



Université de Montréal

**Effet de TDP-43 sur l'épissage alternatif et l'agrégation  
d'hnRNP A1 dans la sclérose latérale amyotrophique**

Par Jade-Emmanuelle Deshaies

Département de neurosciences  
Faculté de médecine

Mémoire présentée en vue de l'obtention du grade de maître  
en Neurosciences

avril, 2017

© Jade-Emmanuelle Deshaies, 2017

## Résumé

Bien que les protéines de liaison à l'ARN soient un des axes principaux de recherche dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA), très peu est connue sur la manière dont ces protéines interagissent et/ou coordonnent le traitement et le métabolisme de l'ARN. Plusieurs protéines de liaison à l'ARN dont TDP-43 et hnRNP A1 sont mutées dans des cas familiaux de SLA et ont les retrouvées dans les inclusions cytoplasmiques. Dans le cas de TDP-43, la mauvaise localisation cytoplasmique est accompagnée d'une perte nucléaire. Notre hypothèse est que la mauvaise localisation de TDP-43 perturbe ces fonctions nucléaires. Nous rapportons ici que TDP-43 lie l'ARNm d'*HNRNPA1* et module l'épissage de l'ARN pré-messager. Plus précisément, la diminution nucléaire de TDP-43 entraîne une augmentation de l'inclusion de l'exon 7B augmentant le niveau protéique de l'isoforme le plus long, hnRNP A1B. Cet exon supplémentaire code pour 52 acides aminés et allongent le domaine semblable aux prions. À l'aide d'approches *in vitro* et *in vivo*, nous avons démontré que l'allongement de ce domaine confère une plus grande propension à la fibrillation et entraîne l'agrégation protéique. À ce jour, on en sait peu de chose sur la signification biologique de la protéine, de faible abondance, hnRNP A1B. Nos données indiquent que l'expression de cet isoforme, au lieu d'hnRNP A1, diminue la survie cellulaire. Enfin, nous avons observé une accumulation d'hnRNP A1B, chez l'humain, dans des cas de SLA avec une pathologie documentée de TDP-43. Nous proposons que la perte nucléaire de TDP-43 contribue à la vulnérabilité neuronale par des modifications dans l'épissage alternatif d'hnRNP A1 et de ses fonctions. Ce lien inattendu entre hnRNP A1 et TDP-43 démontre un nouveau mécanisme moléculaire dans la pathogenèse de la SLA.

**Mots-clés** : Sclérose latérale amyotrophique, TDP-43, hnRNP A1, épissage alternative, agrégation de protéines, domaine semblable au prion

## Abstract

RNA binding proteins such as TDP-43 and hnRNP A1 are mutated in ALS cases and are often mislocalized into cytoplasmic aggregates within motor neurons of affected patients. In the case of TDP-43, cytoplasmic inclusions, which are observed in most ALS cases and nearly half of FTD cases, are accompanied by a depletion of nuclear TDP-43. We report here that TDP-43 binds *HNRNPA1* pre-mRNA and modulates its splicing. Depletion of nuclear TDP-43 results in increased inclusion of a cassette exon in the *HNRNPA1* transcript and consequent elevated protein levels of an isoform containing an elongated prion-like domain, referred to as hnRNP A1B. Using both *in vivo* and *in vitro* approaches, we demonstrate that this isoform has greater fibrillization propensity, drives protein aggregation, and negatively impacts cell survival. Finally, accumulation of hnRNP A1B is observed in sporadic ALS patients with documented TDP-43 pathology. Our data indicate that TDP-43 mislocalization may contribute to neuronal vulnerability and loss via alterations in hnRNP A1 pre-mRNA splicing and function. Given that TDP-43 and hnRNP A1 each bind, and thus modulate, a third of the transcriptome, these data suggest a much broader disruption in RNA metabolism than previously considered.

**Keywords:** Amyotrophic lateral sclerosis, TDP-43, hnRNP A1, alternative splicing, protein aggregation, prion-like domain

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
Introduction.....	13
1. Sclérose latérale amyotrophique.....	13
1.1 Historique et classification.....	13
1.2 Aspect clinique.....	15
1.3 Neuropathologie.....	17
1.3.1 Le système moteur.....	17
1.4 Étiologie.....	20
1.4.3 Mécanismes moléculaires.....	22
2. Démence fronto-temporale.....	28
2.1 Caractérisation.....	28
2.1.1 Définition.....	28
2.1.2 Épidémiologie.....	29
2.1.3 Étiologie.....	29
2.2 Convergence avec la SLA.....	30
3. TAR DNA-binding protein 43.....	32
3.1 Structure.....	32
3.2 Fonctions.....	33
3.3 Implication dans les maladies neurodégénératives.....	37
3.4 Implication dans la SLA.....	38

3.5	Implication dans d'autres maladies.....	39
4.	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 .....	40
4.1	Structure.....	41
4.2	Épissage alternatif d' <i>hnRNPA1</i> .....	42
4.3	Fonctions.....	44
4.4	Implication dans la SLA .....	48
4.5	Implication dans les maladies neurodégénératives.....	49
4.6	Implication dans d'autres maladies.....	51
	Hypothèse et objectifs.....	52
	Matériels et méthodes .....	53
1.	Constructions .....	53
2.	Culture cellulaire et transfection.....	54
3.	Immuno-buvardage.....	54
4.	Immunofluorescence.....	56
5.	Immunoprécipitation à l'ARN .....	56
6.	PCRq et Stabilité de l'ARN .....	57
7.	Essai de luciférase.....	58
8.	Essai d'épissage <i>In vitro</i> .....	58
9.	Assemblage hexapeptidique et essai de microfiltration.....	59
10.	Viabilité cellulaire.....	60
11.	Anticorps anti-hnRNP A1B .....	60
12.	Matériels provenant de patients .....	60
13.	Analyse statistique .....	61
	Résultats.....	62
1.	La perte nucléaire de TDP-43 augmente le niveau protéique d'hnRNP A1 .....	62
2.	TDP-43 endogène lie et régule l'ARNm d'hnRNP A1 .....	65
3.	TDP-43 influence la sélection du site d'épissage de l'ARN pré-messager d' <i>HNRNPA1</i> .....	67
5.	L'élongation du domaine semblable au prion confère une plus grande propension à la fibrillation <i>in vitro</i> .....	70

6. HnRNP A1 génère des agrégats cytoplasmiques comparable à une mutation qui cause la SLA .....	73
7. L'expression d'hnRNP A1B est toxique.....	76
8. HnRNP A1B s'accumule dans le cytoplasme des motoneurones dans des cas sporadiques de la SLA .....	77
Discussion .....	81
1. TDP-43 régule la forme alternative d'hnRNP A1 .....	81
2. La propension à la fibrillation d'hnRNP A1B entraîne son agrégation.....	83
3. Toxicité d'hnRNP A1B et son impact sur la dégénérescence du système nerveux.....	84
4. Évidences de l'implication d'hnRNP A1B dans la SLA .....	86
5. Les conséquences de l'épissage alternatif d'hnRNP A1 sur le métabolisme de l'ARN	86
6. Les conséquences d'hnRNP A1B sur le réseau d'interaction protéine-protéine .....	89
7. Potentiel thérapeutique d'hnRNP A1B.....	89
Conclusion .....	91
Bibliographie.....	i

## Liste des figures

Figure 1. Neurons moteurs affectées dans la SLA et leurs cibles musculaires...	18
Figure 2. Chevauchements cliniques génétiques et pathologique entre la SLA et la FTD. .....	31
Figure 3. Schéma de la structure de TDP-43 et de ces mutations identifiées dans la SLA et dans la FTD. ....	33
Figure 4. Schéma des structures d'hnRNP A1. ....	41
Figure 5. Modèle de l'épissage alternatif d'hnRNP A1. ....	43
Figure 6. La perte nucléaire de TDP-43 augmente le niveau protéique d'hnRNP A1B64	
Figure 7. TDP-43 lie et régule l'ARNm d'hnRNP A1. ....	66
Figure 8. TDP-43 influence la sélection du site d'épissage du pré-ARM d' <i>HNRNPA1 in vitro</i> . ....	69
Figure 9. Analyse <i>in silico</i> de la propension à la fibrillation d'hnRNP A1 et d'hnRNP A1B. ....	72
Figure 10. Propension à la fibrillation des peptides dérivés d'hnRNP A1B. ....	73
Figure 11. L'inclusion de l'exon 7B favorise l'agrégation <i>in vivo</i> . ....	75
Figure 12. L'expression d'hnRNP A1B cause la mort cellulaire. ....	76
Figure 13. HnRNP A1B est exprimé dans le SNC et forme des agrégats cytoplasmiques dans les neurones de patients atteints de la SLA. ....	79
Figure 14. L'anticorps anti-hnRNP A1B est spécifique. ....	80



## Liste des sigles

ADN: acide désoxyribonucléique

ARE: *AU-rich sequence*

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ARNsh: *small hairpin* ARN

ATP : adénosine triphosphate

BMAA:  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine

CSPi: cellules souche pluripotente induite

EC: élément conservé

ESE: *exonic splicing enhancer*

FTD: *Fronto-temporal Dementia*

GS: granule de stress

hnRNP: *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein*

IBM: *inclusion body myositis*

IRES: *internal ribosomal entry site*

Kcal: kilocalorie

kDa: kilodalton

MA : maladie d'Alzheimer

ME : moelle épinière

miARN: micro-ARN

mol: mole

NF: neurofilament

OAS : oligonucléotides antisens indépendants de la RNase H

Phe: phénylalanine

Pré-ARNm: ARN pré-messenger

PrLD: *Prion-like domain*

RBP: *RNA-binding protein*

RNP: ribonucléoprotéine  
ROS: *reactive oxygen species*  
RRM: *RNA recognition motifs*  
SE: site d'épissage  
SEN: signal d'exportation nucléaire  
SLA : sclérose latérale amyotrophique  
SLAf: sclérose latérale amyotrophique familiale  
SLAs: sclérose latérale amyotrophique sporadique  
SLN: signal de localisation nucléaire  
SNC : système nerveux central  
SNP : système nerveux périphérique  
SPLL: séparation de phase liquide-liquide  
SR: sérine arginine  
ThT: thioflavine T  
TS : type sauvage  
Tyr : tyrosine  
UA : unité arbitraire  
UTR: *untranslated region*  
 $\alpha$  : alpha  
 $\beta$  : beta

## Liste des abréviations

a.a.: acides aminés

min.: minute

*À toute ma famille, merci de m'avoir aidé, supporté et encouragé toutes ces années.*

# Remerciements

Avant de commencer, je voudrais prendre le temps de remercier ceux et celles qui ont contribué de prêt ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche Christine Vande Velde. Merci de m'avoir donné la chance de faire ma maîtrise dans ton laboratoire, tu as toujours été là pour m'aider et me conseiller. Merci pour ta compréhension, ta disponibilité (même lorsque tu es en vacances) et tes encouragements.

Je voudrais aussi remercier les autres membres du laboratoire qui ont contribué de près ou de loin au projet. Laurie et Sarah vous êtes deux techniciennes extraordinaires, je n'aurais pu y arriver sans vos conseils et votre support. Laurie je te souhaite bonne chance dans tes futurs projets. Je vais m'ennuyer de nos conversations et nos dîners, j'espère continuer d'avoir de tes nouvelles du Panama. Sabrina, Yousra et Céline, merci pour votre aide et vos judicieux conseils. Sophie, merci d'avoir toujours été là pour m'écouter. Myriam et Hadjara, vous m'avez accompagnées tout long de ma maîtrise. Merci pour les moments passés à parler de science et d'autres choses moins sérieuses. Merci à Stéphanie et Quentin pour votre participation au projet. Vous êtes toutes de super scientifiques !

Merci aussi à nos collaborateurs, sans qui cette étude n'aurait pas été possible; le laboratoire du Dr. Chabot pour les expériences d'épissage, le laboratoire du Dr. Strong pour l'obtention et l'analyse des tissus *post-mortem*, le laboratoire du Dr. Nanci pour les expériences nécessitant un microscope à transmission électronique, le laboratoire du Dr. Soreq pour l'anticorps hnRNP A1B, le laboratoire du Dr. Arbour pour l'accès au lecteur de plaque multimode et le laboratoire du Dr. Prat et la plateforme d'imagerie cellulaire pour l'accès au microscope confocal.

Maman, papa, merci de m'avoir aidé, supporté et encouragé durant toute ces années et ce même dans les moments difficiles. Sans vous, mes études universitaires n'auraient pas été possibles. Je voudrais aussi remercier mes grands-parents et mes beaux-parents pour leur support.

Enfin, je voulais remercier mon conjoint et mes enfants. Alicia et Sabrina, vous êtes mes deux petits rayons de soleil. Kevin, je n'y serais jamais arrivé sans toi. Merci de m'avoir aidé à la maison, d'avoir su quand m'encourager, me faire rire ou me consoler. Tu es un père et un amoureux exceptionnel et j'ai hâte de commencer cette nouvelle étape de notre vie avec toi.

# Introduction

## 1. Sclérose latérale amyotrophique

### 1.1 Historique et classification

#### 1.1.1 Découverte et dénominations

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) a été décrite pour la première fois en 1874 par le neurologue et pathologiste français Jean-Martin Charcot (1825-1893) (1,2). De 1865 à 1869, il étudia deux cas d'atrophie musculaire progressive caractérisés par des lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière (ME). Dans le premier cas, des lésions dans la colonne latérale de la moelle épinière ont été observées. Ces lésions ont été la cause d'une paralysie progressive sans atrophie musculaire chez le patient. Dans le second cas, les lésions étaient situées dans la corne antérieure de la moelle épinière, ce patient souffrait lui aussi d'une paralysie progressive mais celle-ci était accompagnée d'une atrophie musculaire (3). Cette étude a permis de supporter l'hypothèse de Charcot, selon laquelle les composantes du système moteur de la moelle épinière faisaient partie de deux systèmes et que la localisation des lésions résultait en symptômes cliniques divers (1,3). Suite à ces observations, Charcot a décrit la SLA dans ces *Leçons du mardi à la Salpêtrière* (2). Le terme *sclérose* réfère au développement d'un tissu conjonctif dans la moelle épinière induit par la dégénérescence des neurones moteurs. Le terme *latéral* indique que ce sont les neurones situés dans la partie latérale de la moelle épinière qui sont affectés. Finalement le terme *amyotrophique* réfère à la perte de l'influx nerveux vers les muscles. La SLA est aussi connu sous le nom de la maladie de Charcot.

Durant le XX<sup>e</sup> siècle, plusieurs personnalités connues ont développé cette maladie neurodégénérative dont Stephen Hawking, Mao Zedong, David Niven, Dimitri Shostakovick et Lou Gehrig (4). Le cas de Lou Gehrig (1903-1941), un célèbre joueur de baseball américain, est sûrement un des cas qui a marqué le plus la population et a permis de faire connaître la maladie. C'est pour cette raison, qu'aux États-Unis et au Canada, la SLA est aussi connu sous le nom de la maladie de Lou Gehrig. Au Royaume-Unis, la SLA est aussi appelé maladie du motoneurone (*motor neuron disease*).

Au XXI<sup>e</sup> siècle, plus précisément en 2014, on voit la naissance de l'*Ice Bucket Challenge*. Ce défi consistait à faire une courte vidéo démontrant son support à ceux atteints de près ou de loin à la maladie, faire un don et à mettre au défi les membres de son entourage à faire de même. Le *Ice Bucket Challenge* a permis de ramasser des donations historiques pour la SLA qui ont servi à supporter la recherche fondamentale et clinique ainsi que de supporter les personnes atteintes et leurs familles tout en sensibilisant la population à cette pathologie. Depuis la SLA est aussi référé comme la maladie de l'*Ice Bucket Challenge*.

### **1.1.2 Épidémiologie**

La SLA est une maladie neurodégénérative qui se déclenche tardivement dans la vie des patients, c'est-à-dire que les premiers symptômes apparaissent généralement entre 50 et 65 ans (5). Seulement 5% des cas ont un développement précoce de la SLA qui a lieu avant 30 ans, dans ce cas il s'agit d'une forme juvénile de la SLA. La SLA a une incidence de 2 personnes sur 100 000 et affecte un nombre plus élevé d'hommes que de femmes (5). L'incidence augmente à 10 personnes sur 100 000 dans la population de plus de 80 ans (6). Suite au



diagnostic, l'espérance de vie est de 3 à 5 ans (5). La SLA affecte tous les groupes ethniques et socio-économiques, il y a cependant certaines régions géographiques où la prévalence est plus élevée, dont certaines parties du Japon, la péninsule de Kii, Guam et le Sud-Ouest de la Nouvelle-Guinée. Il n'y a toujours pas d'évidences concrètes qui pourraient expliquer ce taux élevé dans ces régions, mais il est possible que ce soit dû à des causes environnementales ou génétiques (6,7). Actuellement, il y a entre 2 500 et 3 000 Canadiens qui vivent avec la SLA. La SLA est la maladie neurologique qui cause le plus de décès au Canada (5).

## **1.2 Aspect clinique**

### **1.2.1 Signes et symptômes**

Les premiers signes du développement de la pathologie de la SLA chez les individus sont détectés lors de l'exécution des tâches courantes(8). Par exemple, le malade peut expérimenter des perturbations ou faiblesses dans ces bras ou ces jambes durant des tâches motrices, par exemple, en tournant des clés dans une serrure, en ouvrant un pot ou en marchant. Les patients ont aussi une plus grande tendance à chuter (8). Si l'individu est atteint de la forme bulbaire de la maladie, les premiers signes sont situés majoritairement au niveau de la bouche. L'individu pourrait avoir des troubles de l'élocution, de la distorsion vocale et des difficultés pour manger ou avaler (8).

Avec le développement de la maladie et la dégénération progressive des neurones moteurs, il y aura aussi une progression des symptômes. Les patients qui souffrent de la forme spinale ont tout d'abord des faiblesses musculaires et des fasciculations, c'est-à-dire des

contractions musculaires spontanées et anormales (8,7,9). Ceux atteints de la forme bulbaire vont d'abord développer de la dysphagie, trouble de déglutition, et de la dysarthrie, un trouble de l'articulation de la parole. Au même moment ou dans les deux premières années, ils développeront aussi des troubles liés aux membres(8,7,9). Dans tous les cas, ces symptômes seront suivis d'une paralysie progressive. Le patient va succomber à la maladie dû à une détresse cardio-respiratoire (8,7,9).

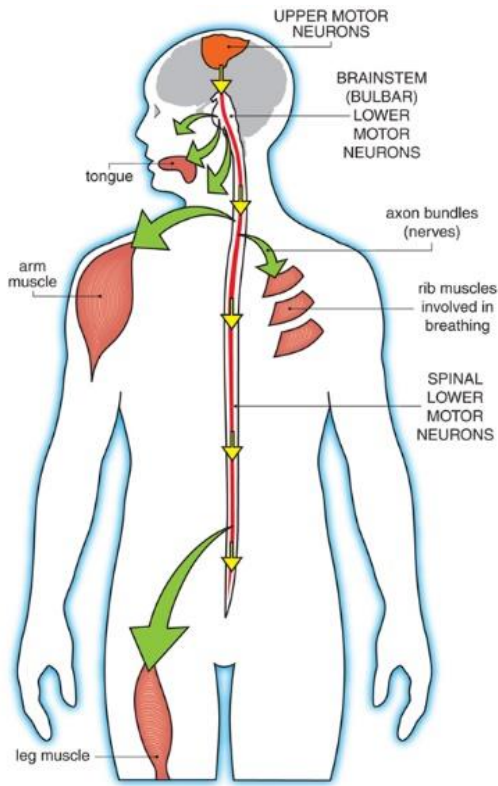
### **1.2.2 Traitement**

La SLA est une maladie mortelle et incurable. Malgré les nombreux efforts de la communauté médicale et scientifique à trouver un moyen de ralentir ou de guérir la maladie, il n'y a toujours pas de traitement efficace ou de remède. Jusqu'à tout récemment, le seul médicament approuvé pour le traitement de la SLA est le riluzole. Le riluzole retarde légèrement le besoin d'assistance pour les fonctions respiratoires. Même s'il ne prolonge l'espérance de vie que de 2 ou 3 mois, le riluzole peut aider à améliorer la qualité de vie (10,11). Cette année, l'administration des aliments et des médicaments des États-Unis à donner son autorisation pour l'edaravone (aussi connu sous le nom de radicava et radicut) (12). Ce médicament est déjà approuvé au Japon et en Corée du Sud depuis 2006 et est utilisé dans les cas d'accidents cardiovasculaires. L'étude clinique en cours démontrerait que l'edaravone ralentirait la progression de la maladie(12).

## 1.3 Neuropathologie

### 1.3.1 Le système moteur

La motricité volontaire est engendrée par la contraction des muscles squelettiques, déclenchée par les motoneurones alpha ( $\alpha$ ) (13). Ensemble, les fibres musculaires et les motoneurones  $\alpha$  forment l'unité motrice (13). Des informations provenant d'une multitude de sources parviennent au cortex moteur primaire, l'aire 4 de Brodmann, qui planifie et commande les mouvements volontaires. Les neurones pyramidaux géants de la couche pyramidale, les cellules de Betz, projettent leurs axones sur les motoneurones et les interneurones de la moelle épinière, formant le faisceau cortico-spinal (13). On retrouve les corps cellulaires des motoneurones  $\alpha$  dans les noyaux moteurs des nerfs crâniens du tronc cérébral et dans la corne ventrale de la moelle épinière. Les axones provenant des noyaux moteurs des nerfs crâniens passent par les fibres du tronc cérébrales pour rejoindre les muscles (13). Il n'y a pas d'évidences que les nerfs crâniens soient affectés dans la SLA (14). Les axones provenant de la corne ventrale empruntent les racines ventrales et les nerfs périphériques pour se rendre aux muscles squelettiques affectés dans la SLA (Fig.1) (15). Les axones de ces motoneurones se ramifient afin de créer plusieurs synapses avec des fibres musculaires appartenant à un seul muscle. La dissémination des synapses assure une meilleure répartition de la force contractile. Les neurones moteurs  $\alpha$  qui innervent le même muscle se rassemblent en colonnes sur des segments parallèles à l'axe longitudinal de la moelle épinière (15). La dénervation du muscle est un des événements précoces dans le développement de la maladie (16). Puisqu'il y a une correspondance entre la localisation de ces colonnes et la topographie de la musculature ce qui permet de suivre la progression de la dégénérescence (13).



**Figure 1. Neurones moteurs affectés dans la SLA et leurs cibles musculaires.** Inspirée du site de l'organisation de la dystrophie musculaire (15). Les neurones moteurs du système nerveux central (SNC) envoient des signaux aux neurones du système nerveux périphériques (SNP) qui envoient des signaux aux muscles. Il y a perte des neurones moteurs  $\alpha$  du système nerveux central et périphérique dans la SLA.

On ne sait toujours pas pourquoi la SLA affecte seulement les neurones moteurs  $\alpha$ , cependant plusieurs facteurs intrinsèques peuvent influencer leurs vulnérabilités (17–19). La grande taille des neurones moteurs, la faible expression du récepteur de glutamate 2 (GluR2) et de l'ostéopontine, leur faible capacité à tamponner le  $\text{Ca}^{2+}$ , la forte expression du récepteur 4 de l'éphrine de type A (EPHA4) et de la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP9) sont tous des déterminants de la vulnérabilité proposée (17–19).

### 1.3.2 Observations *post-mortem*

Plusieurs changements microscopiques ont été observés dans les tissus *post-mortem* de patients atteints de la SLA. On peut observer la dégénérescence des neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière et des cellules du cortex moteur primaire. De plus, il y a une perte d'axones myélinisés dans les colonnes antérieures et latérales de la moelle épinière (ME) (20). La SLA est aussi caractérisée par la présence de corps d'inclusions. La majorité des inclusions sont ubiquitinées et ont déjà été observées dans les neurones des lobes frontal et temporal, dans l'hippocampe et dans le striatum. La composition exacte de ces inclusions n'est pas connue à ce jour, cependant plusieurs protéines impliquées dans la pathogénèse de la SLA s'y retrouve. TDP-43 (*TAR DNA-binding protein 43*) (97%), FUS (*Fused in sarcoma*) (<1%) et SOD1 (*Cu/Zn Superoxide dismutase*) (2%) sont les protéines principalement retrouvées dans la majorité des inclusions ubiquitinées (20–22). Une autre types d'inclusion, les inclusions de congglomérats hyalins, sont formé par l'accumulation des protéines des filaments intermédiaires, principalement des sous-unités des neurofilaments hyperphosphorylées et de la périphérine (20). D'autres protéines sont aussi retrouvées sous formes d'agrégats cytoplasmiques dont hnRNP A1 (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1*), les dipeptides provenant de l'expansion des répétitions de C9orf72 (*open reading frame 72 on chromosome 9*) et p62 (*Sequestosome-1*) (20,23–25).

## 1.4 Étiologie

L'étiologie de la SLA n'est pas bien connue. Dans les faits, 10% des cas de SLA sont hérités génétiquement (SLA familiale, SLAf) tandis que 90% n'ont pas de cause connue cas (SLA sporadique SLAs) (26). De plus en plus de gènes sont découverts sous forme mutée dans la SLAf et la SLAs. Pour le moment, on connaît environ 60% des gènes associés à la SLAf (26,27,27). Des facteurs environnementaux et épigénétiques sont aussi considérés dans les causes ou les facteurs de risques associés à la SLA (28).

