus à la figure 11, la diminution de l'expression de TDP-43 affecte les niveaux de hnRNP A1^B et A1. Étant donné que hnRNP A1 est une navette nucléocytoplasmique permettant le transport des ARNs pré-messagers du noyau au cytoplasme en vue de leur traduction (Siomi et Dreyfuss, 1995; Michael et al. 1995), il est possible que les changements dans l'expression de TDP-43 puisse influencer cette fonction. Afin de déterminer si TDP-43 a un impact sur la fonction essentielle de hnRNP A1 dans le transport d'ARNm, leur distribution nucléaire et cytoplasmique selon la diminution de l'expression de TDP-43 a été observée dans les cellules HeLa. TDP-43 (Zinszer et al. 1997; Ayala et al. 2004) et hnRNP A1 (Siomi et Dreyfuss, 1995) sont majoritairement nucléaires tel que prévu et l'efficacité de la diminution de l'expression de TDP-43 est robuste (Figure 16A). La sous-expression de TDP-43 a augmenté le niveau des protéines cytoplasmiques de hnRNP A1 et A1^B par rapport au siContrôle (Figure 16B). Plus précisément, le niveau de la protéine hnRNP A1^B a augmenté significativement de 3,91 (\pm 1,24 fois) ($p = 0,04$). Le niveau de la protéine cytoplasmique de hnRNP A1 a aussi augmenté, mais pas de façon significative ($p = 0,11$). Ensuite, dans le but de déterminer si l'augmentation de hnRNP A1^B et potentiellement de hnRNP A1 dans le cytoplasme avec siTDP-43 a un impact sur la distribution globale d'ARNm polyadénylés, une hybridation fluorescente *in situ* a été réalisée sur des cellules HeLa. Brièvement, les cellules ont d'abord subi une transfection transitoire avec un siContrôle et un siTDP-43. Elles ont ensuite été co-immuno marquées avec une sonde poly d(T) – Alexa 488 permettant d'indiquer par une fluorescence verte la distribution d'ARNm polyadénylés et avec TO-PRO-3 permettant de représenter par une fluorescence bleue le noyau. Une diminution robuste de l'expression de TDP-43 a été réalisée (Figure 16C). La sous-expression de TDP-43 n'a aucune influence significative ni sur la localisation nucléaire et cytoplasmique d'ARNm polyadénylés par rapport au siContrôle (Figure 16D), ni sur la taille du

noyau indiquant une distribution équivalente d'ARNm polyadénylés pour chacune des conditions (Figure 16E). Il est à noter que l'ajout dans cette expérience d'un contrôle positif aurait été judicieux. Effectivement, une diminution de l'expression de hnRNP A1 afin de démontrer un effet sur la distribution globale des ARNm polyadénylés aurait été appropriée. Ces résultats indiquent donc que la réduction de l'expression de TDP-43 augmente le niveau de la protéine hnRNP A1 et significativement hnRNP A1^B, mais n'a aucun effet sur la distribution globale d'ARNm polyadénylés.