### 1.4.1 Causes génétiques

Les mutations dans les gènes *C9ORF72* (*open reading frame 72 on chromosome 9*; 25-40% SLAf, 7% SLAs), *SOD1* (*Cu/Zn superoxide dismutase* 10-20% SLAf, 1-2% SLAs), *TARDBP* (*TAR DNA Binding Protein 43*; 4% SLAf, 1% SLAs) et (*FUS/TLS fused in sarcoma / translocated in sarcoma*; 5% SLAf, 1% SLAs) sont les causes génétiques les plus fréquentes dans la SLA (21,27). Une récente mutation dans *NEK1* (*NIMA Related Kinase 1*) a été découverte en 2016 et serait responsable de 3% des cas de SLA (29). Plusieurs autres gènes sont aussi mutés dans des cas plus rares de SLA. On retrouve parmi ceux-ci; *UBQLN2* (*ubiquilin-2*), *VCP* (*valosin-containing protein*), *PFN1* (*profilin-1*), *ALS2* (*alsin*), *SETX* (*senataxin*), *ANG* (*angiogenin*), *MATR3* (*matrin-3*), *CHCHD10* (*coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10*), *TUBA4A* (*tubulin, alpha 4A*), *TBK1* (*TANK-binding kinase 1*), *OPTN* (*optineurin*), *hnRNPA1* (*heterogeneous ribonucleoprotein A1*) et *hnRNPA2/B1* (*heterogeneous ribonucleoprotein A2/B1*) (21,23,27,30–33). L'hérédité autosomale dominante est le mode de transmission héréditaire le plus fréquent dans SLAf, cependant certaines mutations se

transmettent aussi de manière autosomale récessive ou de manière dominante lié au chromosome X (27).

#### **1.4.2 Autres facteurs de risques**

Des facteurs environnementaux variés et hétérogènes ont été considérés comme étant des déclencheurs de la pathologie ou comme jouant un rôle dans le développement de la SLA y compris l'exposition aux métaux lourds, aux pesticides, à la  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine (BMAA), et la participation à l'activité physique intense (28). L'exposition aux métaux lourds dont le plomb, le mercure, le cadmium, le fer et le sélénium, est considérée comme un facteur de risques dans la SLA. Cependant, ces études sont contradictoires puisque certaines ont trouvé une corrélation entre l'exposition aux métaux et le développement de la SLA tandis que d'autres n'ont pas trouvé de corrélation(28). L'exposition au sélénium serait le métal lourds présentant le facteur de risque le plus important (28). La BMAA est un acide aminé (a.a.) produit par les cyanobactéries qui pourrait avoir un rôle dans la neurodégénérescence puisqu'elle est neurotoxique (28). L'exposition aux pesticides, particulièrement aux organophosphorés, peut induire des dommages au système nerveux dû à leur capacité d'inhibition de l'acétylcholinestérase. De plus les pesticides peuvent induire un stress mitochondrial ou oxydatif (28). On a préposé que l'activité physique intense, comme chez les joueurs professionnels de football et de soccer, est aussi une cause proposée comme facteur de risque de la SLA (28). Le stress causé par l'activité physique augmenterait la production de ROS (*reactive oxygen species*) créant des dommages à l'ADN et à l'ARN surtout si l'activité est combiné à certains suppléments alimentaire ou certaines drogues (28).

Des facteurs épigénétiques peuvent aussi influencer l'expression de certains gènes et peut être des modificateurs de la SLA (27). Un de ces facteurs est la méthylation de l'ADN. En effet, les patrons de méthylation de l'ADN génomique sont modifiés chez les patients atteints de la SLA (27). De plus, des études récentes démontrent que l'expansion des répétitions dans C9ORF72 modifierait la méthylation des histones. Cette modification épigénétique réduirait l'expression de l'allèle mutante (27).

### **1.4.3 Mécanismes moléculaires**

Plusieurs mécanismes moléculaires ont été proposés afin qu'expliquer la SLA. Les multiples altérations dans les fonctions cellulaires rendent plus complexe la compréhension de la pathogénèse de la SLA. On ne sait toujours pas si les altérations observées sont une cause ou une conséquence de la pathologie. Voici un bref survol de ces mécanismes.

#### **1.4.3.1 Déficience de l'homéostasie des protéique**

L'accumulation de protéines ubiquitinées est une caractéristique importante de la SLA. Cette accumulation suggère un dysfonctionnement de la protéostasie (17). L'homéostasie des protéique est la capacité des cellules à générer, à plier et à dégrader correctement les protéines. Les mutations génétiques, le mauvais repliement et la mauvaise localisation des protéines peuvent créer des perturbations importantes dans la protéostasie (17). Ces perturbations se reflètent dans l'agrégation des protéines, dans l'augmentation du stress du réticulum endoplasmique (RE), dans l'insuffisance du protéasome à dégrader les protéines dénaturées ou



obsolètes, dans les problèmes de clairance par les autophagosomes et dans des changements dans la dynamique des granules de stress (17,34–37).

Le développement progressif temporel et spatial de la SLA a permis d'émettre l'hypothèse que les protéines avec un mauvais repliement, dont SOD1 et TDP-43, pourraient propager la maladie le long de l'axe neuronal. Cette propagation pourrait être similaire au mécanisme utilisé par les protéines prions (17,38).

#### **1.4.3.2 Perturbations du métabolisme de l'ARN**

En plus des nombreuses mutations documentées dans les protéines qui lient l'ARN, les *RNA-binding proteins*, RBPs), plusieurs perturbations dans le métabolisme de l'ARN ont été rapportées dans la SLA (17,37,39). Les RBPs peuvent perdre ou gagner des fonctions cellulaires si elles sont mutées, si elles s'agrègent dans le cytoplasme ou si elles se lient à des ARNs contenant des répétitions de nucléotides, comme à l'expansion des répétitions de nucléotides dans la pathologie de *C9ORF72* (17,37,39). La modification des fonctions peut avoir des répercussions sur plusieurs aspects du métabolisme de l'ARN. En effet, il y a des évidences d'altération de la transcription puisque certaines protéines sont régulées à la hausse ou à la baisse dans les conditions pathologiques (17,37,39). Des défauts dans l'épissage alternatif, incluant dans des gènes impliqués dans la fonction et la transmission neuronale ont aussi été détectés (17,21,40). De plus, il y a aussi des interférences dans la génération et l'extinction des micro-ARNs (miARN). Les miARNs sont impliqués dans la régulation de la transcription. Ils répriment la transcription et régulent la dégradation de plusieurs ARN messager (ARNm) (17).

### **1.4.3.3 Défaut dans le transport nucléo-cytoplasmique**

Il y a des évidences de la détérioration du transport nucléo-cytoplasmique dans le vieillissement normal, cette détérioration serait exacerbée dans la SLA(41). Les pores nucléaires ont un rôle important dans le transport nucléo-cytoplasmique et leur distribution anormale dans la SLA a été démontrée dans les analyses de tissus *post-mortem* de patient ALS C9orf72 (42). Il y a aussi des changements dans la distribution spatiotemporelle des nucléoporines chez les patients et les modèles transgénique SOD1 (42). Il a été proposé que les protéines agrégées dans le cytoplasme puissent séquestrer les importines et des protéines des portes nucléaires. La réduction dans l'import des protéines pourraient avoir comme conséquences la diminution de l'exportation des ARNm (43). Le dysfonctionnement du transport nucléo-cytoplasmique pourrait être le lien entre le gain et la perte de fonction des RBPs (17,24,41).

### **1.4.3.4 Défauts du transport du cytosquelette et de l'axone**

Les neurofilaments (NF) sont des filaments intermédiaires retrouvés dans les neurones et sont une composante majeure du cytosquelette. Les NF ont un rôle important dans le support de l'axone et régule son diamètre (44). Dans la SLA, une augmentation des chaînes légères et des chaînes lourdes phosphorylées perturbe le cytosquelette et est présente dès l'apparition des premiers symptômes (17,45). Les problèmes de liaison des protéines cargos avec les unités motrices des microtubules ainsi que la déstabilisation de la tubuline et du cytosquelette entraînent des défauts dans le transport axonal et éventuellement la rétraction de l'axone (17,45). Le transport rétrograde est aussi impliqué dans le transport des facteurs trophiques vers le corps

cellulaire ainsi que dans l'élimination des protéines agrégés ou avec un mauvais repliement (17,45).

#### **1.4.3.5 Mécanisme cellulaire non-autonome**

La SLA est une maladie avec des mécanismes cellulaires non-autonome (*non-cell autonomous*), c'est-à-dire que les cellules gliales, voisines des neurones, ont un rôle dans l'apparition et la progression de la maladie (46,47). La présence de ce type de mécanisme dans la SLA a été démontrée dans des souris transgéniques exprimant la SOD1 mutante dans différents types cellulaires. Ces expériences ont démontré que l'expression de la SOD1 mutante dans les neurones moteurs influence le moment d'apparition des premiers symptômes et influence la progression de la maladie lorsqu'exprimée dans les astrocytes et les microglies (46,47). La diminution ou la perte de la fonction normale des astrocytes et / ou la sécrétion de cytokines neurotoxiques contribuerait à la pathogénèse de la SLA (46,47). L'activation des microglies est nécessaire à la restauration des tissus endommagés lors de stress cellulaire (47). Cependant, le stress chronique, qui est observé dans la SLA, entraîne l'activation constitutive des astrocytes. Cette activation constitutive peut être toxique pour les neurones moteurs, par exemple par la privation de facteurs neurotrophiques dans la moelle épinière (47). Les oligodendrocytes sont les cellules gliales responsables de la formation de la gaine de myéline qui entoure les axones du SNC. La gaine de myéline permet d'augmenter la fréquence et la vitesse de propagation du système nerveux. Malgré le fait que le nombre d'oligodendrocytes restent constant durant la progression de la maladie, il y a des évidences d'un dysfonctionnement de leurs fonctions. Des études démontrent que, dans la SLA, les oligodendrocytes nouvellement

généérés pour remplacer les mourants ne seraient pas aptes à myéliniser et à fournir un support trophique aux axones (17,48).

#### **1.4.3.6 Troubles neuro-inflammatoires**

Les troubles neuro-inflammatoires est un élément important de la SLA, en effet la protéine NF-κB (*Nuclear factor-Kappa B*) est réguler à la hausse chez les patients et il y activation des cellules gliales, des astrocytes et des microglies (17,49). Les cellules T régulatrices (*regulatory T cells*) infiltrent la moelle épinière aux premiers stades du développement de la SLA et ont tout d'abord un effet protecteur, ralentissant la progression de la maladie (17,49). Toutefois, cet effet est perdu dans les stades plus avancés suite à une diminution des facteurs neuroprotecteurs qui inhibent la mort cellulaire et une augmentation des facteurs neurotoxiques qui favorisent la mort cellulaire (17).

#### **1.4.3.7 Dysfonctionnement mitochondriale**

Des modifications dans la morphologie, la fragmentation et l'expression des protéines de fission et de fusion des mitochondries peuvent avoir des effets néfastes sur la fonction mitochondriales et ont été décrit dans la SLA sporadique et familiale (17,50). Il y a plusieurs évidences aussi de modifications dans l'activité de la chaîne de transport des électrons, dans la production d'ATP, dans l'homéostasie du calcium et dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species, ROS*) (17,50). Des études en cultures cellulaires et dans des animaux transgéniques ont aussi mis en évidence que des protéines, dont SOD1, peuvent

s'accumuler sur la membrane mitochondriale ce qui altère leurs morphologies, le transport mitochondrial et entraîne une accumulation anormale des mitochondries le long de l'axone (51). Il a été aussi démontré par notre groupe que la SOD1 mutée s'associe avec les membranes mitochondriales dans un modèle de rongeur de la SLA. Cette association entraîne des dommages mitochondriaux incluant une augmentation du volume mitochondrial et une augmentation dans la production des ROS (51). Ensemble ces données suggèrent que la fonction mitochondriale a un impact important dans la pathologie de la SLA.

#### **1.4.3.8 Excitotoxicité**

La balance entre les neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs est importante pour réguler l'activité du SNC. Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur qui peut créer une excitotoxicité s'il est trop abondant ou s'il n'est pas rapidement éliminé de la fente synaptique. La diminution de la récupération du glutamate augmente l'activation des récepteurs AMPA et NMDA créant une augmentation du  $Ca^{2+}$ , et des ROS au détriment des neurones post-synaptiques (19). Une augmentation du glutamate plasmatique, une diminution de la récupération du glutamate présent dans la fente synaptique et une diminution de l'expression du transporteur de glutamate EAAT2 (*Excitatory amino acid transporter 2*) ont été trouvés chez les patients atteints de la SLA (52). Ces données suggèrent l'implication de l'excitotoxicité dans la pathologie de la SLA.

### **1.4.3.9 Défauts dans la réparation de l'ADN**

Le stress oxydatif et d'autres facteurs peuvent induire des bris dans l'ADN simple brin et double brins nucléaire et mitochondrial. La réponse aux dommages à l'ADN est importante pour réparer ces bris et éviter les dommages (17,53). Il a été démontré que la protéine FUS est impliquée dans cette réponse par ses interactions avec HDAC1 (*histone deacetylase 1*) et son recrutement aux sites de fractures de l'ADN facilitant la signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN (17,53).

## **2. Démence fronto-temporale**

### **2.1 Caractérisation**

#### **2.1.1 Définition**

La démence fronto-temporale (*Frontotemporal dementia*, FTD) est la cause la deuxième cause de démence la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle a été décrite pour la première fois en 1892, chez un patient souffrant de troubles de langage particulier, par le docteur Arnold Pick (54,55). Elle est caractérisée par des troubles du langage et de la parole, des troubles de la fonction motrice ainsi que des changements de comportement et de personnalité (54,56). Les personnes atteintes de la FTD vont succomber à des complications de la maladie dont les infections cutanées, urinaires ou pulmonaires(54,56). Il n'y a pas de traitement ou de remède à la FTD. Une médication peut être prescrite afin d'améliorer la qualité de vie. Ces médicaments visent surtout les symptômes d'agitation, d'irritabilité et de dépression(54).

La pathologie associée à la maladie est la dégénérescence lobaire fronto-temporale (*Frontotemporal lobar degeneration, FTLD*) (54). Les lobes pariétal et occipital ne sont pas affectés. La majorité des syndromes de FTLD sont caractérisés par la présence d'inclusion positive pour la protéine TAU ou pour la protéine TDP-43 (54,57).

### **2.1.2 Épidémiologie**

La FTD est une maladie neurodégénérative qui se déclenche généralement avant 65 ans(54,55,58). Cependant, la maladie se développe aussi après 65 ans dans 20-25% des cas. La FTD a une incidence de 2.7-4.1 personnes sur 100 et affecte un nombre égal d'hommes et de femmes(54,55,58). Au moment du diagnostic, l'espérance de vie est de 3 à 4 ans, cependant on estime que l'espérance de vie est de 6 à 11 ans suivant l'apparition des premiers symptômes (54,55,58).

### **2.1.3 Étiologie**

Les causes de la FTD sont majoritairement génétiques et jusqu'à 50% des patients FTD ont des antécédents familiaux. L'expansion de *C9ORF72* est la principale cause de la FTD (21,31,54). Des mutations dans les gènes codant pour protéines MAPT (*microtubule-associated protein tau*) et PGRN (*progranulin*) sont responsable, respectivement, pour 10% et 20% des cas. D'autres mutations plus rares sont aussi associées à la maladie dont dans TDP, FUS/TLS, UBQLN2, VCP, OPTN (*optineurin*), CHMP2B (*charged multivesicular body protein 2b*),

VAPB (*VAMP Associated Protein B*) et SQSTM1 (*sequestosome-1*) (21,31,54). Pour le moment, on ne connaît pas d'autres facteurs de risques que les antécédents familiaux.

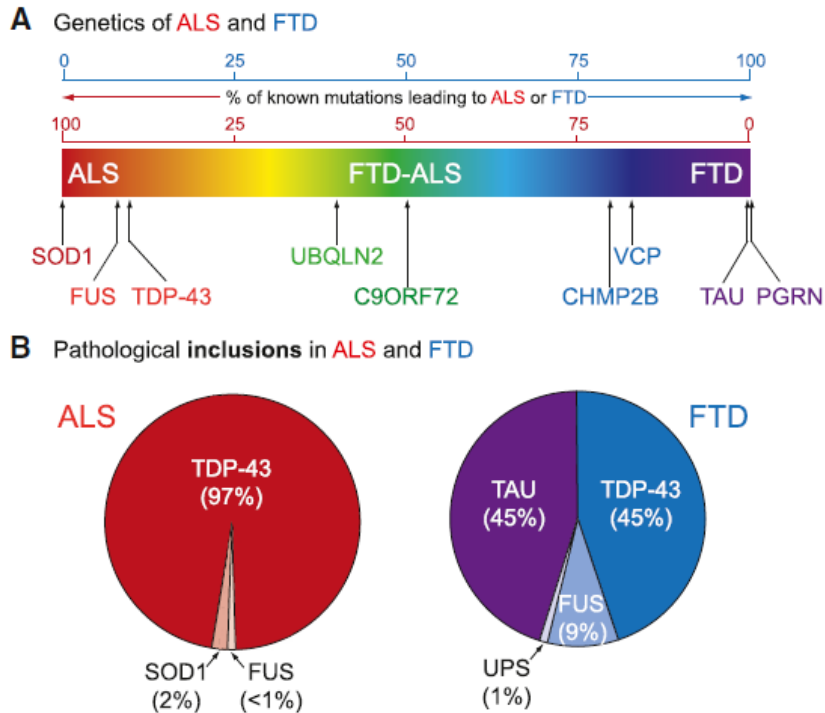
## 2.2 Convergence avec la SLA

La SLA peut se présenter comme un pur syndrome moteur mais peut aussi se présenter avec un dysfonctionnement fronto-temporale, qui peut inclure la FTD. La similarité des dysfonctionnements fronto-temporaux présents dans la SLA et dans la FTD suggèrent l'existence d'un continuum de la maladie (21). En effet, on retrouve dans la majorité des cas de SLA (97%) et de FTD (45%) des inclusions cytoplasmiques composé de TDP-43 ubiquitinées. La protéine FUS se retrouve aussi sous forme d'agrégats dans la SLA (< 1%) et dans la FTD (9%) (21). De plus, des mutations de TDP-43 et de FUS/TLS sont aussi responsable de ces deux maladies (Fig.2). Ces observations ont mené à l'hypothèse que la mauvaise régulation et l'altération des fonctions des protéines qui lient l'ARN seraient un mécanisme central dans la SLA et la FTD (21).

L'identification de l'expansion intronique du gène *C9ORF72* (*chromosome 9 open reading frame 72*) comme étant la principale cause génétique de la SLA (20-50%), la SLAs (5-20%), la SLA-FTD familiale (80%), la FTD (10-30%) est une autre évidence moléculaire (21). De plus, plusieurs autres protéines impliquées dans la dégradation des protéines sont mutées. On compte parmi ces gènes : *UBQLN2* (*ubiquilin-2*), *SQSTM1* (*sequestosome 1*), *OPTN* (*optineurin*), *VCP* (*vasolin-containing protéine*), *CHMP2B* (*charge multivesicular body protein 2B*), *VAMP* (*vesicle-associated membrane protein*), *VAPB* (*synatobrevin-associated protein B*) et *FIG4* (*FIG4 homolog, SAC1 lipid phosphatase domain containing protein*) (Fig.2).



L'homéostasie des protéines est aussi un mécanisme moléculaire altéré dans la SLA et la FTD (21).



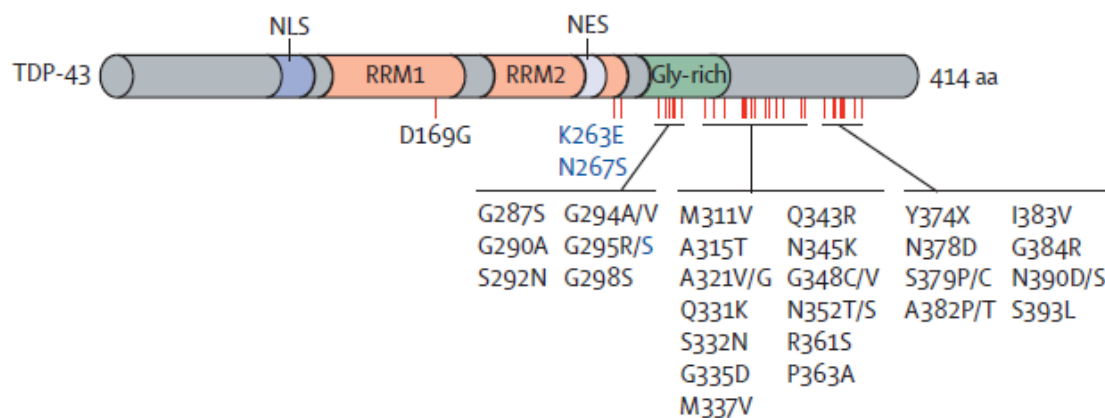
**Figure 2. Chevauchements cliniques génétiques et pathologique entre la SLA et la FTD.** Inspirée de Ling et al. 2013 (21). (A) La SLA et la FTD représente un continuum de neurodégénérescence chacun se présentant comme les deux extrémités du spectre du chevauchement des symptômes cliniques (SLA en rouge et FTD en violet). Les principales causes génétiques connues sont tracées selon le pourcentage des mutations qui donnent lieu à la SLA et/ou la FTD. (B) Principales inclusions pathologiques retrouvées dans la SLA et la FTD. Les inclusions de TDP-43 et FUS reflètent le chevauchement pathologique.

### 3. TAR DNA-binding protein 43

Le gène *TAR DNA-binding protein (TARDBP)* code pour la protéine (TDP-43) et est situé sur le chromosome 1p36.2 (59,60). Cette protéine de 414 acides aminés (43 kDa), exprimée de manière ubiquitaire fait partie de la famille des *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNPs) (59,60). En plus de protéine de pleine longueur, deux isoformes de 35 kDa et de 25 kDa ont été identifiés dans le système nerveux central (SNC) de l'humain (61,62). On retrouve TDP-43 principalement dans le noyau même si elle peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme(59,60).

#### 3.1 Structure

TDP-43 possède en N-terminale, deux domaines de reconnaissance de l'ARN (*RNA recognition motifs*, RRM), une séquence de localisation nucléaire (SLN), une séquence de signal d'exportation nucléaire (SEN) (59,60). Les SLN et les SEN sont nécessaires au transport nucléocytoplasmique (59,60). La fonction de la partie N-terminale de TDP-43 n'est toujours pas complètement caractérisée, mais des études mettent en évidence son importance pour la fonction d'épissage et dans sa capacité de s'assembler en homodimères(59,60). La partie C-terminal est composée d'un domaine riche en glycine aussi appelé domaine semblable au prion (*prion-like domain*, PrLD), ce domaine est responsable des interactions protéine-protéine (Fig.3) (59,60,63).



**Figure 3. Schéma de la structure de TDP-43 et de ces mutations identifiées dans la SLA et dans la FTD.** Inspirée de Mackenzie et al. 2010 (60) Représentation schématique de la structure de TDP-43 ainsi que des mutations identifiées causant la SLA (en noir) et la FTD (en bleu)

## 3.2 Fonctions

TDP-43 peut effectuer plusieurs fonctions dans les cellules, principalement dans le métabolisme de l'ARN. Il a été démontré que TDP-43 peut se lier à environ 30% du transcriptome (64). Plus précisément, TDP-43 possède des fonctions dans la transcription, l'épissage, la stabilité des ARNm, le transport des ARN, la traduction, la réponse au stress et dans le traitement des miARN (21,59,65).

### 3.2.1 Transcription

TDP-43 a un rôle dans la régulation de la transcription du génome (21,66–69). En effet, nous savons que TDP-43 est un répresseur de la transcription. Il a été démontré que TDP-43

réprime la transcription de *HIV-1* (*human immunodeficiency virus type 1*), de *SP-10* (*serine protéase 10*) et de *Cdk6* (*cyclin-dependent kinase 6*). TDP-43 pourrait aussi s'associer à d'autres facteurs de transcription, par exemple MECP2 (*methyl CpG-binding protein 2*) un autre répresseur de la transcription (21,66,68,69).

### 3.2.2 Épissage

Il a été démontré précédemment qu'un appauvrissement de TDP-43 pouvait entraîner l'épissage alternatif de plus de 230 gènes, plusieurs d'entre eux sont impliqués dans le développement neuronal et dans les maladies neurologiques(64,67,70). L'ARN pré-messager (pré-ARNm) cible de TDP-43 le plus connu est celui de CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (64,67,70). En effet, TDP-43 se lie à une séquence intronique riche en UG du pré-ARNm de CFTR et favorise l'exclusion de l'exon 9. TDP-43 jouerait aussi un rôle dans l'épissage alternatif des transcrits de l'*APOA2* (*apolipoprotein A-II*), *SMN* (*survival motor neuron*) et *SORT1* (*Sortilin-1*) (71,72).

### 3.2.3 Stabilité des ARN

Deux rôles ont été déterminés pour TDP-43 dans la stabilisation des ARNs(21,70,71). Le premier étant que TDP-43 peut se lier au 3'UTR des ARNm et ainsi influencer la stabilité du transcrit. Le deuxième d'influencer la stabilité du transcrit est par sa liaison avec les longs introns (>100 kb) présents dans les ARN cibles. Cette fonction est requise pour maintenir le niveau normal de ces transcrits(21,70,71). Il y a aussi des évidences d'un mécanisme

d'autorégulation de TDP-43 puisque celui-ci peut se lier et stabiliser son propre ARNm (21,70,71).

### **3.2.4 Transports des ARN et traduction**

La présence d'un NLS et d'un NES dans la structure de TDP-43 permet à la protéine de voyager entre le noyau et le cytoplasme. La région C-terminale, riche en glycine, est aussi importante dans ce voyageant puisqu'elle influence la solubilité et la localisation de TDP-43 (59,73). Ces éléments pris en considération, en plus de la présence de deux RRM, suggèrent un rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique des ARNm (64,71). TDP-43 joue aussi un autre rôle essentiel dans les neurones. En effet, la dépolarisation des neurones entraîne une localisation accrue de TDP-43 avec les protéines FMRP (*fragile X mental retardation protein*) et Staufen-1 (*double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1*) (64,65). Ces deux protéines régulent le transport des ARN, ainsi que la traduction locale. TDP-43 est aussi important dans le transport des granules d'ARN et joue un rôle dans la plasticité puisqu'il peut réguler la traduction des protéines au niveau des dendrites (64,65)

### **3.2.5 Granules de stress**

Les granules de stress (GS) sont des organelles sans membrane qui se forment lors d'un stress cellulaire et sont un site de triage des ARNm (74–76). La formation de ces structures permet de limiter la traduction afin de favoriser les fonctions cellulaires essentielles à la survie de la cellule. Elles sont composées de RBP et d'ARN (74–76). G3BP1 (*Ras GTPase-activating*

*protein-binding protein 1*) et TIA-1 (*T-cell internal antigen-1*) sont deux protéines centrales dans les granules de stress(75,77). Il a été démontré que TDP-43 co-localisait avec G3BP1 et TIA-1 lors de la réponse au stress engendré par un stress oxydatif, thermique ou osmotique(75,77). De plus, TDP-43 régule à la hausse TIA-1 et régule à la baisse G3BP1(75,77). Il a été démontré que la perte cellulaire de TDP-43 altère l'agrégation contrôlée de TIA-1 et l'assemblage des granules. La dynamique de l'assemblage des granules est due à la diminution du niveau protéique de G3BP1. TDP-43 contribue donc à la réponse cellulaire au stress en modulant l'assemblage des granules de stress (75,77).

### **3.2.6 Traitement des micro-ARNs**

TDP-43 interagit avec quelques protéines clés dans le traitement des micro-ARNs (miARNs) (21,71). Drosha, une RNase de type III, est une protéine importante dans la première étape de maturation des miRNAs (21,71). Une étude a identifié TDP-43 comme l'une des protéines associées à Drosha (21,71). De plus, TDP-43 interagit aussi avec des protéines impliquées dans la biogénèse des miRNAs par le complexe Dicer, dont argonaute 2 et DDX17 (*DEAD-Box Helicase 17*) (21,71). Une preuve supplémentaire de l'implication de TDP-43 dans la maturation des miARNs est que l'appauvrissement cellulaire en TDP-43 régule à la baisse le miRNA let-7b et régule à la hausse miR-633 (78). Ces interactions suggèrent un rôle important pour TDP-43 dans le traitement des miARNs (78).

### 3.3 Implication dans les maladies neurodégénératives

TDP-43 est impliquée dans quelques maladies neurodégénératives dont la FTD, comme mentionné précédemment (67). Elle est aussi impliquée dans maladie d'Alexandre, une maladie neurodégénérative qui est causée par une mutation dans GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) et est caractérisé par la présence d'inclusions appelé fibres de Rosenthal dans les astrocytes (79). Il a été démontré que la TDP-43 phosphorylée s'accumule dans la matière blanche chez les patients atteints de la maladie d'Alexandre et que TDP-43 est présent dans les fibres de Rosenthal (79). Cette maladie est donc aussi caractérisée par une protéinopathie de TDP-43 (79).

Le syndrome de Rett est un syndrome qui cause un retard mental chez les femmes (69,80). Dans la majorité des cas, le syndrome est causé par une mutation dans *MECP2* (*methyl-CpG-binding protein 2*) (69,80). Une des fonctions cellulaires altérées dans la pathologie est la biogénèse de miARN, puisque les miARN peuvent moduler la fonction de MeCP2 (69,80). Puisqu'il a été rapporté que TDP-43 interagir avec MeCP2 et qu'il a un rôle dans la biogénèse des miARNs, il est fort probable que TDP-43 soit impliqué dans les mécanismes moléculaires du syndrome de Rett (69,80).

Le syndrome de Perry est caractérisé par le parkinsonisme, la dépression, la perte de poids et l'hypoventilation (81). Des inclusions de TDP-43 ont été retrouvées dans la *substantia nigra*, dans la partie rostrale du tronc cérébral et dans les ganglions de la base. Bien qu'il n'y ait pas de mutations dans *TARDBP* expliquant la maladie, la présence d'inclusions positives pour TDP-43 suggère une protéinopathie de TDP-43 dans le syndrome de Perry (81).

La maladie d'Alzheimer (MA) est la principale cause de démence (82). Des inclusions de TDP-43 ont été retrouvées dans 20-50% des cas (82). Ce pourcentage augmente à 75% dans les stades avancés de MA. De plus, une rare mutation dans le gène *TARDBP* a aussi été rapporté comme cause la MA (82). Il est possible que TDP-43 influence le développement et le phénotype de la maladie par plusieurs mécanismes dont la neuro-inflammation et le dysfonctionnement mitochondrial et neuronal (82).

TDP-43 est aussi impliqué dans le Parkinson (82). En effet, quelques mutations dans *TARDBP* ont été découvertes chez les patients atteints de Parkinson. De plus, l'analyse de tissus *post-mortem* a montré la présence de la TDP-43 ubiquitinées dans les corps de Lewy présent dans le cortex entorhinal et dans le gyrus denté de certains patients (82).

Les analyses *post-mortem* effectuées chez les patients atteints de la maladie d'Huntington ont aussi démontré la présence d'inclusions cytoplasmiques de TDP-43(84). Plus précisément, TDP-43 se co-localise avec la protéine d'huntingtine mutée agrégée dans les neurites, mais pas dans les inclusions intranucléaires (84).

### **3.4 Implication dans la SLA**

À ce jour, une quarantaine de mutations ont été découvertes dans *TARDBP* dans des cas de SLA sporadiques (1-2%) et familiaux (5%). La grande majorité de ces mutations sont des mutations faux sens et se retrouvent dans le domaine riche en glycine, dans la région C-terminale (Fig.3) (21,60,73). L'impact fonctionnel de ces mutations n'a pas été déterminé. Le domaine riche en glycine joue un rôle dans les interactions protéine-protéine et dans la fonction d'épissage, cependant certaines mutations dans ce domaine ne semblent pas altérer ces fonctions



(21,60,73). Par exemple, la région des a.a. 321 à 366 est nécessaire à la liaison de TDP-43 avec la protéine hnRNP A2 et à l'inhibition de l'épissage alternatif de l'exon 9 du pré-ARNm de *CFTR*. Cependant, les mutations localisées dans cette gamme d'a.a. (Q331K, M337V et G348C) ne modifient pas ces deux fonctions (85). Il est aussi possible que nous n'avons pas encore trouvé qu'elles sont cibles protéiques et d'ARN qui sont altérés avec la présence de ces mutations. Le gain d'une nouvelle interaction est aussi une possibilité.

Une des caractéristiques pathologiques importantes de la SLA est la présence d'agrégats de protéines ubiquitinées. TDP-43 est la composante principale (97%) de ces inclusions cytoplasmiques (21). De plus, TDP-43 peut être phosphorylée et clivée en fragments C-terminal dans la pathologie. Les fragments C-terminal clivés se retrouvent aussi dans des inclusions cytoplasmiques (86). TDP-43 peut aussi être retrouvée sous deux isoformes supplémentaires nommés Met<sup>85</sup>-TDP-35 (35 kDa) et Met<sup>85</sup>-TDP-25 (25kDa). Ces deux isoformes, sont traduits à partir d'un codon d'initiation de traduction alternatif situé à la méthionine 85, se retrouvent aussi dans les agrégats cytoplasmiques retrouvés dans les tissus *post-mortem* de patients SLA (87). La présence de TDP-43 dans le cytoplasme est souvent accompagnée d'une perte nucléaire de TDP-43. On ne sait pas si la toxicité de TDP-43 est due à une perte de la fonction nucléaire normale ou à un gain de fonction cytoplasmique toxique. Un autre modèle qui inclut la perte et le gain de fonction a aussi été proposée (63,70,88).

### **3.5 Implication dans d'autres maladies**

TDP-43 est aussi impliquée dans d'autres maladies dont le cancer et la myosite à corps d'inclusion (*inclusion body myositis*, IBM) (89,90). L'IBM est une maladie musculaire

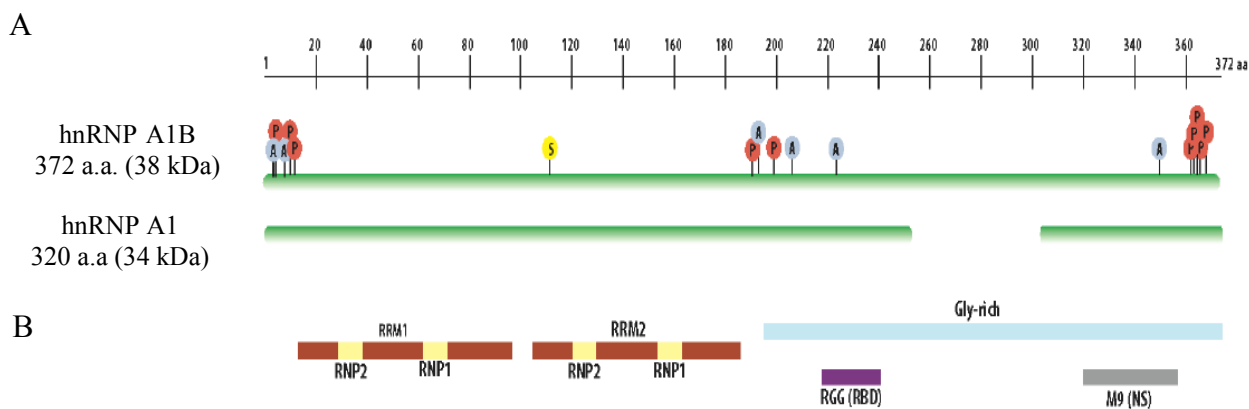
inflammatoire. Les biopsies musculaires ont démontré que TDP-43 pouvait former des agrégats sarcoplasmiques dans certaines fibres musculaires et était présent dans des micronoyaux de d'autres fibres (89). D'autres analyses ont aussi démontré que TDP-43 co-localisait, aux sites d'infiltrations, avec les lymphocytes T. Ces observations suggèrent un rôle dans les mécanismes moléculaires de l'IBM pour TDP-43 (89). De nouvelles données suggèrent que TDP-43 aurait un rôle dans la progression du cancer. Il a été démontré que TDP-43 serait surexprimé dans certains cancers dont le cancer du col de l'utérus et dans les glioblastomes (90). TDP-43 pourrait aussi influencer la survie des cellules cancéreuses en diminuant la forme clivée de la caspase 3 (*cleaved caspase-3*) (90).

#### **4. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1**

L'*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1* (hnRNP A1) est une protéine codée par le gène *HNRNPA1* situé sur le chromosome 12q13.13 (92,93). Cette protéine fait partie de la famille des hnRNPs, plus particulièrement de la sous-famille hnRNP A/B qui représente plus de la moitié des hnRNPs et comprend les protéines A1, A2/B1, A3, B2 et AB (92,93). Ces protéines sont exprimées de manière ubiquitaire et sont les plus abondantes du noyau s'approchant du niveau des histones (91). On retrouve hnRNP A1 sous deux isoformes. L'isoforme le plus court et le plus abondant, hnRNP A1 (34 kDa) est composé de 320 a.a. tandis qu'hnRNP A1B (38 kDa) est l'isoforme le plus long et moins abondant est composé de 372 a.a. (92,93).

## 4.1 Structure

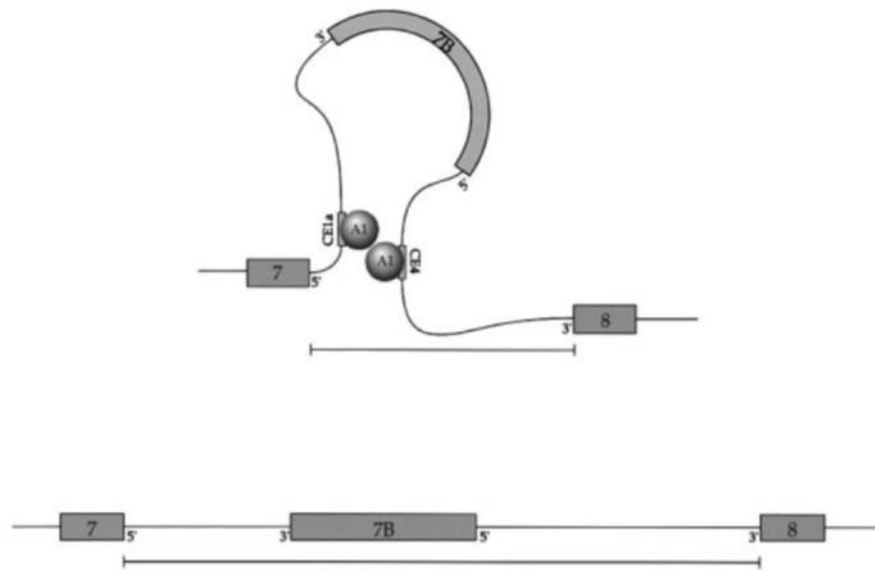
HnRNP A1 possède deux domaines de liaison à l'ARN (RRM1 et RRM2) dans la région N-terminale. Bien que ces deux domaines aient une structure similaire, leurs fonctions ne sont pas interchangeables (91,95). La région C-terminale est composée du domaine riche en glycine aussi appelé *prion-like domain* (PrLD) qui est caractérisé par des regroupements de tripeptides Arg-Gly-Gly intercalés de résidus aromatiques (Phe, Tyr) (91,95). Ce domaine contient une boîte RGG et ainsi qu'un domaine M9. La contribution de la boîte RGG n'est toujours pas bien connu, cependant, il serait en partie responsable pour la liaison d'hnRNP A1 avec ces ARNs cibles(91,95). Le domaine M9, tant qu'à lui, permet le transport bidirectionnel à travers l'enveloppe nucléaire, un SLN se trouve aussi en aval du M9 (94). Le PrLD est aussi responsables des interactions protéines-protéines (91,95) (Fig.4).



**Figure 4. Schéma des structures d'hnRNP A1.** Inspirée de Jean-Philippe et al. 2013 (92). (A) Carte schématique des deux isoformes d'hnRNP A1 avec l'identification des sites d'acétylation (A), de phosphorylation (P) et du SUMOylation (S). (B) Représentation des domaines structurels et fonctionnels.

## 4.2 Épissage alternatif d'*hnRNP A1*

Le transcrit d'*hnRNP A1*, peut être épissé de manière différentielle pour produire deux ARNm qui diffère de 52 acides aminés par l'inclusion / exclusion d'un exon cassette, l'exon 7B (95,96). L'exclusion de l'exon 7B est moduler par l'élément conservé (EC) 1a (EC1A) et 4 (EC4) qui sont situés dans la séquence intronique entre les exons 7-7B et entre les exons 7B-8, respectivement (97). Les RBP peuvent se lier aux EC1a et EC4 et interagir entre elles afin de rapprocher le site d'épissage (SE) 5' distal du SE 3', facilitant ainsi l'exclusion de l'exon 7B (97). Il a été démontré que ces sites d'épissage ont une grande affinité avec la protéine hnRNP A1, de plus le PrLD serait essentiel pour activer le SE 5' distal mais pas pour sa liaison aux EC. Puisqu'*hnRNP A1* peut se lier aux deux EC mentionnés ci-dessus, il a été proposé que l'interaction entre les *hnRNP A1* lié au pré-ARNm puisse faciliter leur rapprochement en créant une conformation en boucle (98) (Fig. 5).



**Figure 5. Modèle de l'épissage alternatif d'hnRNP A1.** Inspirée de Blanchette et Chabot 1999 (98) L'interactions entre les molécules d'hnRNP A1 et les EC de son pré-ARNm rapproche le sites d'épissage 5' distal du site d'épissage proximal, favorisant l'exclusion de l'exon 7B. Les barres indiquent la distance qui sépare ces deux sites d'épissage.

Un autre EC, EC6IO, situé en aval de l'exon 7B, a été identifié comme modulateur de l'épissage alternatif d'hnRNP A1 (96,97,99). Cet élément intronique réprimerait l'utilisation du SE distal, favorisant l'inclusion de l'exon 7B. L'activité de l'EC6IO ne serait pas, contrairement aux EC1a et 4, régulé par hnRNP A1 (96,97,99). Ce serait la combinaison des interactions entre les différents régulateurs et EC qui modulerait la reconnaissance des SE et par le fait même l'inclusion de l'exon 7B (96,97,99).

## 4.3 Fonctions

HnRNP A1 est une RBP qui joue plusieurs rôles importants dans l'expression génique par son implication dans la stabilisation du génome et dans la régulation du métabolisme de l'ARN. Plus précisément, hnRNP A1 est impliquée dans la transcription, l'épissage, la maintenance des télomères, l'exportation des ARNm, la translation et le traitement des miARNs (91,95).

### 4.3.1 Transcription

Plusieurs études ont démontré qu'hnRNP A1 peut s'associer à plusieurs promoteurs afin de réguler la transcription. En fonction de ces cibles, hnRNP A1 peut activer ou réprimer la transcription. Par exemple, il a été démontré que la liaison d'hnRNP A1 au promoteur de la thymidine kinase induit la répression de la transcription et que la liaison à l'apolipoprotéine E induit l'activation de la transcription (93,92). Un deuxième mécanisme utilisé par hnRNP A1 afin de faciliter la transcription serait réguler par la liaison d'hnRNP A1 au quadruplex-G de l'ADN (*G-quadruplex DNA structures*). Cette liaison pourrait déstabiliser le complexe et favoriserait la transcription de plusieurs gènes (93,92). Un troisième mécanisme impliquerait la petite protéine nucléaire ribonucléaire (*small nuclear ribonucleoprotein snRNP*) 7SK, une molécule d'échafaudage qui, lorsque liée à d'autres facteurs dont hnRNP A1, séquestre et inhibe le facteur d'élongation de la transcription P-TEFb (*positive transcription elongation factor*) favorisant ainsi la transcription par une interaction protéine-protéine (93,92). Le contexte cellulaire est important dans la fonction de régulation de la transcription d'hnRNP A1 (100). La

dépendance au contexte pourrait être due à la grande diversité de protéines qui se lient à hnRNP A1 par le PrLD.

### 4.3.2 Épissage

Les transcrits primaires sont épissés dans le noyau afin de produire différentes protéines à partir d'un même transcrit. Il a été démontré qu'hnRNP A1 a un rôle essentiel dans l'excision des introns et l'adhésion des exons, puisqu'elle participerait à toutes les étapes de formation du spliceosome (92,93). Plusieurs mécanismes sont utilisés par hnRNP A1 pour réguler l'épissage. Premièrement, certains sites qui sont des sites activateurs d'épissage exonique (*exonic splicing enhancer*, ESE) dépendants d'hnRNP A1 peuvent chevaucher les sites ESE des protéines SR (92,93). Ce chevauchement favorise l'assemblage du *spliceosome* ainsi qu'une compétition entre hnRNP A1 et les protéines SR pour la liaison aux ESE. La protéine qui lie le site va déterminer l'inclusion ou l'exclusion de l'exon ciblé. Ce mécanisme est responsable, par exemple, de l'épissage de l'exon 7 de *SMN2* (101–103). Deuxièmement, hnRNP A1 peut se lier à des sites qui inhibent l'épissage exonique (*exonic splicing silencer*, ESS). Suite à cette liaison, hnRNP A1 peut se lier de manière coopérative avec les exons adjacents ce qui limite l'accès d'autres facteurs d'épissage à leur site de liaison respectif (103). Troisièmement, hnRNP A1 peut se lier sur les introns et inhiber la liaison des facteurs d'épissage sur les séquences introniques adjacentes (103). Quatrièmement, hnRNP A1 peut former une boucle dans l'ARNm afin de faciliter l'excision de certains exons par sa liaison aux sites en amont et en aval de l'exon. Les deux protéines d'hnRNP A1 liées au pré-ARNm vont ensuite interagir entre elles par le PrLD

formant la boucle. Une collaboration avec hnRNP H est aussi possible pour moduler ce type d'épissage (104,105).

### **4.3.3 Maintenance des télomères**

Les télomères sont de régions d'ADN non codantes, répétitives (TTAGGG) situé à l'extrémité des chromosomes (93,106). La fusion, la dégradation et une mauvaise maintenance des télomères peuvent induire l'apoptose, la sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire (93,106). HnRNP A1 s'associe à certaines composantes ARN du complexe des télomères et facilite le déroulement du quadruplex-G (93,106). Cette interaction contribue à la maintenance et à l'élongation des télomères. HnRNP A1 peut aussi inhiber l'activité des télomérases et freiner la dégradation des télomères en facilitant le recouvrement des télomères (*end-capping*) (93,106). Il est proposé qu'hnRNP A1 joue différent rôle dans la maintenance des télomères en fonction de son état de phosphorylation et des différents cofacteurs impliqués (93,106).

### **4.3.4 Exportation des ARNm**

HnRNP A1 peut lier les ARN poly (A) (65,93). En effet, il a été démontré qu'il lie les ARNm dans le noyau et les accompagne à travers l'enveloppe nucléaire jusqu'aux polysomes(65,93). Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si hnRNP A1 a un rôle passif ou actif dans l'exportation des ARNm (65,93). Il se peut qu'hnRNP A1 soit impliquée dans l'exportation de la totalité des ARN poly(A) ou seulement de certains plus spécifiques. Il est aussi probable qu'elle retienne les introns excisés dans le noyau (65,93).



#### 4.3.4 Translation

HnRNP A1 a un rôle dans la translation dû à son interaction avec les séquences riche en AU (*AU-rich* sequences, AREs) et avec le site d'entrée interne des ribosomes (*internal ribosomal entry site*, IRES) (92). Les AREs modulent la stabilité et la translation de certains ARNm (93). Il a été démontré qu'hRNP A1 se lie aux AREs de l'ARNm de l'*interleukin 2* (*IL-2*) et des facteurs de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) ce qui met en évidence un rôle dans la stabilité et la translation de ces ARNm (92,93). Les IRES module l'initiation de la translation cap-indépendante (93). La liaison d'hRNP A1 sur les IRES favorise la translation médiée par les IRES de plusieurs ARNm dont celui du facteur de croissance des fibroblastes humain 2 (*human fibroblast growth factor 2*, *FGF-2*) (92,93). Une augmentation dans la phosphorylation d'hRNP A1 diminue sa liaison au IRES et par le fait même la translation des protéines médiés par les IRES (107,108).

#### 4.3.5 Traitement des miARNs

Les micro ARNs sont de petits ARNs non codant qui interfère avec les ARNs et qui ont aussi un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle (93,92,109). HnRNP A1 peut avoir des effets positifs et négatifs sur la régulation des miARNs. On ne possède toujours pas beaucoup d'informations sur ces cibles à l'exception du miR-18A et miARN Let-7a (93,92,109). Il a été démontré qu'hRNP A1 participe à la biogénèse du miR-18A puisque cette protéine facilite la

liaison et le clivage par Drosha. HnRNP A1 peut aussi diminuer la production du miR Let-7a en inhibant son traitement par Drosha (93,92,109).

#### 4.4 Implication dans la SLA

Des mutations rares dans le gène *HNRNP A1* ont été trouvées chez les patients atteints de la SLA classique et de la SLA avec le syndrome des bras en fléau. À ce jour, quatre mutations ont été découvertes ; p.D262/314V, p.Q277K, p.G283R et p.P288/340S. La mutation p.D262/314V se situe dans PrLD, la mutation p.P288/340S se situe dans le domaine M9 et les mutations p.Q277K et p.G283R se trouve dans l'exon 7B situé dans le PrLD (23,110).

Des analyses de tissus *post-mortem* ont démontré qu'il y avait une perte nucléaire d'hnRNP A1 dans les neurones de la moelle épinière de patients de la SLA. Cette perte nucléaire a été observée dans des neurones positifs pour des inclusions de TDP-43 (111). L'analyse de tissus provenant de patient de SLAs et avec la pathologie C9ORF72 ont montré la présence d'hnRNP A1 dans des agrégats dans la couche granulaire cérébelleuse et dans les neurones de Purkinje (111). Dans les cas C9, hnRNP A1 co-localisait avec les agrégats formés de dipeptides GR et avec les foyers d'ARN (24,112).

Des expériences en cultures cellulaires et *in vitro* ont démontré qu'hnRNP A1 avec la capacité de former des fibrilles et des hydrogels. Cette propriété serait accentuée par certaines mutations dans le PrLD dont la D262V (23,113,114). D'autres expériences ont démontré qu'hnRNP A1 pouvait être recrutée aux agrégats formés par la protéine mutante FUS<sup>P525L</sup> (115). De plus les mutations causant la SLA dans *UBQLN2* et *HNRNPA1* diminueraient l'interaction entre les deux protéines (116). Il a aussi été démontré qu'hnRNP A1 interagit avec RBM45

(*RNA binding motif 45*), une protéine qui est élevée dans le liquide céphalo-rachidien et présente sous forme d'agrégats dans plus de 90% des cas de SLA (117).