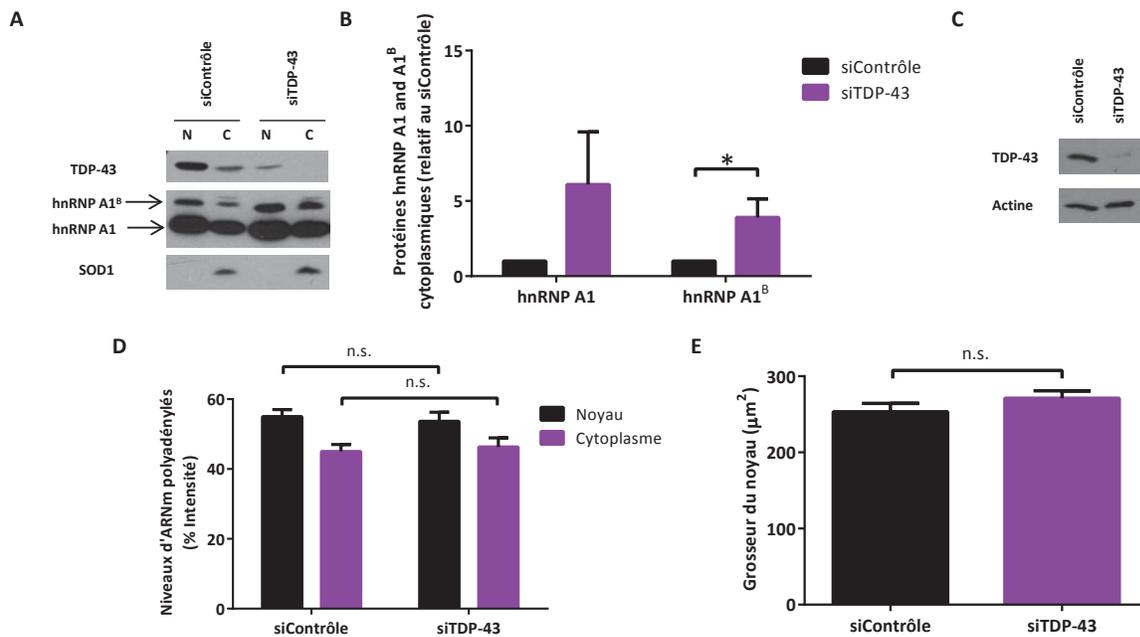


Figure 16 | La sous-expression de TDP-43 induit une augmentation protéique de hnRNP A1^B cytoplasmique qui n'affecte pas la distribution globale d'ARNm polyadénylés

Les cellules ont été traitées avec un ARN interférent ciblant TDP-43 ou un contrôle brouillé.

A) Immunoblot des fractions nucléaires et cytoplasmiques obtenues avec le kit NE-PER représentant TDP-43 pour vérifier l'efficacité de la transfection, hnRNP A1 et hnRNP A1^B ainsi que SOD1 comme contrôle de chargement cytoplasmique. **B)** Quantification par densitométrie de hnRNP A1 et A1^B cytoplasmiques. **C)** Immunoblot des lysats cellulaires totaux de TDP-43 pour évaluer l'efficacité de la transfection et l'actine sert de contrôle de chargement. **D)** Intensité des ARNm polyadénylés nucléaires et cytoplasmiques avec

siContrôle ou siTDP-43 en employant l'hybridation fluorescente *in situ*. **E**) Taille du noyau déterminé par Image J. La moyenne de trois expériences indépendantes \pm SEM est représentée en (**B, D, E**) avec $p \leq 0,05$ pour **B**).

2. L'assemblage des granules de stress est assuré par G3BP et une diminution directe de son expression par ARNi rend les cellules neuronales (SK-N-SH) plus vulnérables au stress oxydatif que les cellules non-neuronales (HeLa).

Plusieurs observations suggèrent que TDP-43 soit un des joueurs principaux dans la dynamique (formation, assemblage, désassemblage) des granules de stress. D'abord, TDP-43 colocalise avec des marqueurs de granules de stress (McDonald et al. 2011; Liu-Yesucevitz et al. 2010; Dewey et al. 2010; Colombrita et al. 2009). Ensuite, elle régule G3BP et TIA-1 qui s'auto-oligomérisent afin de former les granules de stress (McDonald et al. 2011). Aussi, TDP-43 est maintenant connue pour sa contribution dans l'assemblage des granules de stress via G3BP (Aulas et al. 2012). Elle influence également le désassemblage puisque les granules de stress se désassemblent beaucoup plus rapidement lorsque le stress est terminé dans les cellules où TDP-43 a été supprimé (McDonald et al. 2011).

Ainsi, la contribution de TDP-43 et G3BP dans la dynamique des granules de stress est importante. Afin de déterminer si ces protéines sont essentielles à la survie cellulaire en cas de stress, une expérience de la viabilité a été réalisée sur des cellules HeLa et SK-N-SH à la suite d'un stress oxydatif à l'arsénite de sodium. La diminution robuste de l'expression de TDP-43, G3BP ou FUS a été réalisée dans les deux types cellulaires (Figure 17A, C, d'Aulas et al. 2012). La vulnérabilité des cellules HeLa a été observée avec la diminution de l'expression de TDP-43 (Figure 17B, d'Aulas et al. 2012). Plus précisément, une augmentation de la mort cellulaire de 1,9 fois ($p = 0,01$) a été observée à 48 heures sans stress. Par contre, cet effet a été empiré avec l'ajout du stress dans le temps. Dans ce cas, une augmentation de 2,3 fois par rapport au siContrôle ($p = 0,01$) a été plutôt observée à 48 heures également. Aucun changement significatif n'a été observé quant à la diminution de l'expression de G3BP et FUS.

Les cellules SK-N-SH sont aussi vulnérables à la sous-expression de TDP-43 (Figure 17D, d'Aulas et al. 2012). Plus spécifiquement, une augmentation de la mort cellulaire de 2,3 fois ($p = 0,02$) par rapport au siContrôle 48 heures suivant le stress a été observée. Par contre, les cellules SK-N-SH sont aussi vulnérables à la réduction de l'expression de G3BP. Effectivement, avec une augmentation de la mort cellulaire de 2,6 fois par rapport au siContrôle ($p = 0,005$) a été observée. Aucun changement significatif concernant FUS n'a été observé avec ces cellules.