La présence d'hnRNP A1 dans les agrégats cytoplasmiques, la diminution du niveau nucléaire, son interaction avec plusieurs protéines liées à la SLA et les mutations suggèrent un rôle important dans la pathologie de la SLA.

#### **4.5 Implication dans les maladies neurodégénératives**

HnRNP A1 est impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives, une de celles-ci est la maladie d'Alzheimer (MA). En effet, il a été démontré que l'expression d'hnRNP A1 est diminuée dans le cerveau et augmentée dans les cellules sanguines périphériques mononuclées chez le patient (118,119). HnRNP A1 peut contribuer à la maladie de trois façons. HnRNP A1 est impliquée dans l'épissage alternatif de l'exon 7 de la protéine précurseur de l'amyloïde (PPA) (118,119). La perte d'hnRNP A1 favoriserait l'inclusion de l'exon 7 et la forme alternative de la PPA qui induit la génération d'amyloïde- $\beta$  toxique (118,119). De plus, hnRNP A1 pourrait induire un déséquilibre cholinergique qui aurait un impact négatif sur la fonction neuronale (118,119). Finalement, l'augmentation du niveau protéique dans les cellules mononuclées sanguines périphériques aurait un impact sur le récepteur RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) (118,119). Ce récepteur est exprimé sous deux isoformes, *membrane-bound RAGE* et *secretory RAGE*. Le ratio entre les deux est important afin d'éviter la privation de glucose. Il a été démontré que hnRNP A1 est impliqué dans l'épissage de *RAGE* et qu'une modification du ratio des deux isoformes influence la MA (118,119).

L'atrophie musculaire spinale (AMS) est causée par la perte du gène *SMN1* (*survival of motor neurons 1*). Le gène *SMN2* produit une protéine identique à SMN1 dont la fonction n'est pas encore claire. La protéine SMN2 est importante chez les patients atteints de l'AMS puisqu'elle peut compenser pour la perte de SMN1 (120,121). Cependant, des mutations silencieuses dans l'exon 7 de *SMN2* modifient l'interaction de son pré-ARNm avec hnRNP A1 résultant à l'exclusion de l'exon 7 (120,122). Le changement dans l'épissage alternatif augmente la production d'un transcrit anormal qui se reflète par une diminution de la protéine SMN2 fonctionnelle ce qui rend inapte SMN2 à compenser efficacement la perte de SMN1 (120,122).

La paraparésie spastique tropicale/myélopathie associée au HTLV-1 est une maladie neurologique auto-immune dans laquelle les patients développent des anticorps contre une protéine de 38kDa identifiée comme étant hnRNP A1(93). Un des mécanisme moléculaire énoncé pour cette maladie est que le niveau d'expression élevé de la protéine hnRNP A1 dans les neurones et les cellules gliales pourrait expliquer la présence de ces anticorps(93). Puisque la protéine identifiée comme hnRNP A1 est de 38 kDa, il est fortement probable qu'hnRNP A1B soit impliquée dans la pathogénèse de cette maladie (93).

Des anticorps spécifiques pour le domaine M9 d'hnRNP A1 ont aussi été décelés dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de la sclérose en plaques (123). De plus, certaines mutations causant la maladie ont été trouvés dans le domaine M9, diminuant le transport nucléo-cytoplasmique d'hnRNP A1(123). Ces mutants ont une mauvaise localisation cytoplasmique, localise avec les granules de stress et favorise l'apoptose (123,124). Ces informations suggèrent qu'hnRNP A1 est impliqué dans le développement de la sclérose en plaques.

De plus, des mutations dans hnRNP A1 ont été découvertes chez de rares patients atteints de protéinopathie multi-systémique et dans la myosite à corps d'inclusions (23,125). Il a aussi été rapporté qu'hnRNP A1 serait localisée dans le cytoplasme dans la dégénérescence lobaire fronto-temporal (FTLD) avec des inclusions positives pour FUS (*Fused in sarcoma*) (126). L'implication dans une grande partie des maladies neurologiques et neurodégénératives suggère qu'une bonne régulation d'hnRNP A1 serait nécessaire au bon fonctionnement des neurones.

#### **4.6 Implication dans d'autres maladies**

HnRNP A1 est aussi impliquée dans d'autres maladies qui ne sont pas neurologiques. Une de ces maladies est la maladie de Crohn, une inflammation chronique des voies gastro-intestinales (127). Un changement dans la phosphorylation d'hnRNP A1 ainsi qu'un changement dans sa capacité de liaison à IL-10 dans les cellules mononucléées sanguines périphériques entraîne une diminution dans la production de l'IL-10 chez certains patients (127).

HnRNP A1 a aussi un rôle dans le syndrome pieds-mains-bouche. Le coxsackievirus A16 (CA16) est une cause de ce syndrome (128,129). Afin de se répliquer, le 5'UTR de l'ARNm de CA16 va se lier au IRES de la cellule hôte (128,129). Cette liaison abolit l'interaction d'hnRNP A1 et d'hnRNP K avec l'IRES (128,129). L'altération de la fonction de traduction est donc un des mécanismes de virulence du CA16. Le même mécanisme est utilisé par le norovirus murin (128,129).

Finalement, hnRNP A1 est aussi impliquée dans les mécanismes moléculaires du cancer puisqu'elle est hautement exprimée dans plusieurs tumeurs, favorisant la glycolyse aérobie et l'élongation des télomères (130). On retrouve dans certains carcinomes un transcrite alternatif du

gène *LOXL4*. La forme complète de la protéine LOXL4 un suppresseur de tumeur, tandis que le variant serait pro-métastatique(130). Il a été démontré que les protéines SRSF1 et hnRNP A1 sont deux facteurs de l'épissage alternatif de *LOXL4* (130). Il a aussi été démontré qu'hnRNP A1 aurait aussi un impact sur le cycle cellulaire (131). En effet, l'augmentation de l'expression d'hnRNP A1 modifie l'expression de plusieurs gènes qui sont associé à la phase G2/M du cycle cellulaire(131). Le dérèglement du cycle cellulaire est une des causes de la prolifération anarchique qui caractérise les cancers. De plus, l'augmentation de l'expression de c-Myc, dans certains cancers, pourrait être médié par la phosphorylation et la localisation cytoplasmique d'hnRNP A1 (131). Ces nombreuses implications dans le cancer font d'hnRNP A1 une cible thérapeutique potentielle dans le traitement contre le cancer.

## **Hypothèse et objectifs**

Dans cette étude, nous avons exploré la perte de la fonction nucléaire de TDP-43 et son impact sur une autre protéine, hnRNP A1. Notre hypothèse est que la localisation cytoplasmique et/ou la perte nucléaire de TDP-43 contribue à la vulnérabilité des neurones par l'altération de l'épissage alternatif d'hnRNP A1 et de ses fonctions. Afin de valider cette hypothèse, nous avons établi trois objectifs. Puisque TDP-43 a plusieurs rôles importants dans le métabolisme de l'ARN, notre premier objectif est de déterminer si TDP-43 régule l'ARNm d'hnRNPA1 et si l'appauvrissement nucléaire modifiait le niveau de l'isoforme hnRNP A1B. Notre deuxième objectif est de déterminer si l'inclusion de l'exon 7B augmente la propension à la fibrillation et à l'agrégation d'hnRNP A1B. Notre troisième objectif est de vérifier si l'augmentation d'hnRNP A1B est pertinente dans la pathologie de la SLA.

# Matériels et méthodes

## 1. Constructions

Le plasmide Flag-TDP-43<sup>ΔSLN</sup> résistant au pARNi de TDP-43 a été généré en utilisant la trousse *QuickChange II Site-Directed mutagenesis* (Agilent Technologies) sur le plasmide pCS2-Flag-TDP-43<sup>TS</sup> avec l'amorce sens 5'- CAACTATCC AAAAGATAACGCAGCAGCAATGGATGAGACAGATGC -3' afin de muter le SLN, comme publié précédemment (132). Les modifications pour rendre le plasmide résistant au pARNi de TDP-43 ont été faites avec l'amorce sens suivante 5'-CTT CCT AAT TCT AAG CAG AGG CAG GAC GAG CCT TTG AGA AGC AG -3'. pCMV-Myc-A1 et pCMB-Myc-A1B ont été sous-clonés à partir du pIND-A1-Myc et du pIND-A1B-Myc, respectivement, (133) et ont été insérés entre les sites de restrictions EcoRI et HindIII dans le pCMV(SV40) qui avait été précédemment modifié pour inclure l'étiquette Myc. La mutation D262V/D314V a été introduite avec la trousse *QuickChange II Site-Directed mutagenesis* (Agilent Technologies) avec les amorces suivantes : sens, 5'- GGTGGTGGGAAGCTACAATGTTTTGGGAATTACAACAATC-3' et antisens, 5'- GATTGTTGTAATTCCCAAAAACATTGTAGCTTCCACCACC-3'.

## 2. Culture cellulaire et transfection

Les cellules HeLa et HEK293FT ont été cultivées dans du milieu d'aigles modifiés à haute teneur en glycémie de Dulbecco (*Dulbecco's High Glucose Modified Eagles Medium*, DMEM, GE Healthcare) supplémenté avec du sérum de bovin fœtal 10% (SBF, Wisent) et de la 2mM L-glutamine (Sigma). Les cellules CB3 (lignée parentale et transfectées stables) ont été cultivés dans du milieu essentiels minimum (MEM) avec modification Alpha (*Minimum Essential Media Alpha modification*, GE Healthcare) supplémenté avec 10% de SBF (Wisent) et 1% de Pénicilline-Streptomycine (ThermoFisher Scientific). Les cellules ont été collectées 72 heures après la transfection de 125 pmol de pARNi à l'aide de la lipofectamine 2000 (Invitrogen), selon les instructions du fabricant. Les séquences utilisées sont les suivantes : pARNi control : #12935-200 (Invitrogen), pARNi TDP-43 #1 : 5'-AAGAUGAGAACGAUGAGCCCAUUGA-3', et pARNi TDP-43 #2 : 5'-AAGCAAAGCCAAGAUGAGCCUUUGA-3'. Pour les expériences de microfiltration et des agrégats intracellulaires, les cellules HEK293FT et HeLa ont été transfectées avec de l'ADNc étiqueté Myc pour 24 heures en utilisant la lipofectamine LTX et le *plus reagent* (Invitrogen).

## 3. Immuno- buvardage

Les lysats cellulaires ont été préparés avec du tampon de dosage de radio-immunoprécipitation (RIPA), soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE), transférés sur une membrane de nitrocellulose et bloqués avec une solution saline tamponnée au phosphate (*Phosphate-buffered saline*, PBS) *Tween-20* (PBS-



T) avec 5% de lait en poudre. Les membranes ont été incubées avec les anticorps suivants : souris anti-hnRNP A1 (4B10) (Santa Cruz Biotechnology), souris anti-hnRNP A1 (9H10) (Cell Signaling), souris anti-Actine (MP Biomedicals), lapin anti-c-Myc (Sigma), souris anti-tubuline alpha (DM1A; Abcam), lapin anti-TDP-43 (Proteintech), lapin anti-GAPDH (Cell Signaling) et lapin anti-HuR (Millipore) dans le tampon de blocage. Les membranes ont ensuite été incubées avec des anticorps secondaires conjuguées aux enzymes peroxydase de raifort (*enzyme horseradish peroxidase*, HRP) (Jackson ImmunoResearch) et révélées avec de l'ECL chimioluminescence (ThermoFisher Scientific). Les films ont été quantifiés par densitométrie avec Photoshop. Les fractions subcellulaires ont été préparées en utilisant la trousse *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction* (Thermo Scientific), selon les instructions du fabricant. Les tissus de rat Sprague-Dawley ont été homogénéisés avec un broyeur manuel avec un ratio de 1 pour 5 volumes de tampon d'homogénéisation (50mM Tris, pH 7.5, 1mM EDTA, 150mM NaCl, avec des inhibiteurs de protéase). Les homogénats ont ensuite été ajustés à 1% de SDS et 1% de NP-40, incubés 10 minutes sur la glace et 10 minutes à température pièce. Certains tissus ont ensuite été traités avec un sonicateur à sonde fine (3 pulsations, 10 secondes « *ON* » 30 secondes « *OFF* », 40% amplitude) afin de réduire la viscosité des homogénats. Les homogénats ont été clarifiés par centrifugation à 16 000 g pendant 20 minutes à 4°C, les surnageants ont été récupérés et la concentration des protéines a été quantifiée par la méthode BCA (*BiCinchoninic acid Assay*) (Pierce). Les lysats de tissus ont été séparés par SDS-PAGE et immunoblottés.

## 4. Immunofluorescence

Les lamelles (*coverslips*) ont été fixés dans une solution de 4% formaldéhyde/PBS, lavées au PBS, perméabilisées dans une solution de 0.1% triton X-100/PBS et bloquées dans une solution de 0.1% d'albumine de sérum de bovin(ASB)/PBS. Les lamelles ont été incubées avec les anticorps primaires : souris anti-Flag (Sigma), lapin anti-c-Myc (Sigma), lapin anti-TDP-43 (Proteintech) dilué dans le 0.1% ASB/PBS, lavées une fois avec le 0.1% triton X-100/PBS et 2 fois avec le 0.1% ASB/PBS. Les lamelles ont ensuite été incubés avec les anticorps secondaires : âne anti-lapin Alexa 488 (ThermoFisher Scientific), âne anti-souris Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch) et âne anti-lapin Alexa 594 (Jackson ImmunoResearch) dilués dans 0.1% ASB/PBS, lavées et étiquetés avec l'iodure TO-PRO- 3 (ThermoFisher Scientific), et montées sur les lames en utilisant le *ProLong Antifade* (ThermoFisher Scientific). Les Images ont été collectées sur le microscope confocal Leica TCS SP5 équipé avec un objectif 40X (1.25 N.A.) à l'huile et le logiciel d'imagerie *Leica Application Suite*.

## 5. Immunoprécipitation à l'ARN

Les cellules HeLa ont été lysées dans une solution de 10 mM Tris, pH 7.4, 50mM NaCl, 0.5% Triton X-100, avec des inhibiteurs de protéase, les lysats ont été triturés ensuite avec des seringues à aiguille 25G et 18G, incubés 5 minutes à température pièce, centrifugés à 13 000 g et les surnageants ont été collectés. Des aliquotes de 3-7 mg de lysats pré-clairés ont été immunoprécipités à 4°C pendant la nuit avec l'anticorps souris anti-TDP-43 (Abnova) ou souris anti-Flag (Sigma) pré-lié aux *Protein G Dynabeads* (ThermoFisher Scientific). Les

immunoprécipités ont été traités avec de la *DNase* (Qiagen) et l'ARN a été récupéré avec du trizol (Invitrogen). Une quantité égale d'ARN a été inversement transcrite en utilisant la trousse *QuantiTect Reverse Transcription* (Quiagen). L'ADNc a été amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) standard avec les amorces suivantes : *TARDBP* exon 2 sens: 5'-ACCGAAGACCTGAAAGAG-3'; *TARDBP* exon 3 antisens: 5'-GGAAGTTTGCAGTCACACCAT-3'; *HNRNPA1* exon 4 sens: 5'-GGGCTTTGCCTTTGTAACCT-3'; *HNRNPA1* exon 6 antisens: 5'-ACGACCGAAGTTGTCATTCC-3'; *CAMK2A* sens: 5'-CCACAGGGGCTTTAGGAGA-3'; *CAMK2A* antisens: 5'-GCTGCTGCCGCTTTTGTA-3' ; *HSPA4* sens: 5'-TGAAGGAGACAGCCGAAAG -3'; *HSPA4* antisens: 5'-TGCATCAGTATAGAAACAAGGAA-3'.

## 6. PCRq et Stabilité de l'ARN

L'ARN a été extrait avec la mini trousse *RNeasy* (Quiagen) et des quantités égales ont été inversement transcrits avec la trousse *Quantitect reverse transcription* (Quiagen), selon les instructions du fabricant. L'essai de PCR quantitative (PCRq) standard *PrimeTime* (IDT) pour *HNRNPA1* exon 1-2 (NM\_031157, Hs.PT.58.38919354), *HNRNPA1* exon 8-9 (NM\_031157, Hs.PT.58.458382, détecte l'exon 7B) et *ACTB* exon 6-6 (NM\_001101, Hs.PT.56a.40703009.g) ont été utilisé pour quantifier le niveau des ARNm. Pour déterminer la stabilité de l'ARNm, les cellules HeLa ont été traitées avec 5µg/ml d'actinomycine D (Sigma) pour 2, 4 ou 8 heure avant l'extraction d'ARN et analysées comme ci-dessus. Le système *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR* (Life Technologies) a été utilisé pour la PCRq.

## 7. Essai de luciférase

Les cellules HeLa ont été transfectées avec des pARNi pendant 48 heures et subséquemment transfectées pendant 24 heures avec un plasmide rapporteur qui inclut le 5' et 3' UTR de gène humain *HNRNPA1* (SwitchGear Genomics) et les contrôles pertinents (pour l'essai avec le promoteur : *GAPDH* et un vecteur qui contient une séquence aléatoire; R01 ; pour l'essai avec le 3'UTR : *GAPDH* et un vecteur qui contient une séquence aléatoire; RO3) en utilisant *Fugene* (Promega). Les réactifs de l'essai *LightSwitch* (Promega) ont été ajoutés selon les instructions du fabricant et l'activité de la luciférase a été évaluée avec le lecteur de microplaque *Synergy H4 Hybrid Multimode* (Biotek).

## 8. Essai d'épissage *In vitro*

Les cellules HeLa ont été appauvris ou non en TDP-43 avec les petits ARN en épingle à cheveux (ARNsh) suivants :

shTDP-43	sens	5'
GATCCCCACTACAATTGATATCAAATTCAAGAGATTTGATATCAATTGTAGTGTTT		
TTGGAAA-3'	et	shTDP-43
	antisens	5'-
AGCTTTTCCAAAACACTACAATTGATATCAAATCTCTTGAATTTGATATCAATTG		
TAGTGGG-3'		

Les cellules ont été lysées et l'extrait nucléaire a été incubé avec le pré-ARNm hnRNP A1 7B (98) et les oligonucléotides concurrents (TG)<sub>13</sub> ou avec des protéines TDP-43 recombinantes (TP710010, Origene) pour 2 heures à 30°C. Les produits distaux et proximaux épissés ont été amplifiés par PCR en temps réel (RT-PCR) en utilisant les amorces suivantes :

T3-5' sens 5'-GGGAACAAAAGCTGGGTACCG-3 et E-Ad antisens 5'-GAGTTTGTCTCAACCGCGA-3' et ont été séparés sur gel PAGE natif (*native-PAGE gel*).

## 9. Assemblage hexapeptidique et essai de microfiltration

Les hexapeptides hnRNP A1 sauvage (NDGSNF, DGSNFG), hnRNP A1B sauvage (GSGSNF, SGSNFG) et hnRNP A1<sup>D262V</sup> mutant (SYNVFG) ont été synthétisés par GenScript. Les peptides (5mM) ont été dissous dans le tampon de fibrillation (40mM HEPES-KOH, 75mM KCl, 1mM dithiothreitol). Les peptides dissous ont été immédiatement utilisés pour la réaction d'assemblage de fibrilles par l'addition de Thioflavine T (Sigma) à 5 µM. La réaction a été monitorée à  $\lambda_{ex/em}$  440/482nm, 25°C, avec agitation, pour 2 heures sur le lecteur de microplaque *Synergy H4 Hybrid Multi-Mode* (Biotek). Les échantillons ont été appliqués pendant 2 minutes sur des grilles Formvar® (formiate de polyvinyle), des grilles de nickel à 200 *mesh*, évaporées avec du carbone, colorées négativement avec de l'acétate d'uranyle aqueux à 2% pendant 2 min et examiné à 80 kV avec un microscope à transmission électronique FEI Tecnai 12 (FEI, Eindhoven, Pays-Bas). L'essai de microfiltration a été performé avec des lysats de cellules HEK293FT préparés avec l'extraction par cycle de congélation-décongélation dans du PBS avec des inhibiteurs de protéases. 30-60µg de lysat cellulaire entier ont été dilués dans 150 µl de PBS avec des inhibiteurs de protéase et filtrés passivement à travers une membrane d'acétate de cellulose qui ne lie pas les protéines (0.2µm, GE Healthcare) durant 1 heure en utilisant l'appareil de microfiltration Bio-dot (Bio-Rad). Les membranes ont été bloquée dans une solution de 5% de lait en poudre dans du PBS-T et incubée avec l'anticorps lapin anti-c-Myc (Sigma).

## 10. Viabilité cellulaire

Un nombre équivalent de cellules CB3 (*Mouse Erythroleukemia*) ont été incubées à 37°C pendant 72 heures, ont été colorées au bleu de trypan (Multicell) et ont été comptées immédiatement en utilisant un hémocytomètre.

## 11. Anticorps anti-hnRNP A1B

L'anticorps polyclonal contre hnRNP A1B a été généré dans un lapin en utilisant le peptide synthétique CYGGSGSYDSYNNGG comme immunogène (Genscript, USA). Ce peptide correspond aux acides aminés 281-294 dans l'isoforme hnRNP A1B (exon 7B, NP\_112420.1) avec l'ajout d'une cystéine en N-terminale initiale pour augmenter l'antigénicité. La séquence d'acides aminés a été choisie en utilisant l'outil de conception *Optimum Antigen*<sup>TM</sup> (Genscript) afin d'assurer de son unicité et de sa solubilité. L'anticorps a été validé par le marquage par immunofluorescence des cellules transfectées avec hnRNP A1B étiqueté Myc, mais pas celles exprimant hnRNP A1.

## 12. Matériels provenant de patients

Les sections de moelle épinière (ME) (6µm) emballées dans la paraffine provenant de 5 cas contrôles et 5 cas de SLAs avec une pathologie de TDP-43 documentée(134) ont été utilisées dans cette étude. Les sections ont été marquées avec l'anticorps souris anti-hnRNP A1 (4B10) ou

lapin anti-hnRNP A1B. La récupération de l'antigène a été effectuée pendant 15 minutes en utilisant du citrate de sodium (10mM citrate de sodium, 0.05% *Tween-20*, pH 6.0) et un autocuiseur (*pressure-cooker*) (2100 Retriever; Aptum Biologics, UK). La peroxydase endogène a été désactivée avec 3% de peroxyde d'hydrogène (VWR). L'incubation du premier anticorps a été performée durant la nuit à 4°C dans le tampon de blocage (5% ABS, 0.3% Triton-X 100 dans du PBS). Après lavage au PBS, l'incubation de l'anticorps secondaire (IgG biotinylée) a été faite à température pièce, pendant 1 heure dans le tampon de blocage. Les complexes antigènes : anticorps ont été visualisés avec la trousse *Vectastain ABC* (Vector Laboratories) avec le substrat DAB. L'hématoxyline Harris a été utilisé pour contre-colorer les tissus pour la visualisation. Les images ont été collectées avec le microscope optique Olympus BX45 à 20x et 100x. L'immunofluorescence et la microscopie confocale ont été menées par la suite mener sur un cas de SLAs. Après la récupération de l'antigène au citrate de sodium, les tissus ont été marqués avec les anticorps lapin anti-hnRNP A1B et souris anti-TDP-43 (ab5707, Abcam) pendant la nuit à 4°C. Le jour suivant, les tissus ont été incubés avec les anticorps secondaires chèvre anti-lapin Alexa Fluor 488 (Life Technologies) et âne anti-souris Alexa Fluor 568 (Life Technologies) durant 1 heure à température pièce. Après les lavages et le montage sur lame, les images ont été acquises en utilisant le microscope confocal multi photons Zeiss LSM 510 Meta NLO.

### **13. Analyse statistique**

La significativité statistique des expériences a été déterminée à l'aide du test de Student (test t) à deux sens avec le logiciel GraphPad Prism. Une valeur de  $p$  inférieure à 0.05 a été

considéré comme étant statistiquement significative. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (ESM).

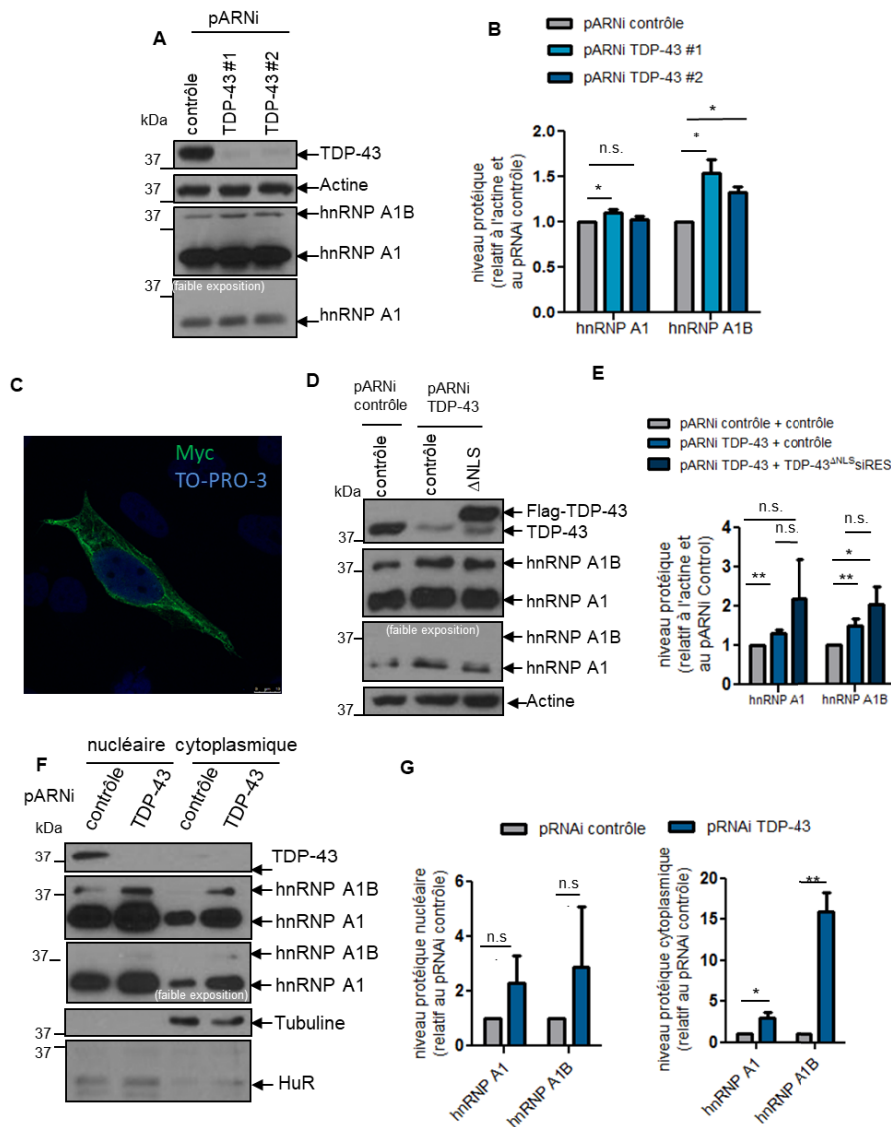
## Résultats

### 1. La perte nucléaire de TDP-43 augmente le niveau protéique d'hnRNP A1

Afin d'examiner l'effet de TDP-43 sur hnRNP A1, nous avons réduit le niveau endogène de TDP-43 dans des cellules HeLa à l'aide petit ARN interférent (pARNi). L'immunobuvardage a démontré que la déplétion de TDP-43 a un impact minimal sur l'intensité d'une bande de 34 kDa qui est réactive aux anticorps d'hnRNP A1 4B1 9H10 (Fig. 6A, B). Cependant, une seconde bande qui a migrée plus lentement, de 38 kDa, a été régulée à la hausse dans les cellules traitées avec deux pARNi indépendants et spécifiques pour TDP-43. Puisque les cas de SLA et de FTD sont souvent caractérisés par une déplétion nucléaire de TDP-43 plutôt qu'une perte complète de l'expression de TDP-43, nous avons examiné le niveau des deux bandes d'hnRNP A1 dans les cellules dans lesquelles nous avons remplacé TDP-43 endogène par la version cytoplasmique de TDP-43 via l'expression exogène d'un ADNc codant pour une version résistante au pARNi de TDP-43 ayant un signal de localisation nucléaire (SLN) inactivé (Flag-TDP-43<sup>ASLN</sup>siRES). L'immunofluorescence des transfectant a confirmé la perte de la localisation nucléaire typique de TDP-43 (Fig. 6 C) (65,135–137). Un résultat important est que la bande de 38 kDa était plus abondante dans ces conditions (Fig. 6D, E). Cette protéine de 38 kDa est cohérente avec un isoforme qui a été décrit précédemment, hnRNP A1B. Cet isoforme



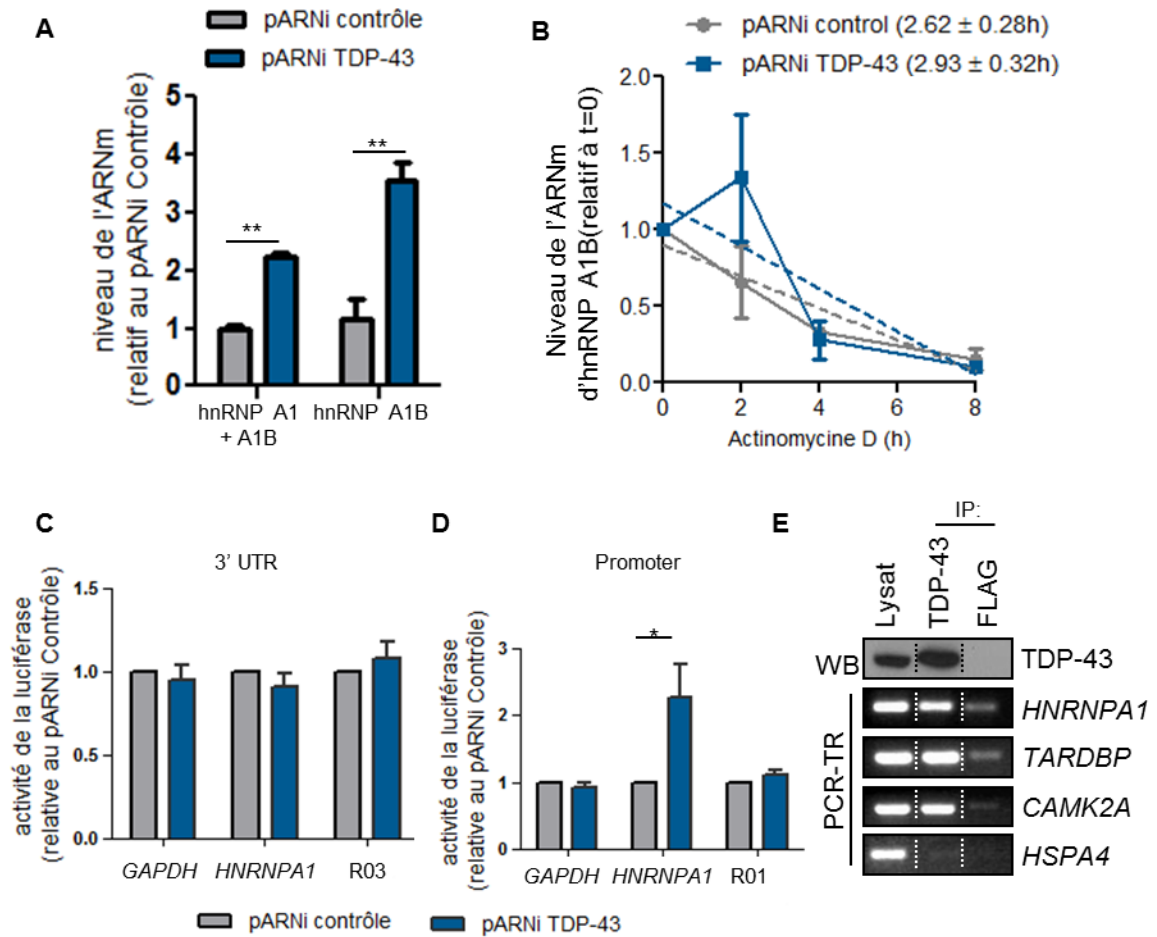
découle de l'inclusion d'un exon alternatif, l'exon 7B (133,138–140). Le fractionnement subcellulaire a indiqué que les niveaux protéiques cytoplasmiques d'hnRNP A1 et d'hnRNP A1B étaient régulés à la hausse dans les cellules réduites en TDP-43. Le niveau protéique nucléaire de ces protéines n'a pas changé de manière significative (Fig. 6F, G). Ainsi, la perte nucléaire et/ou l'accumulation cytoplasmique de TDP-43 augmente le niveau protéique cytoplasmique endogène d'hnRNP A1 et d'hnRNP A1B.



**Figure 6. La perte nucléaire de TDP-43 augmente le niveau protéique d'hnRNP A1B.** (A, B) Les cellules HeLa ont été traitées avec des pARNi, les lysats protéiques ont été (A) immunoblottés pour les protéines indiquées et (B) quantifié par densitométrie. (C-E) Les cellules ont été appauvrit en TDP-43 endogène et transfectées avec un plasmide contrôle ou le plasmide TDP-43<sup>ΔNLS</sup>siRES. (C) Immunofluorescence démontrant la localisation cytoplasmique de TDP-43<sup>ΔNLS</sup>siRES. (D-E) Le niveau d'hnRNP A1 et A1B a été évalué par immuno-buvardage et quantifié par densitométrie (F, G). Les fractions nucléaire et cytoplasmique des cellules HeLa traités au pARNi ont été immunoblottées et quantifié par densitométrie. Pour tous, la moyenne  $\pm$  ESM de 3-5 expériences est marquée. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.02$

## 2. TDP-43 endogène lie et régule l'ARNm d'hnRNP A1

Puisque TDP-43 a plusieurs fonctions en lien avec le métabolisme de l'ARN (59), nous avons émis comme hypothèse que TDP-43 pouvait réguler l'expression de l'ARNm hnRNP A1. En effet, la déplétion de TDP-43 par pARNi a induit une augmentation d'environ 2 fois et d'environ 3.5 fois du niveau total de l'ARNm d'hnRNP A1 et d'hnRNP A1B, respectivement. Cette augmentation a été détecté par les sondes de PCRq qui détectent soit les deux transcrits, soit uniquement le transcrit d'hnRNP A1B (Fig. 7A). Cette augmentation n'était pas due à une augmentation de la stabilité de l'ARNm puisque la demi-vie du transcrit d'*HNRNPA1B* était comparable entre le contrôle et les cellules traitées au pARNi TDP-43 ( $2.62 \pm 0.28$  heures vs.  $2.93 \pm 0.32$  heures,  $p=0.06$ ; Fig. 7B). La demi-vie du transcrit d'*HNRNPA1* était aussi comparable entre les deux conditions (données non présentées). Des données supplémentaires ont indiqués que TDP-43 n'influence pas l'ARNm d'*HNRNPA1* via le 3'UTR (*untranslated region*), comme démontré en utilisant un essai de luciférase (Fig. 7C). Cependant, il a aussi été noté que le promoteur d'hnRNP A1 est plus actif dans les conditions de d'appauvrissement en TDP-43 (Fig. 7D). Nous avons ensuite vérifié si TDP-43 pouvait interagir avec les transcrits d'*HNRNPA1* en utilisant une immunoprécipitation du TDP-43 endogène suivit d'une RT-PCR. Effectivement, les transcrits d'*HNRNPA1* ont été retrouvés dans les immunocomplexes de TDP-43 mais pas dans ceux préparés avec un anticorps ayant une cible non endogène (Flag, Fig. 7E). *CAMK2A* et *TARDBP* ont été utilisés comme contrôles positifs et *HSPA4* a été utilisé comme contrôle négatif (141).

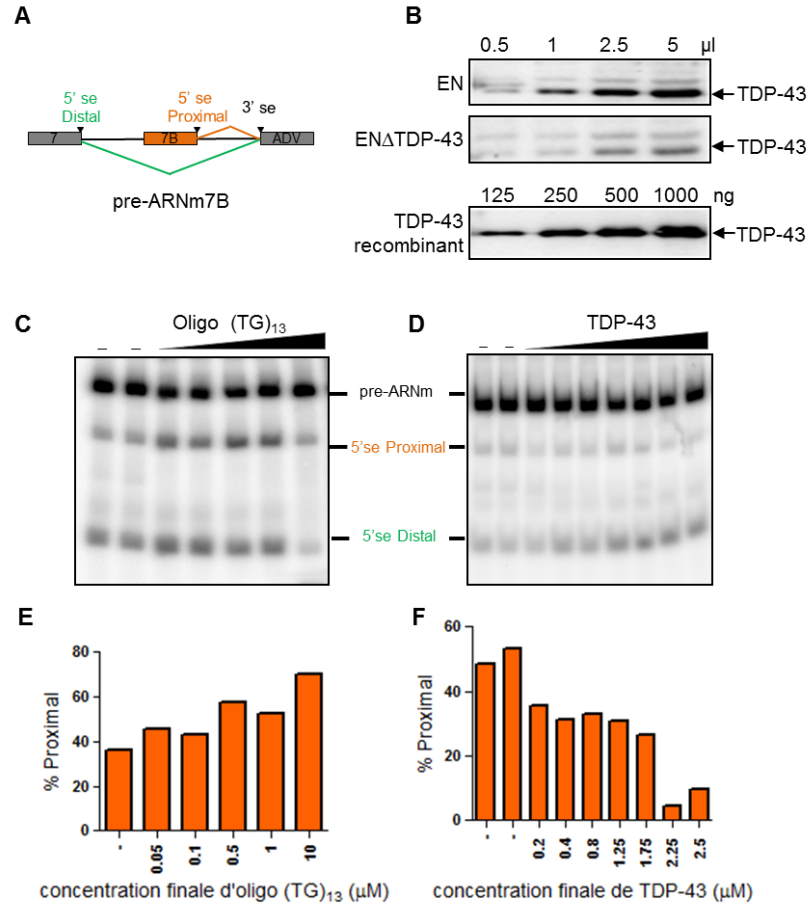


**Figure 7. TDP-43 lie et régule l'ARNm d'hnRNP A1.** (A) PCRq avec des sondes reconnaissant les deux transcrits d'hnRNP A1 ou seulement celui d'hnRNP A1B. Les données ont été normalisées avec l'actine. (B) PCRq pour le transcrit d'hnRNP A1, normalisé au 18S, suivant un traitement à l'actinomycine D. (C-D) Essai de luciférase dans des cellules HeLa traitées avec des pARNi et co-transfectées avec des vecteurs rapporteurs contenant le gène de la luciférase en aval du (C) 3'UTR ou du (D) promoteur d'*HNRNPA1*. (E) TDP-43 et les transcrits associés ont été co-immunoprécipités de cellules HeLa. Les ARNm liés à TDP-43 ont été extraits des précipités, inversement transcrits et amplifiés pour *HNRNPA1*, *TARDBP*, *CAMK2A* et *HSPA4*. L'immunoprécipitation de Flag a été utilisée comme contrôle. Pour tous, ± ESM de 3-5 expériences sont marquées. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.02$

### **3. TDP-43 influence la sélection du site d'épissage de l'ARN pré-messager d'*HNRNPA1***

Il a été démontré précédemment que la perte de TDP-43 entraîne l'épissage alternatif de plus de 230 gènes, favorise les séquences riches en UG/TG et est impliqué dans l'épissage alternatif de plusieurs gènes impliqués dans le développement neuronal et dans les maladies neurologiques (64,142–144). Étant donné qu'hnRNP A1 a été précédemment signalé comme étant épissé alternativement (140), et que nos données suggèrent que TDP-43 peut lier les transcrits d'*HNRNPA1* et influencer leurs niveaux, nous avons émis l'hypothèse que TDP-43 peut influencer l'épissage alternatif d'*HNRNPA1*. HnRNP A1B provient de l'inclusion de l'exon 7B qui code pour cinquante-deux a.a. supplémentaires. Afin de déterminer si TDP-43 a un impact sur l'épissage d'*HNRNPA1*, nous avons utilisé un modèle du pré-ARNm d'*hnRNP A1* (98) qui contient l'exon 7, l'exon 8 et un exon adénoviral avec un site d'épissage en 3' (Fig. 8A). Dans les extraits nucléaires de cellules HeLa avec des niveaux endogènes normaux de TDP-43 (Fig. 8B, supérieure), le site d'épissage distal de l'exon 7 est choisi de manière préférentielle et peut être disputé en augmentant la quantité d'oligonucléotides, consistant à une répétition de TG, qui séquestre TDP-43. Dans ces dernières conditions, la sélection du site d'épissage 5' est déplacée vers le site d'épissage 5' proximal résultant en l'inclusion de l'exon 7B (Fig. 8E, G). Pour tester si TDP-43 pouvait réprimer le site d'épissage 5' de l'exon 7B, nous avons utilisé des extraits nucléaires de cellules HeLa qui ont été appauvris en TDP-43 endogène en utilisant des ARNsh (*small hairpin RNA*) (Fig. 8B, milieu). Ces extraits ont démontré un usage plus important du site d'épissage 5' proximal comparé aux extraits contenant un niveau normal de TDP-43 (comparé les 2 premières lignes de la Fig. 8B, E). L'addition de protéines

recombinantes de TDP-43 a conduit à une favorisation de l'exclusion de l'exon 7B qui est dépendante de la dose (Fig. 8B inférieure; D, F). Donc, nos expériences *in vitro* indiquent que TDP-43 réprime l'utilisation du site d'épissage 5' proximal de l'exon 7B dans le pré-ARNm d'*HNRNPA1*.



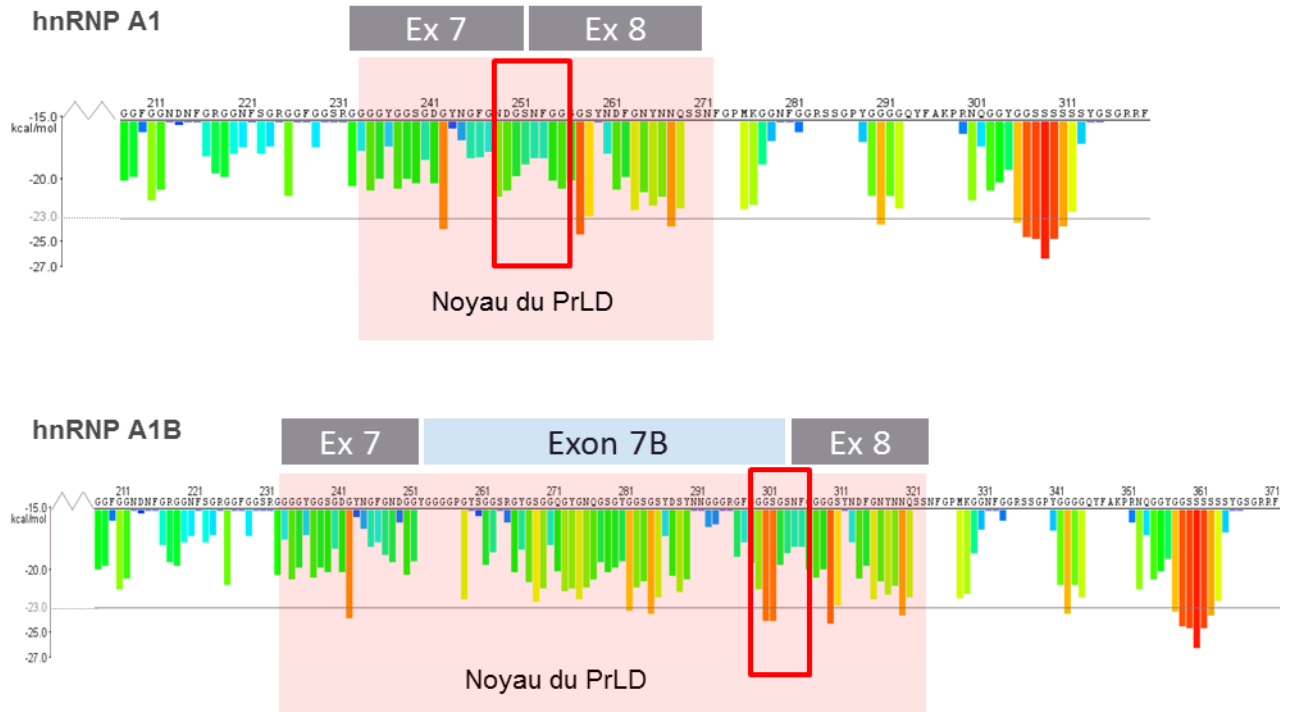
**Figure 8. TDP-43 influence la sélection du site d'épissage du pré-ARM d'*HNRNPA1* *in vitro*.** (A) Schéma de la structure du pré-ARNm / minigène d'*HNRNPA1*. Dans ce modèle, les sites d'épissage 5' de l'exon 7 et 7B compétitionnent pour un site d'épissage 3' unique (adénovirus) (B) Immuno-buvardage des différentes quantités de TDP-43 dans les extraits nucléaires de cellules HeLa avec et sans la TDP-43 endogène. Différentes quantités de protéine recombinantes TDP-43 ont aussi été immunoblottées simultanément. (C-D) Les oligonucléotides (TG)<sub>13</sub> rivalisent avec l'activité d'épissage endogène. Les produits épissés ou non ont été amplifié par RT-PCR et séparé sur gel PAGE natif. (E-G) L'ajout de protéines recombinantes TDP-43 restore l'épissage dans les extraits cellulaires provenant de cellules appauvris en TDP-43. Le pourcentage de l'épissage proximal a été quantifié. Les données sont représentatives de deux expériences indépendantes.

## 5. L'élongation du domaine semblable au prion confère une plus grande propension à la fibrillation *in vitro*

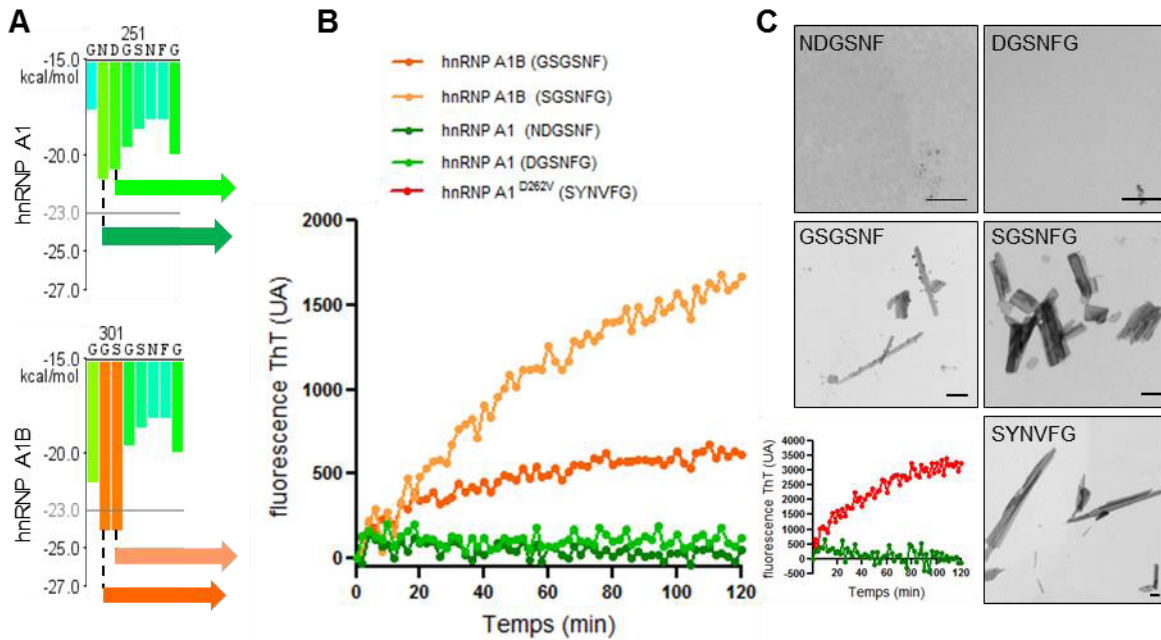
Les deux isoformes d'*HNRNPA1* codent une protéine avec deux RRM N-terminal et un domaine riche en répétitions Arg-Gly-Gly (RGG) appelé domaine riche en glycine ou domaine semblable au prion (PrLD) (93). HnRNP A1B diffère d'hnRNP A1 uniquement par l'inclusion de l'exon cassette 7B qui code pour cinquante-deux acides aminés additionnels dans le PrLD (114). Le centre de ce domaine contient un motif en *strict zipper* qui est un contributeur critique de la tendance intrinsèque d'hnRNP A1 à s'associer et à former des fibrilles (23,145). Il a été rapporté précédemment que la mutation liée à la SLA hnRNP A1<sup>D262V</sup> confère un motif *steric zipper* plus fort, accélérant la nucléation et la polymérisation des fibrilles (23). Afin de déterminer si l'inclusion de l'exon 7B et l'élongation consécutive du domaine PrLD augmente la propension à la fibrillation, nous avons effectué une analyse *in silico* sur les deux isoformes en utilisant ZipperDB (146), un algorithme basé sur la structure qui prédit les segments qui peuvent former des fibrilles. Spécifiquement, les hexapeptides avec une énergie de Rosetta <-23 kcal/mol sont prédit d'avoir une propension à la fibrillation accrue (146). À partir de cette analyse, deux hexapeptides (GSGSNF and SGSNFG) générés par l'épissage de l'exon 7B à 8 ont été prédit pour fibrilliser (Fig. 9, 10A). Pour déterminer si la propension à la fibrillation de ces peptides a été augmentée comme prévu, nous avons effectué un dosage d'incorporation de Thioflavine T (ThT) avec ces peptides synthétisés. Le ThT, un colorant de benzothiazole, démontre une augmentation de l'intensité de la fluorescence lorsqu'il est lié à des dépôts riches en feuilletts  $\beta$ , tels que la structure quaternaire des fibrilles amyloïdes (147). Comme contrôle négatif, nous avons choisi deux hexapeptides qui proviennent de l'épissage de l'exon 7 à l'exon



8 et qui n'ont pas de potentiel de fibrillation (énergie de Rosetta  $>-23$  kcal/mol; NDGSNF, DGSNFG). Conformément à la prédiction *in silico*, les deux peptides contrôles qui dérive d'hnRNP A1 n'ont pas incorporé la ThT. En revanche, le contrôle positif qui provient de la mutation de la SLA D262V (SYNVFG) a démontré une solide incorporation de ThT, comme prévu (23) (Fig. 10B, C). Enfin, comme prédit par ZipperDB, les deux peptides dérivés de l'inclusion de l'exon 7B (GSGSNF et SGSNFG) ont démontré une incorporation accrue de ThT (fig. 10B), de plus, les fibrilles ont été facilement visualisées par microscopie à transmission électronique (Fig. 10C). Ces données indiquent que les peptides dérivés du plus long variant d'hnRNP A1 ont une plus grande propension à la fibrillation *in vitro* comparé aux peptides dérivés du plus court variant d'hnRNP A1.