Par conséquent, les deux types cellulaires sont vulnérables à la diminution de l'expression de TDP-43, surtout en cas de stress. Par contre, il semble que les SK-N-SH soient beaucoup plus sensibles à la sous-expression de G3BP. Ces résultats suggèrent donc que les cellules neuronales soient plus vulnérables à la perturbation de l'assemblage des granules de stress que certains autres types cellulaires.

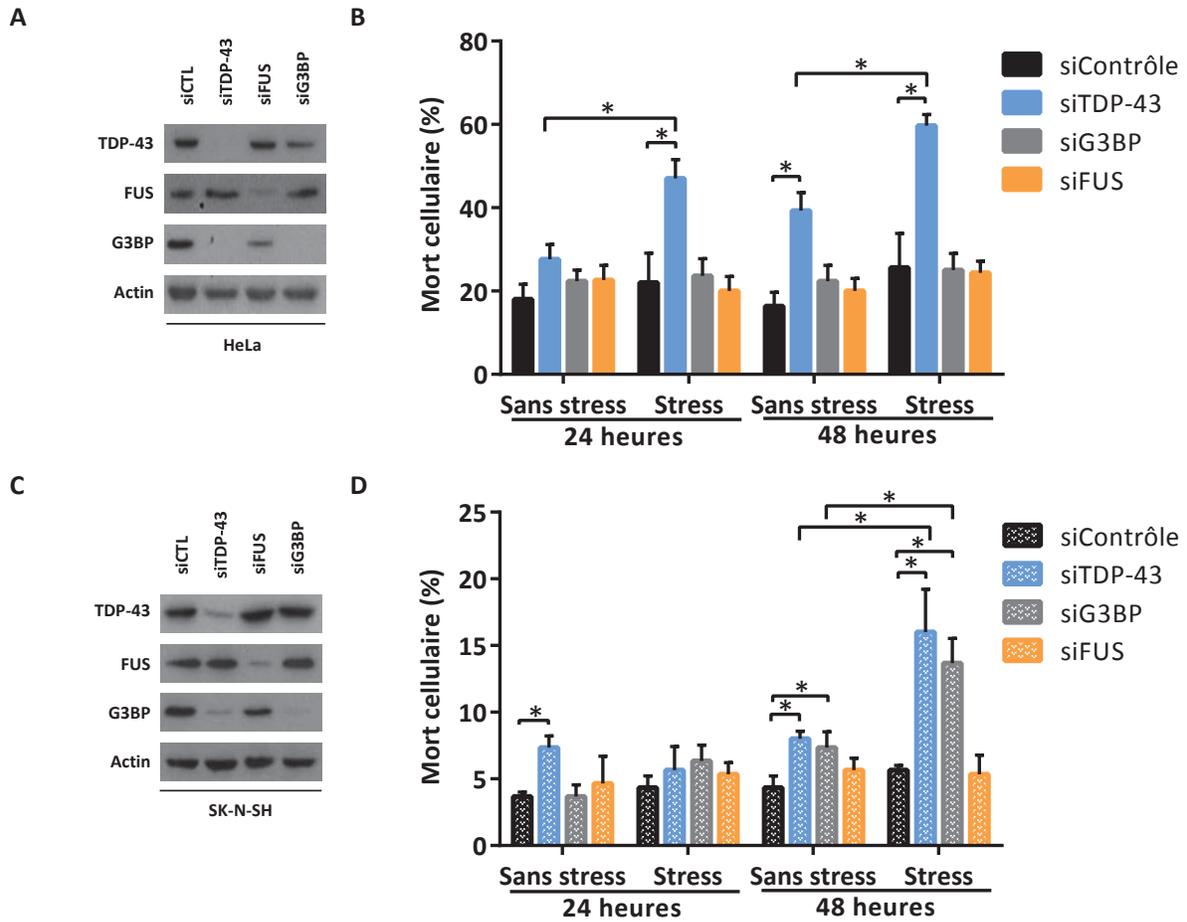


Figure 17 | Les cellules neuronales sont plus vulnérables à une perturbation au niveau de l'assemblage des granules de stress

Les cellules HeLa (**A, B**) et SK-N-SH (**C, D**) ont été transfectées pendant 48 heures avec les différents siRNAs indiqués et exposées à un stress oxydatif avec l'arsénite de sodium (0,5 mM, 30 min). (**A, C**) Immunoblots démontrant l'efficacité de la diminution de l'expression de TDP-43, G3BP et FUS. (**B, D**) Pourcentage de mort cellulaire évalué 24 ou 48 heures après le stress par exclusion au trypan bleu. La moyenne du pourcentage de mort cellulaire de trois expériences différentes \pm SEM est présentée.