**Figure 9. Analyse *in silico* de la propension à la fibrillation d’hnRNP A1 et d’hnRNP A1B.** Analyse *in silico* de l’algorithme ZipperDB. Les résidus d’acides aminés sont représentés sur l’axe des x. Pour plus de clarté, l’analyse a été rognée pour commencer au résidu 208. Chaque barre de l’histogramme représente un hexapeptides et est colorée selon son énergie de Rosetta. Les barres rouges et oranges ont des énergies de Rosetta < -23 kcal / mol et sont sujettes à former des fibrilles.



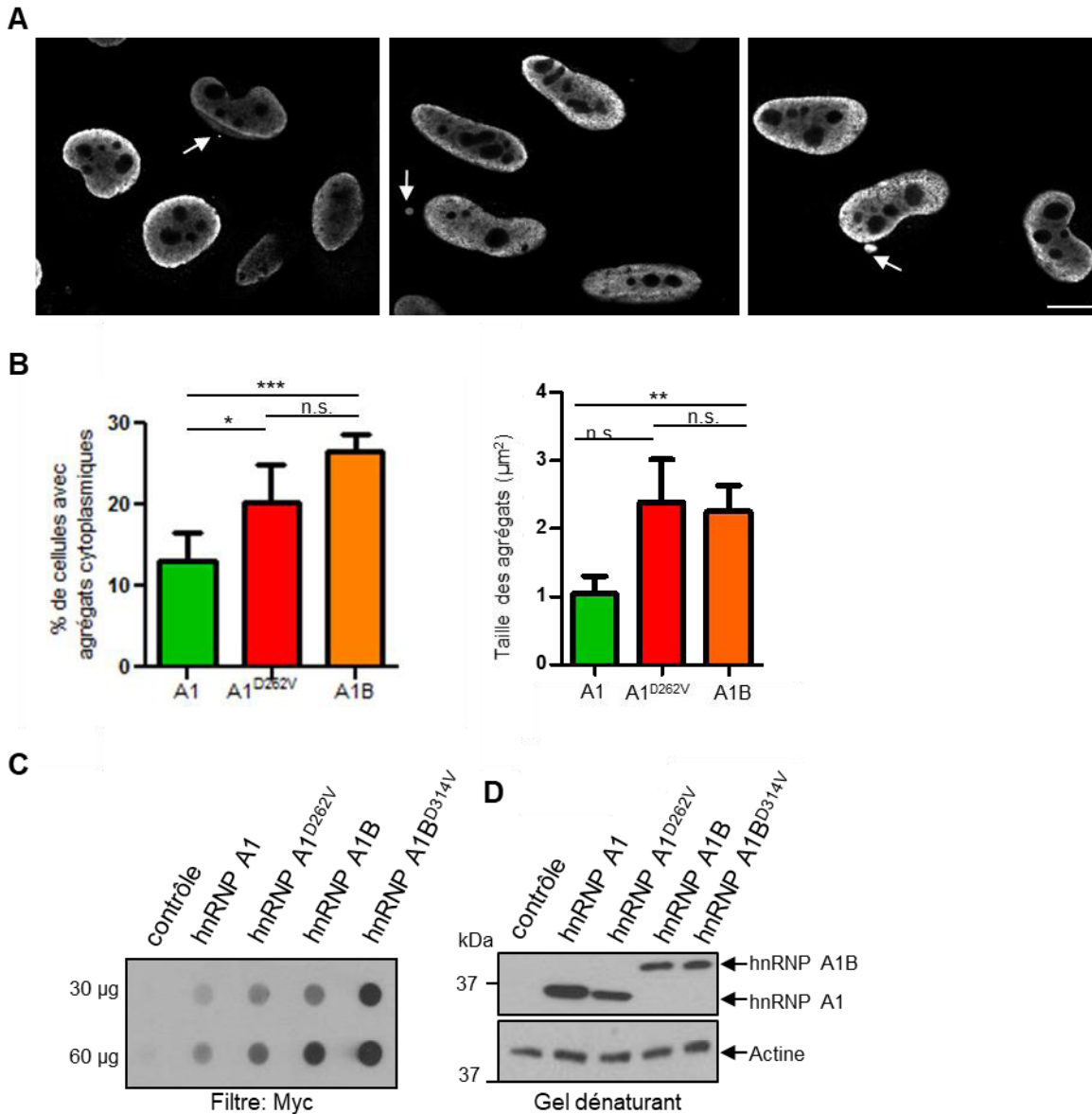
**Figure 10. Propension à la fibrillation des peptides dérivés d'hnRNP A1B.** (A) Agrandissement de l'analyse Zipper DB d'hnRNP A1/A1B illustrant les hexapeptides générés par l'inclusion de l'exon 7B et qui ont été sélectionnés pour une étude plus approfondie. (B-C) L'essai d'incorporation de Thioflavine T indique la fibrillation des peptides générés par l'exon 7B ou la mutation D262V. (C) Micrographie de la transmission d'électrons (*transmission electron micrographs*) démontrant la fibrillation des peptides. Les données sont représentatives de 3-6 expériences. Barre d'échelle, 500 nm.

## 6. HnRNP A1 génère des agrégats cytoplasmiques comparable à une mutation qui cause la SLA

Afin de déterminer si l'augmentation dans la propension à la fibrillation observée *in vitro* se reflète dans la formation d'agrégats cytoplasmiques *in vivo*, nous avons effectué une immunofluorescence sur des cellules HeLa transfectées avec des ADNc étiquetés Myc d'hnRNP A1, d'hnRNP A1<sup>D262V</sup> et d'hnRNP A1B. Les agrégats cytoplasmiques étaient facilement apparents dans les cellules exprimant hnRNP A1<sup>D262V</sup> et hnRNP A1B (Fig. 11A). La

quantification a révélé que les cellules transfectées avec hnRNP A1B formaient des agrégats cytoplasmiques environ deux fois plus souvent que les cellules transfectées avec hnRNP A1 et comparable aux cellules transfectées avec la mutation liée à la SLA (Fig. 11B). Nous avons aussi remarqué que les agrégats cytoplasmiques suivant l'expression hnRNP A1B étaient environ deux fois plus larges que ceux formés par l'expression exogène d'hnRNP A1 ou hnRNPA1<sup>D262V</sup> (Fig. 11B).

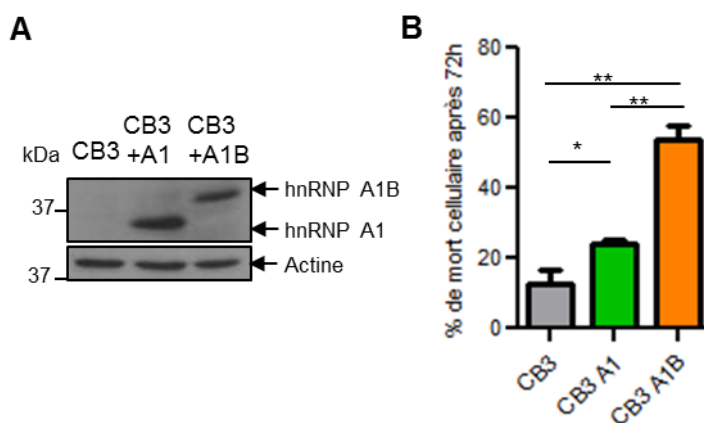
Pour étendre ces résultats biochimiquement, nous avons utilisé un test de microfiltration dans lequel des agrégats protéiques supérieurs à 0,2 µm sont retenus sur une membrane d'acétate de cellulose qui ne lie pas les protéines. Comparé aux cellules transfectées avec un vecteur vide, les lysats cellulaires provenant des cellules exprimant Myc-hnRNP A1 ont démontrés un faible niveau basal de matériel retenu, qui a été exacerbé par la mutation D262V. Fait intéressant, l'expression de hnRNP A1B a donné des niveaux de matériel agrégé comparables à ceux d'hnRNP A1<sup>D262V</sup>, alors que l'inclusion de la même mutation dans hnRNP A1B (codée comme hnRNP A1B<sup>D314V</sup>) a fortement exacerbé l'agrégation des protéines (Fig. 11C). L'immunobuvardage des lysats cellulaires entiers de HEK293FT a indiqué une expression équivalente des différentes constructions (Fig. 11D). Ces résultats démontrent que l'élongation du PrLD d'hnRNP A1 entraîne l'agrégation des protéines *in vivo*.



**Figure 11. L'inclusion de l'exon 7B favorise l'agrégation *in vivo*.** (A-B) Les cellules HeLa ont été transfectées avec les ADNc étiquetés Myc indiqués et immuno-colorés pour Myc. Les flèches indiquent les agrégats cytoplasmiques. Barre d'échelle, 10  $\mu\text{m}$ . (B) Quantification du phénotype observé. La moyenne  $\pm$  ESM de 3-4 expériences indépendantes a été marquée. \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,015$ . (C-D) Les cellules HEK293FT ont été transfectées avec l'ADNc indiqué. (C) L'agrégation a été testé par microfiltration en utilisant des membranes non adhésives d'acétate de cellulose. (D) Les lysats cellulaires ont été immunoblottés pour les protéines indiquées. Les données représentent 3 expériences indépendantes.

## 7. L'expression d'hnRNP A1B est toxique

La (les) conséquence(s) cellulaire(s) de l'expression d'hnRNP A1B reste inconnue(s). Afin d'évaluer l'effet d'hnRNP A1B sur la survie cellulaire, nous avons profité de la lignée cellulaire CB3 dans laquelle il n'y a pas d'expression endogène d'hnRNP A1 et des sous-clones CB3 qui expriment de manière stable hnRNP A1 ou hnRNP A1B exogène à des niveaux comparables (Fig. 12A) (133,148). Les cellules CB3 exprimant de manière stable hnRNP A1 ont démontré une augmentation modeste mais significative de la mort cellulaire comparé à la lignée parentale ( $p < 0.05$ ). Cependant, l'expression stable d'hnRNP A1B a augmenté d'environ 4.3 fois la mort cellulaire (Fig. 12B;  $p < 0.002$ ). Ainsi, l'expression exogène de hnRNP A1B est nuisible à la survie cellulaire.



**Figure 12. L'expression d'hnRNP A1B cause la mort cellulaire.** (A) Des lysats cellulaires de cellules CB3 sans hnRNP A1 endogène ou modifiées pour réexprimer u des isoformes ont été immunoblots pour les protéines indiquées. (D) La viabilité des lignées cellulaires CB3 a été testée par le test d'exclusion du bleu Trypan. La moyenne  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes est marquée. \*  $P < 0,05$  \*\*  $p < 0,002$ .

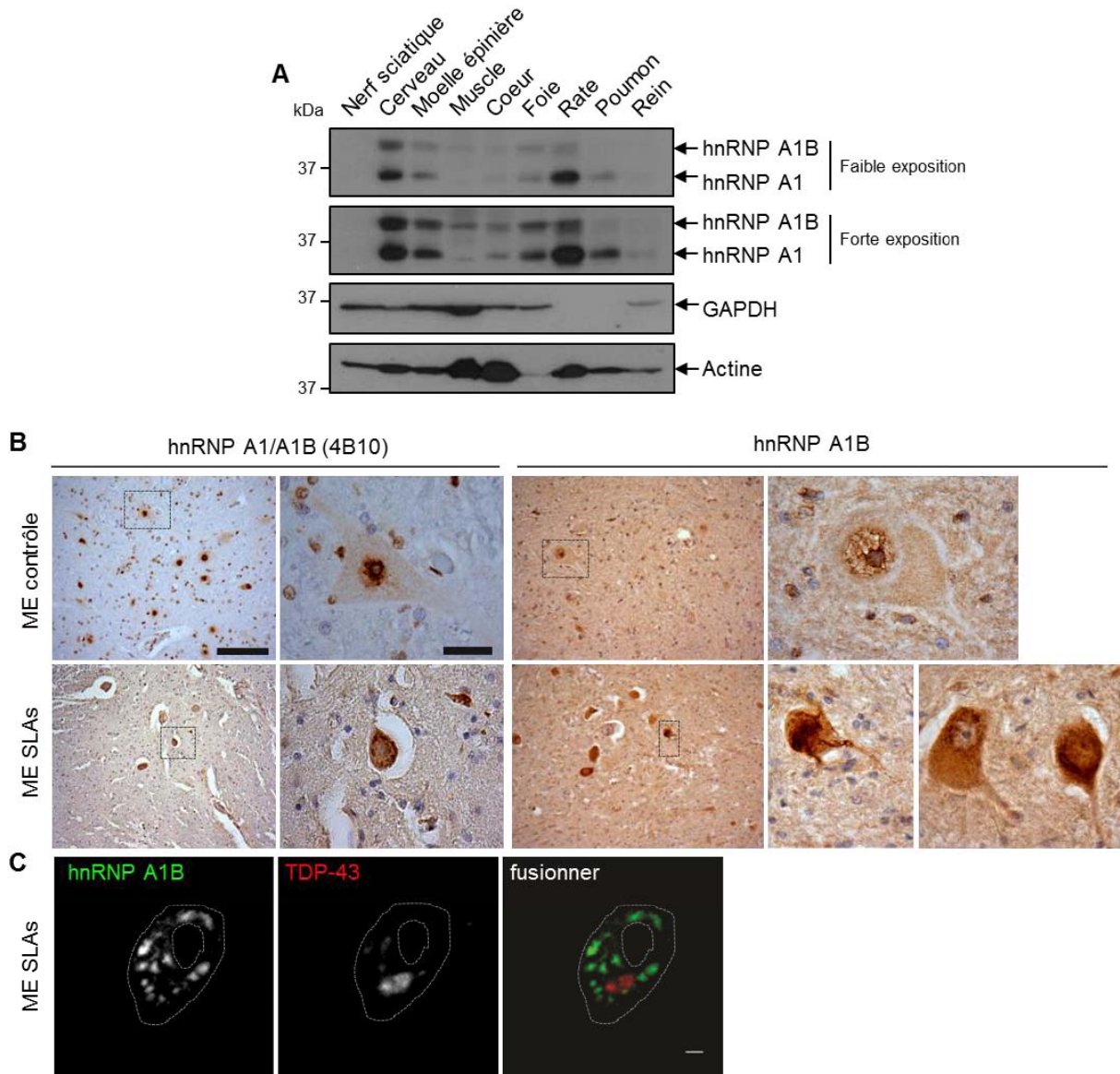
## **8. HnRNP A1B s'accumule dans le cytoplasme des motoneurones dans des cas sporadiques de la SLA**

On connaît peu l'expression physiologique d'hnRNP A1 et A1B. Par immuno-buvardage de lysats de tissus de rat, nous avons constaté qu'hnRNP A1 est facilement détecté dans le cerveau et la rate, et est moins abondant dans tous les autres tissus examinés. HnRNP A1B partage un motif similaire puisque le cerveau, la moelle épinière et la rate ont la plus forte expression (Fig. 13A). Le niveau stable d'hnRNP A1B est significativement plus élevé que la distribution qui a été rapportée précédemment dans les cellules HeLa où hnRNP A1B représente 5% du total protéiques d'hnRNP A1 (139). Aucun des isoformes n'a été détecté dans le nerf sciatique.

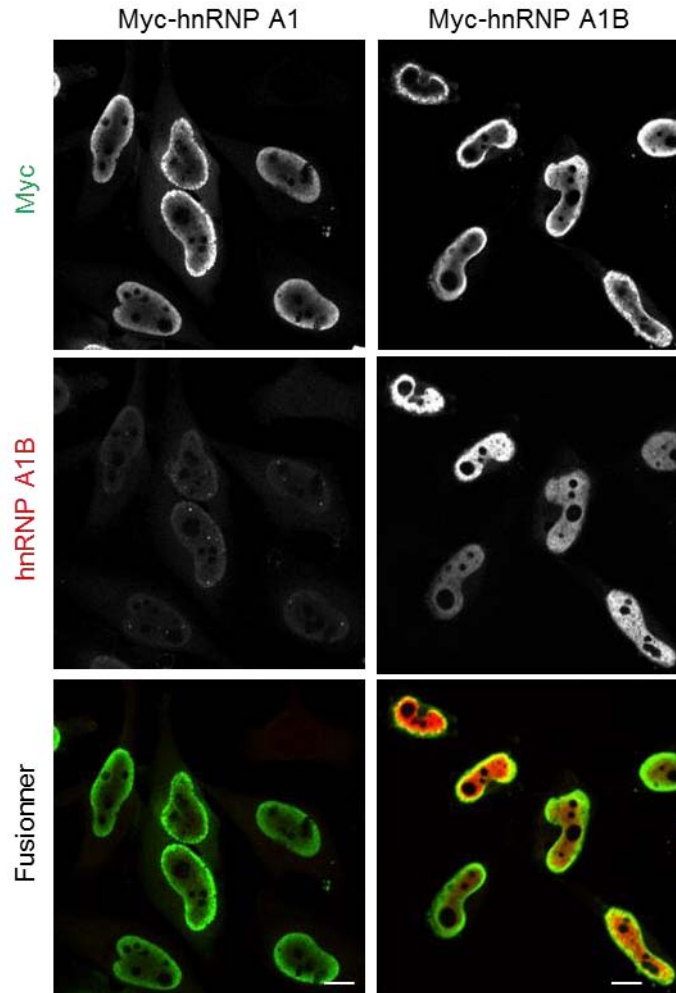
Afin d'évaluer s'il existe une relation entre la pathologie de TDP-43 et la mauvaise régulation de l'épissage d'hnRNP A1 dans la SLA humaine, nous avons évalué les neurones moteurs de la moelle épinière dans cinq cas de SLAs avec la pathologie de TDP-43 préalablement confirmée (134). En utilisant un anticorps qui détecte à la fois hnRNP A1 et hnRNP A1B (4B10), nous avons observé de l'immuno-réactivité principalement dans les noyaux des motoneurones des patients contrôles. En revanche, l'immuno-réactivité 4B10 des neurones des patients avec une SLAs était plus intense et comprenait également un étiquetage cytoplasmique robuste (Fig. 13B). En utilisant un anticorps dirigé contre un peptide unique à hnRNP A1B (Fig. 14), nous avons observé un marquage nucléaire plus faible dans les neurones provenant des patients contrôles et une coloration cytoplasmique robuste et intense dans les 5 cas de SLAs avec certains neurones présentant une diminution de l'immuno-réactivité. L'analyse par immunofluorescence nous a révélé qu'hnRNP A1B s'accumule principalement

dans des agrégats cytoplasmiques dans les neurones moteurs appauvris en TDP-43 nucléaire et présentant des agrégats cytoplasmiques de TDP-43. Fait intéressant, les inclusions cytoplasmiques de TDP-43 et d'hnRNP A1B n'ont pas démontré de colocalisation (Fig. 13C). En conclusion, les tissus du SNC sont enrichis en hnRNP A1B et cette protéine s'accumule sous forme d'inclusions cytoplasmiques dans les motoneurones des patients souffrant de la SLAs.





**Figure 13. HnRNP A1B est exprimé dans le SNC et forme des agrégats cytoplasmiques dans les neurones de patients atteints de la SLA. (A) Distribution d'hnRNP A1 et d'hnRNP A1B dans les différents tissus chez le rat. Les lysats de tissu ont été immunoblottés pour les protéines indiquées. (B) Images à faible grossissement d'hnRNP A1 et d'hnRNP A1B détectés avec l'anticorps 4B10 (gauche) ou avec l'anticorps spécifique pour hnRNP A1B (droite). Des grossissements plus élevés proviennent des régions en caisse dans les images à faible grossissement. Barre d'échelle, 100  $\mu$ m (faible grossissement), 10  $\mu$ m (grossissement plus élevé). (C) Immunofluorescence d'un neurone moteur de SLAs, coloré pour hnRNP A1B et TDP-43. Barre d'échelle, 5 $\mu$ m.**



**Figure 14. L'anticorps anti-hnRNP A1B est spécifique.** Des cellules HeLa ont été transfectées avec les ADNc Myc-hnRNP A1 et Myc-hnRNP A1B. Les cellules sont co-étiquetées avec Myc et hnRNP A1B. Barre d'échelle, 25  $\mu$ m.

# Discussion

## 1. TDP-43 régule la forme alternative d'hnRNP A1

TDP-43 est une protéine qui lie l'ARN qui a plusieurs rôles importants et variés dans le métabolisme de l'ARN y compris dans la transcription, le traitement des miARNs, la dynamique des granules de stress, le transport des ARNs, le transport nucléocytoplasmique et l'épissage (64,65,77,144). Cependant, il n'est toujours pas clair si les observations histologiques, localisation et agrégation cytoplasmique de TDP-43, se traduisent par une perte de la fonction nucléaire de TDP-43 ou par un gain de fonction cytoplasmique toxique ou une combinaison des deux (63). Dans cette étude, nous avons exploré la perte de la fonction nucléaire de TDP-43.

Nous avons démontré que la perte nucléaire de TDP-43, que ce soit par la déplétion cellulaire ou par une mauvaise localisation cytoplasmique (136), a un impact sur une autre RBP, hnRNP A1. Plus précisément, nous avons trouvé que TDP-43 lie le transcrit d'*HNRNPA1* mais n'influence pas la stabilité de son ARNm. Au lieu de cela, nous avons constaté que TDP-43 module la sélection du site d'épissage 5' du pré-ARNm d'*hnRNP A1* de telle sorte que l'appauvrissement de TDP-43 favorise l'inclusion de l'exon 7B, ce qui entraîne des niveaux élevés de la variante d'épissage la plus longue, hnRNP A1B. Afin de renforcer ce dernier résultat, nous aurions pu effectuer une expérience d'épissage *in vivo* par RT-PCR et comparer l'inclusion de l'exon 7B dans les lysats cellulaires provenant de cellules contrôles et de cellules traitées avec des pARNi contre TDP-43. Les cellules appauvries en TDP-43 devraient montrer un décalage dans l'épissage en faveur de l'inclusion de l'exon 7B.

Que le changement dans le ratio entre les isoformes hnRNP A1/A1B n'a pas été détecté dans les expériences de séquençage à l'ARN (ARN-seq) précédemment rapportées pourrait être due à la limitation inhérente de l'ARN-seq à détecter les transcrits de faible abondances tels qu'*HNRNPA1B* (149). La similitude dans le changement des niveaux d'hnRNP A1B entre l'appauvrissement total du TDP-43 et la localisation cytoplasmique/ perte nucléaire est conforme aux données récentes démontrant que la réduction des taux cellulaires de TDP-43 et la localisation cytoplasmique de TDP-43 ont des effets comparables (136). Nous avons également noté que TDP-43 peut fonctionner comme un répresseur de la transcription (ou peut séquestrer un activateur de la transcription) d'*HNRNPA1* via le promoteur, cette observation est digne de futures explorations.

Peu est connu sur l'impact fonctionnel des mutations de TDP-43 dans la SLA. Des études ont cependant démontré que certaines mutations de TDP-43, dont Q331K peut accroître les fonctions d'épissage sur certains ARN et peut faire perdre les fonctions d'épissage sur d'autres (85). Il serait intéressant de créer des lignées cellulaires exprimant la protéine TDP-43 mutés, avec différentes mutations retrouvés dans la SLA, en éditant le génome avec la technologie CRISPR-Cas9 (*clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat – CRISPR associated protein 9*) (150). Avec cet outil, nous pourrions vérifier si certaines mutations ont un effet similaire à la perte nucléaire de TDP-43, c'est-à-dire une régulation à la hausse du niveau protéique d'hnRNP A1B. Si c'est le cas, nous pourrions déterminer à quel niveau de la régulation il y a un changement; épissage, transcription ou stabilité de l'ARNm.

## **2. La propension à la fibrillation d'hnRNP A1B entraîne son agrégation**

La présence de la protéine de faible abondance hnRNP A1B produit par un événement d'épissage alternatif est connue depuis plusieurs années mais on en connaît toujours peu sur sa signification biologique que ce soit dans des conditions saines ou pathologiques (139). Nous avons démontré que l'inclusion de l'exon 7B augmente la propension à la fibrillation *in vitro* et entraîne l'agrégation protéique *in vivo*. En fait, hnRNP A1B forme des agrégats cytoplasmiques en quantité similaire à ceux formé par la mutation causant la SLA hnRNP A1<sup>D262V</sup>, bien qu'ils aient été deux fois plus larges.

La séparation de phase liquide-liquide (SPLL), médiée par les domaines de faible complexité des RBP, le PrLD dans ce cas-ci, est un mécanisme moléculaire émergent qui est proposé pour expliquer la formation des inclusions histologiques (113,145,151,152). Plus précisément, il est proposé qu'une forte concentration locale de protéines qui contiennent un PrLD/domaine de faible complexité puisse initier la séparation des phases pour donner naissance à des granules de ribonucléoprotéines (RNP) dont la maturation est limitée par la formation de fibrilles. L'hypothèse est que ces structures puissent être converties en granules de RNP pathologiques si la formation de fibrilles est excessive (113).

Il a été démontré qu'hnRNP A1 subit la séparation de phase liquide-liquide et peut être assemblée en hydrogels constitués de feuillets  $\beta$  plissés (145). Même s'il reste à le démontrer, il est fort probable qu'hnRNP A1B puisse également subir une SPLL. D'autres études sont nécessaires afin de déterminer si l'élongation du PrLD modifie la cinétique de la SPLL. Nous rapportons dans cette étude de la perte nucléaire de TDP-43 augmente le niveau protéique

d'hnRNP A1B, une protéine qui est intrinsèquement propice à la formation de fibrilles/d'agrégats et peut donc contribuer à l'évolution des granules de RNP en inclusions pathologiques.

### **3. Toxicité d'hnRNP A1B et son impact sur la dégénérescence du système nerveux**

Nos données chez le rat nous ont permis de savoir que le système nerveux central est enrichi en hnRNP A1 et A1B et qu'il est le tissu avec le plus haut ratio A1B: A1. Nous avons aussi observé que la protéine hnRNP A1B était toxique. En effet, nous avons observé dans des cellules non-neurales que l'expression de l'isoforme hnRNP A1B a un impact négatif sur la survie cellulaire plus important que l'expression d'hnRNP A1. Puisque le cerveau et la moelle épinière ont déjà un taux élevé d'hnRNP A1B, il est probable que même un changement mineur dans ce niveau peut contribuer à la mort cellulaire et à la dégénérescence du système nerveux.

Des études supplémentaires dans des cellules souches pluripotentes induites (CSPi) exprimant hnRNP A1, hnRNP A1B ou des mutants seraient importantes pour déterminer si l'expression d'hnRNP A1B induit la mort cellulaire à un taux similaire aux mutations liés à la SLA. De plus, il serait intéressant de déterminer s'il existe une vulnérabilité sélective entre les sous-types de neurones incluant les neurones moteurs, les neurones cholinergiques, les neurones dopaminergique et les neurones de l'hippocampe (18). Il y a de nombreuse évidence que la SLA est une maladie cellulaire non-autonome (*non-cell autonomous*)(153). Puisque la survie et le bon fonctionnement des cellules de soutien sont essentielle à la fonction neuronale, il serait

intéressant de faire la même expérience en culture cellulaire d'astrocytes, d'oligodendrocytes et de microglies.

Plusieurs souris transgéniques ont été utilisées comme modèle pour la SLA et ont aidé à comprendre les voies pathogènes et de faire les études précliniques (154,155). Afin de vérifier l'effet d'un niveau élevé d'hnRNP A1B, nous pourrions développer une souris transgénique exprimant l'hnRNP A1B humaine étiquetée Flag, par exemple, dans le système nerveux central. L'expression spécifique dans le SNC est défini par le promoteur insérer dans la construction, dans ce cas-ci nous pourrions utiliser le promoteur Prion (156). Ces souris devront être évaluées pour les comportements associés à la SLA et/ou à la FTD. La caractérisation du phénotype moteur peut être effectuée avec le test de la tige tournante (*Rotarod*) et par la force de préhension. Les tests d'anxiété comme le *marble burying*, l'*elevated plus maze*, ou l'*open field* permettre d'évaluer le phénotype social. Les labyrinthes radial et de Barnes peuvent être utilisé pour caractériser la cognition (157–159). Ces différents tests et un suivi de l'espérance de vie pourraient permettre de mieux comprendre l'effet *in vivo* d'hnRNP A1B. Il est possible que l'expression d'hnRNP A1B soit trop élevé et rendre difficile la caractérisation complète de la lignée. Une alternative serait d'utiliser des oligonucléotides antisens indépendants de la RNase H (OAS) afin de moduler les signaux d'épissage (160–162). Si une souris reçoit une injection d'OASs qui favorisent l'inclusion de l'exon 7B, il y aurait une augmentation du niveau endogène d'hnRNP A1B. Les souris pourront ensuite être évaluées comme mentionné plus haut.

## **4. Évidences de l'implication d'hnRNP A1B dans la SLA**

Des inclusions cytoplasmiques de hnRNP A1 et la diminution du niveau nucléaire d'hnRNP A1 ont déjà été signalées dans les tissus *post-mortem* de patients SLA (23,111,112). Cependant, les anticorps utilisés dans les études précédentes n'étaient pas en mesure de différencier l'isoforme le plus court et le plus abondant, hnRNP A1, de l'isoforme le plus long et le moins abondant, hnRNP A1B. Ici, en utilisant un anticorps spécifique pour hnRNP A1B, nous démontrons que, dans les neurones moteurs de SLAs ayant des inclusions de TDP-43, hnRNP A1B est plus abondant, est localisée de manière aberrante dans le cytoplasme et s'accumule dans des agrégats cytoplasmiques.

Un fait intéressant est qu'une nouvelle mutation dans l'exon 7B a récemment été rapporté chez des patients SLA avec le syndrome des bras en fléau (*flail Arm syndrome*) (163). Que cette mutation causant la maladie soit confinée dans l'exon épissé alternativement est significatif et implique que le dysfonctionnement d'hnRNP A1B est pertinent dans la pathologie de la SLA.

## **5. Les conséquences de l'épissage alternative d'hnRNP A1 sur le métabolisme de l'ARN**

TDP-43 et hnRNP A1 sont deux RBP grandement impliqués dans le métabolisme de l'ARN, chacun pouvant lier des milliers de transcrits (21,142,164). Toutes modifications dans l'abondance et la localisation et/ou la capacité d'interagir avec leurs protéines ou leurs ARN



cibles sont prédites pour avoir des conséquences jusqu'au deux tiers du transcriptome (64,92,93,142,143,164,165). Bien que la fonction d'hnRNP A1B soit inconnue, il a été rapporté que cet isoforme a une plus grande affinité de liaison avec l'ADN simple brin qu'hnRNP A1 (139). Alors qu'il est probable qu'hnRNP A1B aille les mêmes fonctions ou des fonctions similaires à hnRNP A1, il est possible qu'ils interagissent avec différents ARNm.

Le ratio nucléaire des protéines SRs et hnRNPs est important dans la régulation de l'épissage (166). Les protéines SRs sont constituées d'un ou deux domaines de reconnaissance à l'ARN, suivi par un domaine c-terminal riche en sérine et en arginine (167). Ces protéines peuvent moduler le choix des sites d'épissages, recruter des éléments de la machinerie d'épissage à l'intron, reconnaître les amplificateurs d'épissage exonique et faciliter le retrait des exons adjacents en favorisant le rapprochement des sites d'épissage 5' et 3' (167). Les hnRNPs ont un rôle important dans l'épissage alternatif et constitutif du pré-ARNm. Selon la cible, les hnRNPs peuvent réprimer ou favoriser l'épissage alternatif des pré-ARNm (168). Pour ce qui est d'hnRNP A1, son site de liaison peut chevaucher celui d'une protéine SR. Si c'est le cas, la présence d'une seule molécule d'hnRNP A1 peut abolir la liaison de la protéine SR avec le pré-ARNm (168). Il a aussi été démontré que la localisation cytoplasmique d'hnRNP A1 induite par un stress osmotique ou due à la perturbation du SNL, modifie l'activité de l'épissage alternatif, en altérant le ratio nucléaire SR : hnRNPs (166–169). L'ubiquitination des domaines de liaison à l'ARN d'hnRNP A1 peut aussi modifier l'épissage alternatif en altérant la capacité de liaison au pré-ARNm (170). Puisque de nombreuses conditions modifient l'épissage alternatif, l'étude des conséquences fonctionnelles de l'augmentation d'hnRNP A1B en conditions basales et en condition de stress sur le transcriptome serait nécessaire. Ces

changements pourraient aussi être comparés à ceux observés lorsqu'on exprime les mutations causant la SLA dont la D262V.

Une autre facette du métabolisme de l'ARN altérée dans la SLA est le transport nucléocytoplasmique des ARNm (41,171). Il a été démontré que la déplétion de TDP-43 augmente le niveau nucléaire d'ARNm polyadénylé, ce qui pourrait refléter un problème dans l'exportation des ARNm (34). Il a aussi été démontré qu'hnRNP A1 avait un rôle important dans l'exportation des ARNm à travers l'enveloppe nucléaire vers le cytoplasme (172). En effet, les protéines hnRNP, dont hnRNP A1, se lie rapidement aux pré-ARNm et vont rester associés tout au long de la maturation et de l'exportation de l'ARNm (173). Bien qu'il soit possible que l'augmentation du niveau nucléaire d'ARNm polyadénylé soit due à la perte de TDP-43, il est aussi possible que ce soit un effet en aval, comme l'augmentation d'hnRNP A1B.

De plus, hnRNP A1 a un rôle dans la réponse au stress puisqu'il peut être retrouvé au niveau des granules de stress et que sa déplétion diminue le taux de survie durant et suivant le stress. La phosphorylation des ARNm liés à hnRNP A1 par les protéines kinases Mnk1/2 est nécessaire au recrutement d'hnRNP A1 aux granules de stress (104). De plus, les PrLD, responsable pour les interactions et l'autoassemblage des protéines qui lient l'ARN, faciliteraient l'assemblage des granules de stress(104). Puisque qu'hnRNP A1B, par l'inclusion de l'exon 7B, possède un plus grand PrLD il est possible que son effet dans la réponse au stress soit différent. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour déterminer si l'expression d'hnRNP A1B modifie la taille, le nombre, l'assemblage ou la dissociation des granules de stress ainsi que son effet sur la survie pendant ou suivant un stress.

## **6. Les conséquences d'hnRNP A1B sur le réseau d'interaction protéine-protéine**

Un rapport récent suggère que VCP, hnRNP A1, FUS et TDP-43 constituent le principal réseau d'interaction protéine-protéine dans la SLA classique (174). Ces quatre protéines pourraient être essentielles au développement de la pathologie de la SLA étant donné qu'elles interagissent avec la majorité des protéines impliquées dans la maladie (174). Puisque le PrLD est le médiateur des interactions protéiques hétérotypiques et homotypiques il est possible que l'inclusion de l'exon 7B modifie les interactions protéiques d'hnRNP A1 (117). En comparant les interactions protéiques de hnRNP A1 avec hnRNP A1B, il serait possible d'observer des gains et / ou des pertes d'interactions. Dû à ces changements, il est fort probable que l'augmentation du niveau protéique et la localisation cellulaire d'hnRNP A1B dans les patients SLA avec une protéinopathie de TDP-43 puisse avoir des conséquences sur les voies métaboliques et aval. Une meilleure connaissance des interactions protéiques d'hnRNP A1/A1B nous permettrait de mieux connaître les répercussions d'une augmentation d'hnRNP A1B dans les fonctions cellulaires. Il serait aussi intéressant de vérifier si les changements dans le réseau protéine-protéine engendré par hnRNP A1B sont similaires à ceux engendré par les mutations d'hnRNP A1 causant la SLA.

## **7. Potentiel thérapeutique d'hnRNP A1B**

Puisque l'augmentation du niveau d'hnRNP A1B et son changement de localisation peut avoir un vaste impact sur le métabolisme de l'ARN et sur le réseau d'interaction protéine-

protéine il est possible d'envisager hnRNP A1B comme une cible thérapeutique potentiel. Il faudrait diminuer le niveau protéique d'hnRNP A1B dans le système nerveux central des patients. Un des moyens serait de favoriser l'exclusion de l'exon 7B par l'utilisation d'OAS (175,176). L'étude des changements dans réseau d'interactions protéines-protéines et dans le transcriptome généré par l'augmentation d'hnRNP A1B peut aussi nous indiquer d'autres cibles potentielles en aval d'hnRNP A1B, par exemple *SMN* (176,177). De plus, il serait intéressant d'analyser le niveau d'hnRNP A1B dans les fluides des patients SLA durant la progression de la maladie. Ces données vont nous permettre de déterminer si hnRNP A1B a le potentiel d'être un biomarqueur dans la SLA.

## Conclusion

La SLA est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des neurones moteurs et par une paralysie progressive. Plusieurs mécanismes moléculaires sont considérés comme étant altérés dans la maladie. Les quatre principales classes de mécanismes impliqués sont : la perturbation de la stabilité et de la dégradation des protéines, l'altération de l'homéostasie des protéines qui lient l'ARN et l'ADN, le dysfonctionnement de la fonction du cytosquelette et l'implication des cellules non-neuronales comme modificateur du phénotype de la SLA (17). Bien que ces mécanismes ne puissent être complètement dissociés les uns des autres, nous avons choisi de baser notre étude sur la régulation des protéines qui lie l'ARN, plus précisément sur la régulation d'hnRNP A1 par TDP-43.

Nous avons démontré que TDP-43 lie et régule l'ARNm d'hnRNP A1 en influençant la sélection du site d'épissage de son pré-ARNm. La perte nucléaire de TDP-43 ou sa localisation cytoplasmique entraîne une augmentation de l'isoforme le plus long, hnRNP A1B, en favorisant le site d'épissage 5' proximal ce qui augmente le pourcentage d'inclusion de l'exon 7B. L'élongation du PrLD confère une plus grande propension à la fibrillation *in vitro*, cette propriété se reflète aussi au niveau de la protéine *in vivo* puisque l'expression exogène d'hnRNP A1B génère des agrégats cytoplasmiques de manière comparable à la mutation D262V de la SLA. De plus, l'expression d'hnRNP A1B au lieu d'hnRNP A1 a des conséquences néfastes sur la survie cellulaire. Finalement, nous avons démontré qu'hnRNP A1B est plus abondant et s'accumule dans le cytoplasme des neurones moteurs de la moelle épinière de tissus *post-mortem* de patients SLAs avec une pathologie confirmée de TDP-43 que dans les cas contrôles.

Avec l'immunofluorescence, nous avons aussi constaté que les inclusions cytoplasmiques d'hnRNP A1B ne co-localisent pas avec les inclusions cytoplasmiques de TDP-43.

Collectivement, nos résultats démontrent que la perte nucléaire de TDP-43 contribue à la vulnérabilité et à la perte neuronale par des modifications au niveau de l'épissage d'hnRNP A1. L'isoforme alternatif qui en découle, hnRNP A1B, démontre une plus grande propension à l'agrégation et une toxicité cellulaire accrue. Nous proposons que l'isoforme hnRNP A1B perturbe le métabolisme de l'ARN beaucoup plus largement que prédit et contribue de manière importante à la cascade d'évènements qui entraînent la SLA.

L'expression protéique d'hnRNP A1B est connue depuis presque vingt-cinq ans, cependant nous ne connaissons toujours pas quelles sont ces fonctions et ces cibles. Puisque que cette protéine est régulée à la hausse lors de l'appauvrissement nucléaire de TDP-43 et sachant que TDP-43 a une localisation cytoplasmique aberrante dans la majorité des cas de la SLA et dans la moitié des cas de FTD, étudier les cibles et les fonctions d'hnRNP A1B peut fournir des informations importantes afin de disséquer le réseau de protéines liant l'ARN et les voies métaboliques en aval qui contribuent à la pathogénèse de la SLA.

## Bibliographie

1. Kumar DR, Aslinia F, Yale SH, Mazza JJ. Jean-Martin Charcot: The Father of Neurology. *Clinical Medicine & Research*. 1 mars 2011;9(1):46-9.
2. Charcot J-M, Blin E, Colin H. *Leçon du Mardi à la Salpêtrière*. Paris: Bureau du progrès médical; 1889.
3. Goetz CG. Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle Nerve*. mars 2000;23(3):336-43.
4. Cleveland DW, Rothstein JD. From charcot to lou gehrig: deciphering selective motor neuron death in als. *Nature Reviews Neuroscience*. nov 2001;2(11):806-19.
5. Société de la SLA du Québec - SLA Québec.ca.
6. Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamirano P, et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surgical Neurology International*. 2015;6(1):171.
7. Calvo AC, Manzano R, Mendonça DMF, Muñoz MJ, Zaragoza P, Osta R. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Focus on Disease Progression. *BioMed Research International*. 2014;2014:1-12.
8. Galvin M, Gaffney R, Corr B, Mays I, Hardiman O. From first symptoms to diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: perspectives of an Irish informal caregiver cohort—a thematic analysis. *BMJ Open*. mars 2017;7(3):e014985.
9. Strong MJ, Abrahams S, Goldstein LH, Woolley S, Mclaughlin P, Snowden J, et al. Amyotrophic lateral sclerosis - frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD): Revised diagnostic criteria. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. 5 janv 2017;1-22.
10. Lu H, Le WD, Xie Y-Y, Wang X-P. Current Therapy of Drugs in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(4):314-21.
11. Miller R, Mitchell J, Lyon M, Moore D. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). Dans: *The Cochrane Collaboration*, éditeur. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2002 [cité 30 mars 2017]. Disponible à: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD001447>
12. A second ALS treatment, edaravone, has been newly approved in the United States - ALS Society of Canada.html.
13. Coquery J-M, Jeannerod M. *Neurosciences*. Bruxelles: De Boeck; 2011.

14. Lomen-Hoerth C. Amyotrophic Lateral Sclerosis from Bench to Bedside. *Seminars in Neurology*. avr 2008;28(2):205-11.
15. ALS\_ Amyotrophic Lateral Sclerosis - Signs and Symptoms \_ Muscular Dystrophy Association.html.
16. Arbour D, Vande Velde C, Robitaille R. New perspectives on amyotrophic lateral sclerosis: the role of glial cells at the neuromuscular junction: Neuron-glia interactions at the NMJ in ALS. *The Journal of Physiology*. 1 févr 2017;595(3):647-61.
17. Peters OM, Ghasemi M, Brown RH. Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS. *Journal of Clinical Investigation*. 1 mai 2015;125(5):1767-79.
18. Rochat C, Bernard-Marissal N, Schneider BL. Selective Vulnerability of Neuronal Subtypes in ALS: A Fertile Ground for the Identification of Therapeutic Targets. Dans: Foyaca-Sibat H, Ibañez-Valdés L de F, éditeurs. *Update on Amyotrophic Lateral Sclerosis* [Internet]. InTech; 2016 [cité 29 avr 2017]. Disponible à: <http://www.intechopen.com/books/update-on-amyotrophic-lateral-sclerosis/selective-vulnerability-of-neuronal-subtypes-in-als-a-fertile-ground-for-the-identification-of-thera>
19. Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience*. 6 mars 2013;14(4):248-64.
20. Saberi S, Stauffer JE, Schulte DJ, Ravits J. Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurologic Clinics*. nov 2015;33(4):855-76.
21. Ling S-C, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron*. août 2013;79(3):416-38.
22. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*. 6 oct 2006;314(5796):130-3.
23. Kim HJ, Kim NC, Wang Y-D, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, et al. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*. 3 mars 2013;495(7442):467-73.
24. Zhang Y-J, Gendron TF, Grima JC, Sasaguri H, Jansen-West K, Xu Y-F, et al. C9ORF72 poly(GA) aggregates sequester and impair HR23 and nucleocytoplasmic transport proteins. *Nature Neuroscience*. 21 mars 2016;19(5):668-77.
25. Blokhuis AM, Groen EJM, Koppers M, van den Berg LH, Pasterkamp RJ. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*. juin 2013;125(6):777-94.



26. Vande Velde C, Dion PA, Rouleau GA. Amyotrophic lateral sclerosis: new genes, new models, and new mechanisms. *F1000 Biology Reports* [Internet]. 1 sept 2011 [cité 2 mai 2017];3. Disponible à: <http://www.f1000.com/reports/b/3/18>
27. Boylan K. Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurologic Clinics*. nov 2015;33(4):807-30.
28. Bozzoni V. Amyotrophic lateral sclerosis and environmental factors. *Functional Neurology* [Internet]. 2016 [cité 2 mai 2017]; Disponible à: <http://www.functionalneurology.com/common/php/portiere.php?ID=991bdc127c27bfb35e64ec56a97a02c8>
29. Brenner D, Müller K, Wieland T, Weydt P, Böhm S, Lulé D, et al. *NEK1* mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. mai 2016;139(5):e28-e28.
30. Gómez-Tortosa E, Van der Zee J, Ruggiero M, Gijssels I, Esteban-Pérez J, García-Redondo A, et al. Familial primary lateral sclerosis or dementia associated with Arg573Gly *TBK1* mutation. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1 avr 2017;jnnp-2016-315250.
31. Ji A-L, Zhang X, Chen W-W, Huang W-J. Genetics insight into the amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia spectrum. *Journal of Medical Genetics*. mars 2017;54(3):145-54.
32. Ludtmann MH, Arber C, Bartolome F, de Vicente M, Preza E, Carro E, et al. Mutations in valosin-containing protein (VCP) decrease ADP/ATP translocation across the mitochondrial membrane and impair energy metabolism in human neurons. *Journal of Biological Chemistry*. 30 mars 2017;jbc.M116.762898.
33. Oakes JA, Davies MC, Collins MO. *TBK1*: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation. *Molecular Brain* [Internet]. déc 2017 [cité 5 mai 2017];10(1). Disponible à: <http://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-017-0287-x>
34. Aulas A, Caron G, Gkogkas CG, Mohamed N-V, Destroismaisons L, Sonenberg N, et al. *G3BP1* promotes stress-induced RNA granule interactions to preserve polyadenylated mRNA. *The Journal of Cell Biology*. 13 avr 2015;209(1):73-84.
35. Aulas A, Vande Velde C. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Frontiers in Cellular Neuroscience* [Internet]. 23 oct 2015 [cité 1 mai 2017];9. Disponible à: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00423/abstract>
36. Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *The Journal of Cell Biology*. 29 avr 2013;201(3):361-72.

37. Redler RL, Dokholyan NV. The Complex Molecular Biology of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Dans: Progress in Molecular Biology and Translational Science [Internet]. Elsevier; 2012 [cité 1 mai 2017]. p. 215-62. Disponible à: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123858832000023>
38. Grad LI, Fernando SM, Cashman NR. From molecule to molecule and cell to cell: Prion-like mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*. mai 2015;77:257-65.
39. Haeusler AR, Donnelly CJ, Rothstein JD. The expanding biology of the C9orf72 nucleotide repeat expansion in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 6 mai 2016;17(6):383-95.
40. Mohagheghi F, Prudencio M, Stuani C, Cook C, Jansen-West K, Dickson DW, et al. TDP-43 functions within a network of hnRNP proteins to inhibit the production of a truncated human SORT1 receptor. *Human Molecular Genetics*. 1 févr 2016;25(3):534-45.
41. Boeynaems S, Bogaert E, Van Damme P, Van Den Bosch L. Inside out: the role of nucleocytoplasmic transport in ALS and FTLN. *Acta Neuropathologica*. août 2016;132(2):159-73.
42. Shang J, Yamashita T, Nakano Y, Morihara R, Li X, Feng T, et al. Aberrant distributions of nuclear pore complex proteins in ALS mice and ALS patients. *Neuroscience*. mai 2017;350:158-68.
43. Cruz SD, Cleveland DW. Disrupted nuclear import-export in neurodegeneration. *Science*. 8 janv 2016;351(6269):125-6.
44. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments at a glance. *Journal of Cell Science*. 15 juill 2012;125(14):3257-63.
45. Weydt P, Oeckl P, Huss A, Müller K, Volk AE, Kuhle J, et al. Neurofilament levels as biomarkers in asymptomatic and symptomatic familial amyotrophic lateral sclerosis: Biomarkers in ALS. *Annals of Neurology*. janv 2016;79(1):152-8.
46. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *The Journal of Cell Biology*. 14 déc 2009;187(6):761-72.
47. Lee J, Hyeon SJ, Im H, Ryu H, Kim Y, Ryu H. Astrocytes and Microglia as Non-cell Autonomous Players in the Pathogenesis of ALS. *Experimental Neurobiology*. 2016;25(5):233.
48. Philips T, Bento-Abreu A, Nonneman A, Haack W, Staats K, Geelen V, et al. Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. févr 2013;136(2):471-82.

49. Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, et al. Microglia Induce Motor Neuron Death via the Classical NF- $\kappa$ B Pathway in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron*. mars 2014;81(5):1009-23.
50. Muyderman H, Chen T. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis - a valid pharmacological target?: Mitochondrial dysfunction in ALS. *British Journal of Pharmacology*. avr 2014;171(8):2191-205.
51. Pickles S, Destroismaisons L, Peyrard SL, Cadot S, Rouleau GA, Brown RH, et al. Mitochondrial damage revealed by immunoselection for ALS-linked misfolded SOD1. *Human Molecular Genetics*. 1 oct 2013;22(19):3947-59.
52. Foran E, Trotti D. Glutamate Transporters and the Excitotoxic Path to Motor Neuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxidants & Redox Signaling*. juill 2009;11(7):1587-602.
53. Wang W-Y, Pan L, Su SC, Quinn EJ, Sasaki M, Jimenez JC, et al. Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nature Neuroscience*. 15 sept 2013;16(10):1383-91.
54. Rabinovici GD, Miller BL. Frontotemporal Lobar Degeneration: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis and Management. *CNS Drugs*. mai 2010;24(5):375-98.
55. Alzheimer association - [www.alz.org.html](http://www.alz.org.html).
56. Strong MJ, Abrahams S, Goldstein LH, Woolley S, Mclaughlin P, Snowden J, et al. Amyotrophic lateral sclerosis - frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD): Revised diagnostic criteria. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. 3 avr 2017;18(3-4):153-74.
57. Ji A-L, Zhang X, Chen W-W, Huang W-J. Genetics insight into the amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia spectrum. *Journal of Medical Genetics*. mars 2017;54(3):145-54.
58. Strong MJ, Abrahams S, Goldstein LH, Woolley S, Mclaughlin P, Snowden J, et al. Amyotrophic lateral sclerosis - frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD): Revised diagnostic criteria. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 5 janv 2017;1-22.
59. Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*. 15 avr 2010;19(R1):R46-64.
60. Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology*. oct 2010;9(10):995-1007.

61. Che M-X, Jiang Y-J, Xie Y-Y, Jiang L-L, Hu H-Y. Aggregation of the 35-kDa fragment of TDP-43 causes formation of cytoplasmic inclusions and alteration of RNA processing. *The FASEB Journal*. 1 juill 2011;25(7):2344-53.
62. Xiao S, Sanelli T, Chiang H, Sun Y, Chakrabartty A, Keith J, et al. Low molecular weight species of TDP-43 generated by abnormal splicing form inclusions in amyotrophic lateral sclerosis and result in motor neuron death. *Acta Neuropathologica*. juill 2015;130(1):49-61.
63. Lee EB, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience* [Internet]. 30 nov 2011 [cité 14 mars 2017]; Disponible à: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrn3121>
64. Sephton CF, Cenik C, Kucukural A, Dammer EB, Cenik B, Han Y, et al. Identification of Neuronal RNA Targets of TDP-43-containing Ribonucleoprotein Complexes. *Journal of Biological Chemistry*. 14 janv 2011;286(2):1204-15.
65. Scotter EL, Chen H-J, Shaw CE. TDP-43 Proteinopathy and ALS: Insights into Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics*. avr 2015;12(2):352-63.
66. Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology*. oct 2010;9(10):995-1007.
67. Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*. 15 avr 2010;19(R1):R46-64.
68. Amlie-Wolf A, Ryvkin P, Tong R, Dragomir I, Suh E, Xu Y, et al. Transcriptomic Changes Due to Cytoplasmic TDP-43 Expression Reveal Dysregulation of Histone Transcripts and Nuclear Chromatin. Buratti E, éditeur. *PLOS ONE*. 28 oct 2015;10(10):e0141836.
69. Woo J-S, Kim VN. MeCP2 Caught Moonlighting as a Suppressor of MicroRNA Processing. *Developmental Cell*. mars 2014;28(5):477-8.
70. Scotter EL, Chen H-J, Shaw CE. TDP-43 Proteinopathy and ALS: Insights into Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics*. avr 2015;12(2):352-63.
71. Gendron TF, Josephs KA, Petrucelli L. Review: Transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43): mechanisms of neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. avr 2010;36(2):97-112.
72. Mohagheghi F, Prudencio M, Stuani C, Cook C, Jansen-West K, Dickson DW, et al. TDP-43 functions within a network of hnRNP proteins to inhibit the production of a truncated human SORT1 receptor. *Human Molecular Genetics*. 1 févr 2016;25(3):534-45.

73. Mackenzie IR, Rademakers R. The role of transactive response DNA-binding protein-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: Current Opinion in Neurology. déc 2008;21(6):693-700.
74. Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. The Journal of Cell Biology. 29 avr 2013;201(3):361-72.
75. Aulas A, Vande Velde C. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Frontiers in Cellular Neuroscience* [Internet]. 23 oct 2015 [cité 6 mai 2017];9. Disponible à: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00423/abstract>
76. McDonald KK, Aulas A, Destroismaisons L, Pickles S, Beleac E, Camu W, et al. TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Human Molecular Genetics*. 1 avr 2011;20(7):1400-10.
77. Aulas A, Stabile S, Vande Velde C. Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP. *Molecular Neurodegeneration* [Internet]. déc 2012 [cité 28 mars 2017];7(1). Disponible à: <http://moleculareurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1326-7-54>
78. Kawahara Y, Mieda-Sato A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 28 févr 2012;109(9):3347-52.
79. Walker AK, Daniels CML, Goldman JE, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, Messing A. Astrocytic TDP-43 Pathology in Alexander Disease. *Journal of Neuroscience*. 7 mai 2014;34(19):6448-58.
80. Lyst MJ, Bird A. Rett syndrome: a complex disorder with simple roots. *Nature Reviews Genetics*. 3 mars 2015;16(5):261-75.
81. Wider C, Dickson DW, Stoessl AJ, Tsuboi Y, Chapon F, Gutmann L, et al. Pallidonigral TDP-43 pathology in Perry syndrome. *Parkinsonism & Related Disorders*. mai 2009;15(4):281-6.
82. Chang X-L, Tan M-S, Tan L, Yu J-T. The Role of TDP-43 in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*. juill 2016;53(5):3349-59.
83. Nakashima-Yasuda H, Uryu K, Robinson J, Xie SX, Hurtig H, Duda JE, et al. Comorbidity of TDP-43 proteinopathy in Lewy body related diseases. *Acta Neuropathologica*. 3 août 2007;114(3):221-9.
84. Schwab C, Arai T, Hasegawa M, Yu S, McGeer PL. Colocalization of Transactivation-Responsive DNA-Binding Protein 43 and Huntingtin in Inclusions of Huntington Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. déc 2008;67(12):1159-65.

85. Arnold ES, Ling S-C, Huelga SC, Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Ditsworth D, et al. ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 19 févr 2013;110(8):E736-45.
86. Zhang Y-J, Xu Y-F, Cook C, Gendron TF, Roettges P, Link CD, et al. Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 5 mai 2009;106(18):7607-12.
87. Xiao S, Sanelli T, Chiang H, Sun Y, Chakrabartty A, Keith J, et al. Low molecular weight species of TDP-43 generated by abnormal splicing form inclusions in amyotrophic lateral sclerosis and result in motor neuron death. *Acta Neuropathologica*. juill 2015;130(1):49-61.
88. Brettschneider J, Arai K, Del Tredici K, Toledo JB, Robinson JL, Lee EB, et al. TDP-43 pathology and neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *Acta Neuropathologica*. sept 2014;128(3):423-37.
89. Weihl CC, Temiz P, Miller SE, Watts G, Smith C, Forman M, et al. TDP-43 accumulation in inclusion body myopathy muscle suggests a common pathogenic mechanism with frontotemporal dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1 oct 2008;79(10):1186-9.
90. Kim PY, Tan O, Liu B, Trahair T, Liu T, Haber M, et al. High TDP43 expression is required for TRIM16-induced inhibition of cancer cell growth and correlated with good prognosis of neuroblastoma and breast cancer patients. *Cancer Letters*. mai 2016;374(2):315-23.
91. Jean-Philippe J, Paz S, Caputi M. hnRNP A1: The Swiss Army Knife of Gene Expression. *International Journal of Molecular Sciences*. 16 sept 2013;14(9):18999-9024.
92. Jean-Philippe J, Paz S, Caputi M. hnRNP A1: The Swiss Army Knife of Gene Expression. *International Journal of Molecular Sciences*. 16 sept 2013;14(9):18999-9024.
93. Bekenstein U, Soreq H. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in health and neurodegenerative disease: From structural insights to post-transcriptional regulatory roles. *Molecular and Cellular Neuroscience*. sept 2013;56:436-46.
94. Pollard VW, Michael WM, Nakielnny S, Siomi MC, Wang F, Dreyfuss G. A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell*. 20 sept 1996;86(6):985-94.
95. Bekenstein U, Soreq H. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in health and neurodegenerative disease: From structural insights to post-transcriptional regulatory roles. *Molecular and Cellular Neuroscience*. sept 2013;56:436-46.

96. Chabot B, Blanchette M, Lapierre I, La Branche H. An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1. *Mol Cell Biol.* avr 1997;17(4):1776-86.
97. Simard MJ, Chabot B. Control of hnRNP A1 alternative splicing: an intron element represses use of the common 3' splice site. *Mol Cell Biol.* oct 2000;20(19):7353-62.
98. Blanchette M. Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *The EMBO Journal.* 1 avr 1999;18(7):1939-52.
99. Blanchette M. Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *The EMBO Journal.* 1 avr 1999;18(7):1939-52.
100. Lemieux B, Blanchette M, Monette A, Mouland AJ, Wellinger RJ, Chabot B. A Function for the hnRNP A1/A2 Proteins in Transcription Elongation. Caputi M, éditeur. *PLOS ONE.* 26 mai 2015;10(5):e0126654.
101. Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nature Genetics.* août 2003;34(4):460-3.
102. Kashima T, Rao N, David CJ, Manley JL. hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Human Molecular Genetics.* 12 sept 2007;16(24):3149-59.
103. Del Gatto-Konczak F, Olive M, Gesnel MC, Breathnach R. hnRNP A1 recruited to an exon in vivo can function as an exon splicing silencer. *Mol Cell Biol.* janv 1999;19(1):251-60.
104. Guil S, Long JC, Caceres JF. hnRNP A1 Relocalization to the Stress Granules Reflects a Role in the Stress Response. *Molecular and Cellular Biology.* 1 août 2006;26(15):5744-58.
105. Fisette J-F, Toutant J, Dugre-Brisson S, Desgroseillers L, Chabot B. hnRNP A1 and hnRNP H can collaborate to modulate 5' splice site selection. *RNA.* 1 janv 2010;16(1):228-38.
106. Zhang Q-S. hnRNP A1 associates with telomere ends and stimulates telomerase activity. *RNA.* 17 avr 2006;12(6):1116-28.
107. Damiano F, Rochira A, Tocci R, Alemanno S, Gnani A, Siculella L. hnRNP A1 mediates the activation of the IRES-dependent SREBP-1a mRNA translation in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochemical Journal.* 15 janv 2013;449(2):543-53.
108. Shi Y, Frost P, Hoang B, Benavides A, Gera J, Lichtenstein A. IL-6-induced Enhancement of c-Myc Translation in Multiple Myeloma Cells: CRITICAL ROLE OF CYTOPLASMIC LOCALIZATION OF THE RNA-BINDING PROTEIN hnRNP A1. *Journal of Biological Chemistry.* 7 janv 2011;286(1):67-78.

109. Michlewski G, Guil S, Cáceres JF. Stimulation of pri-miR-18a Processing by hnRNP A1. Dans: Großhans H, éditeur. Regulation of microRNAs [Internet]. New York, NY: Springer US; 2010 [cité 2 mai 2017]. p. 28-35. Disponible à: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-7823-3\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-7823-3_3)
110. Liu Q, Shu S, Wang RR, Liu F, Cui B, Guo XN, et al. Whole-exome sequencing identifies a missense mutation in *hnRNPA1* in a family with flail arm ALS. *Neurology*. 25 oct 2016;87(17):1763-9.
111. Honda H, Hamasaki H, Wakamiya T, Koyama S, Suzuki SO, Fujii N, et al. Loss of hnRNPA1 in ALS spinal cord motor neurons with TDP-43-positive inclusions: Loss of hnRNPA1 in ALS motor neurons. *Neuropathology*. févr 2015;35(1):37-43.
112. Kanekura K, Yagi T, Cammack AJ, Mahadevan J, Kuroda M, Harms MB, et al. Polypeptides encoded by the C9ORF72 repeats block global protein translation. *Human Molecular Genetics*. 1 mai 2016;25(9):1803-13.
113. Lin Y, Protter DSW, Rosen MK, Parker R. Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins. *Molecular Cell*. oct 2015;60(2):208-19.
114. Mayeda A, Munroe SH, Cáceres JF, Krainer AR. Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins. *EMBO J*. 15 nov 1994;13(22):5483-95.
115. Takanashi K, Yamaguchi A. Aggregation of ALS-linked FUS mutant sequesters RNA binding proteins and impairs RNA granules formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. sept 2014;452(3):600-7.
116. Gilpin KM, Chang L, Monteiro MJ. ALS-linked mutations in ubiquilin-2 or hnRNPA1 reduce interaction between ubiquilin-2 and hnRNPA1. *Human Molecular Genetics*. 1 mai 2015;24(9):2565-77.
117. Li Y, Collins M, An J, Geiser R, Tegeler T, Tsantilas K, et al. Immunoprecipitation and mass spectrometry defines an extensive RBM45 protein–protein interaction network. *Brain Research*. sept 2016;1647:79-93.
118. Donev R, Newall A, Thome J, Sheer D. A role for SC35 and hnRNPA1 in the determination of amyloid precursor protein isoforms. *Molecular Psychiatry*. juill 2007;12(7):681-90.
119. Liu X-Y, Li H-L, Su J-B, Ding F-H, Zhao J-J, Chai F, et al. Regulation of RAGE splicing by hnRNP A1 and Tra2 $\beta$ -1 and its potential role in AD pathogenesis. *Journal of Neurochemistry*. avr 2015;133(2):187-98.
120. Pedrotti S, Sette C. Spinal muscular atrophy: A new player joins the battle for *SMN2* exon 7 splicing. *Cell Cycle*. oct 2010;9(19):3874-9.



121. Bebee TW, Gladman JT, Chandler DS. Splicing of the Survival Motor Neuron genes and implications for treatment of SMA. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 01 2010;15:1191-204.
122. Koed Doktor T, Schroeder LD, Vested A, Palmfeldt J, Andersen HS, Gregersen N, et al. SMN2 exon 7 splicing is inhibited by binding of hnRNP A1 to a common ESS motif that spans the 3' splice site. *Human Mutation*. févr 2011;32(2):220-30.
123. Jn D, La G. Antibodies to the RNA Binding Protein Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Colocalize to Stress Granules Resulting in Altered RNA and Protein Levels in a Model of Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. *Journal of Clinical & Cellular Immunology [Internet]*. 2016 [cité 6 mai 2017];07(02). Disponible à: <https://www.omicsonline.org/open-access/antibodies-to-the-rna-binding-protein-heterogeneous-nuclear-ribonucleoprotein-a1-colocalize-to-stress-granules-resulting-in-altere-2155-9899-1000402.php?aid=71461>
124. Lee S, Levin M. Novel somatic single nucleotide variants within the RNA binding protein hnRNP A1 in multiple sclerosis patients. *F1000Research [Internet]*. 18 sept 2014 [cité 6 mai 2017]; Disponible à: <http://f1000research.com/articles/3-132/v2>
125. Pinkus JL, Amato AA, Taylor JP, Greenberg SA. Abnormal distribution of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in sporadic inclusion body myositis. *Neuromuscular Disorders*. juill 2014;24(7):611-6.
126. Gami-Patel P, Bandopadhyay R, Brelstaff J, Revesz T, Lashley T. The presence of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in frontotemporal lobar degeneration with FUS-positive inclusions. *Neurobiology of Aging*. oct 2016;46:192-203.
127. Noguchi E, Homma Y, Kang X, Netea MG, Ma X. A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nature Immunology*. mai 2009;10(5):471-9.
128. Li Z, Liu X, Wang S, Li J, Hou M, Liu G, et al. Identification of a nucleotide in 5' untranslated region contributing to virus replication and virulence of Coxsackievirus A16. *Scientific Reports [Internet]*. août 2016 [cité 6 mai 2017];6(1). Disponible à: <http://www.nature.com/articles/srep20839>
129. Shi ST. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates RNA synthesis of a cytoplasmic virus. *The EMBO Journal*. 1 sept 2000;19(17):4701-11.
130. Sebban S, Golan-Gerstl R, Karni R, Vaksman O, Davidson B, Reich R. Alternatively spliced lysyl oxidase-like 4 isoforms have a pro-metastatic role in cancer. *Clinical & Experimental Metastasis*. janv 2013;30(1):103-17.
131. Jo OD, Martin J, Bernath A, Masri J, Lichtenstein A, Gera J. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Regulates Cyclin D1 and c-myc Internal Ribosome Entry Site Function through Akt Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 22 août 2008;283(34):23274-87.

132. Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Disturbance of Nuclear and Cytoplasmic TAR DNA-binding Protein (TDP-43) Induces Disease-like Redistribution, Sequestration, and Aggregate Formation. *Journal of Biological Chemistry*. 9 mai 2008;283(19):13302-9.
133. Yang X, Bani MR, Lu SJ, Rowan S, Ben-David Y, Chabot B. The A1 and A1B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulate 5' splice site selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 19 juill 1994;91(15):6924-8.
134. Keller BA, Volkening K, Droppelmann CA, Ang LC, Rademakers R, Strong MJ. Co-aggregation of RNA binding proteins in ALS spinal motor neurons: evidence of a common pathogenic mechanism. *Acta Neuropathologica*. nov 2012;124(5):733-47.
135. Xiao S, Sanelli T, Chiang H, Sun Y, Chakrabartty A, Keith J, et al. Low molecular weight species of TDP-43 generated by abnormal splicing form inclusions in amyotrophic lateral sclerosis and result in motor neuron death. *Acta Neuropathologica*. juill 2015;130(1):49-61.
136. Prpar Mihevc S, Baralle M, Buratti E, Rogelj B. TDP-43 aggregation mirrors TDP-43 knockdown, affecting the expression levels of a common set of proteins. *Scientific Reports*. 26 sept 2016;6:33996.
137. Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Disturbance of Nuclear and Cytoplasmic TAR DNA-binding Protein (TDP-43) Induces Disease-like Redistribution, Sequestration, and Aggregate Formation. *Journal of Biological Chemistry*. 9 mai 2008;283(19):13302-9.
138. Blanchette M, Chabot B. A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B. *RNA*. avr 1997;3(4):405-19.
139. Buvoli M, Cobianchi F, Bestagno MG, Mangiarotti A, Bassi MT, Biamonti G, et al. Alternative splicing in the human gene for the core protein A1 generates another hnRNP protein. *EMBO J*. avr 1990;9(4):1229-35.
140. Chabot B, Blanchette M, Lapierre I, La Branche H. An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1. *Mol Cell Biol*. avr 1997;17(4):1776-86.
141. Wang I-F, Wu L-S, Chang H-Y, Shen C-KJ. TDP-43, the signature protein of FTL-DU, is a neuronal activity-responsive factor. *Journal of Neurochemistry*. mai 2008;105(3):797-806.
142. Tollervy JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, et al. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nature Neuroscience*. avr 2011;14(4):452-8.

143. Colombrita C, Onesto E, Buratti E, de la Grange P, Gumina V, Baralle FE, et al. From transcriptomic to protein level changes in TDP-43 and FUS loss-of-function cell models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. déc 2015;1849(12):1398-410.
144. Mohagheghi F, Prudencio M, Stuani C, Cook C, Jansen-West K, Dickson DW, et al. TDP-43 functions within a network of hnRNP proteins to inhibit the production of a truncated human SORT1 receptor. *Human Molecular Genetics*. 1 févr 2016;25(3):534-45.
145. Molliex A, Temirov J, Lee J, Coughlin M, Kanagaraj AP, Kim HJ, et al. Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization. *Cell*. sept 2015;163(1):123-33.
146. Goldschmidt L, Teng PK, Riek R, Eisenberg D. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 23 févr 2010;107(8):3487-92.
147. Hudson SA, Ecroyd H, Kee TW, Carver JA. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds: Exogenous compounds can bias thioflavin T assays. *FEBS Journal*. oct 2009;276(20):5960-72.
148. Ben-David Y, Bani MR, Chabot B, De Koven A, Bernstein A. Retroviral insertions downstream of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 gene in erythroleukemia cells: evidence that A1 is not essential for cell growth. *Mol Cell Biol*. oct 1992;12(10):4449-55.
149. Labaj PP, Leparac GG, Linggi BE, Markillie LM, Wiley HS, Kreil DP. Characterization and improvement of RNA-Seq precision in quantitative transcript expression profiling. *Bioinformatics*. 1 juill 2011;27(13):i383-91.
150. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*. 2 mars 2014;32(4):347-55.
151. Conicella AE, Zerze GH, Mittal J, Fawzi NL. ALS Mutations Disrupt Phase Separation Mediated by  $\alpha$ -Helical Structure in the TDP-43 Low-Complexity C-Terminal Domain. *Structure*. sept 2016;24(9):1537-49.
152. Patel A, Lee HO, Jawerth L, Maharana S, Jahnel M, Hein MY, et al. A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell*. août 2015;162(5):1066-77.
153. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *The Journal of Cell Biology*. 14 déc 2009;187(6):761-72.

154. Julien J-P, Kriz J. Transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. nov 2006;1762(11-12):1013-24.
155. McGoldrick P, Joyce PI, Fisher EMC, Greensmith L. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. sept 2013;1832(9):1421-36.
156. Scott M, Foster D, Mirenda C, Serban D, Coufal F, Wälchli M, et al. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*. 1 déc 1989;59(5):847-57.
157. Bodansky A, Kim JM 'Hugo', Tempest L, Velagapudi A, Libby R, Ravits J. TDP-43 and ubiquitinated cytoplasmic aggregates in sporadic ALS are low frequency and widely distributed in the lower motor neuron columns independent of disease spread. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. janv 2010;11(3):321-7.
158. Spiller KJ, Restrepo CR, Khan T, Stieber AM, Kwong LK, Trojanowski JQ, et al. Progression of motor neuron disease is accelerated and the ability to recover is compromised with advanced age in rNLS8 mice. *Acta Neuropathologica Communications* [Internet]. déc 2016 [cité 30 avr 2017];4(1). Disponible à: <http://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-016-0377-5>
159. Chew J, Gendron TF, Prudencio M, Sasaguri H, Zhang Y-J, Castanedes-Casey M, et al. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science*. 5 juin 2015;348(6239):1151-4.
160. Brosseau J-P, Lucier J-F, Lamarche A-A, Shkreta L, Gendron D, Lapointe E, et al. Redirecting splicing with bifunctional oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*. 1 avr 2014;42(6):e40-e40.
161. Havens MA, Duelli DM, Hastings ML. Targeting RNA splicing for disease therapy. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. mai 2013;4(3):247-66.
162. Sazani P, Kole R. Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing. *Journal of Clinical Investigation*. 15 août 2003;112(4):481-6.
163. Liu Q, Liu F, Cui B, Lu CX, Guo XN, Wang RR, et al. Mutation spectrum of Chinese patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. nov 2016;87(11):1272-4.
164. Bruun GH, Doktor TK, Borch-Jensen J, Masuda A, Krainer AR, Ohno K, et al. Global identification of hnRNP A1 binding sites for SSO-based splicing modulation. *BMC Biology* [Internet]. déc 2016 [cité 28 mars 2017];14(1). Disponible à: <http://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-016-0279-9>

165. Geissler R, Simkin A, Floss D, Patel R, Fogarty EA, Scheller J, et al. A widespread sequence-specific mRNA decay pathway mediated by hnRNPs A1 and A2/B1. *Genes & Development*. 1 mai 2016;30(9):1070-85.
166. Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Muñoz MJ, Wengier D, Quadrana L, et al. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nature Structural & Molecular Biology*. déc 2005;12(12):1037-44.
167. Zhu J. Pre-mRNA splicing in the absence of an SR protein RS domain. *Genes & Development*. 15 déc 2000;14(24):3166-78.
168. Martinez-Contreras R, Cloutier P, Shkreta L, Fiset J-F, Revil T, Chabot B. hnRNP Proteins and Splicing Control. Dans: Blencowe BJ, Graveley BR, éditeurs. *Alternative Splicing in the Postgenomic Era* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2007 [cité 30 avr 2017]. p. 123-47. Disponible à: [http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-77374-2\\_8](http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-77374-2_8)
169. Guil S, Long JC, Caceres JF. hnRNP A1 Relocalization to the Stress Granules Reflects a Role in the Stress Response. *Molecular and Cellular Biology*. 1 août 2006;26(15):5744-58.
170. Fang J, Bolanos LC, Choi K, Liu X, Christie S, Akunuru S, et al. Ubiquitination of hnRNPA1 by TRAF6 links chronic innate immune signaling with myelodysplasia. *Nature Immunology*. 26 déc 2016;18(2):236-45.
171. Zhang K, Grima JC, Rothstein JD, Lloyd TE. Nucleocytoplasmic transport in *C9orf72*-mediated ALS/FTD. *Nucleus*. 25 avr 2016;7(2):132-7.
172. Visa N, Alzhanova-Ericsson AT, Sun X, Kiseleva E, Björkroth B, Wurtz T, et al. A pre-mRNA-binding protein accompanies the RNA from the gene through the nuclear pores and into polysomes. *Cell*. 26 janv 1996;84(2):253-64.
173. Mili S, Shu HJ, Zhao Y, Pinol-Roma S. Distinct RNP Complexes of Shuttling hnRNP Proteins with Pre-mRNA and mRNA: Candidate Intermediates in Formation and Export of mRNA. *Molecular and Cellular Biology*. 1 nov 2001;21(21):7307-19.
174. Mao Y, Kuo S-W, Chen L, Heckman CJ, Jiang MC. The essential and downstream common proteins of amyotrophic lateral sclerosis: A protein-protein interaction network analysis. Le W, éditeur. *PLOS ONE*. 10 mars 2017;12(3):e0172246.
175. Palhais B, Praestegaard VS, Sabaratnam R, Doktor TK, Lutz S, Burda P, et al. Splice-shifting oligonucleotide (SSO) mediated blocking of an exonic splicing enhancer (ESE) created by the prevalent c.903+469T>C MTRR mutation corrects splicing and restores enzyme activity in patient cells. *Nucleic Acids Research*. 19 mai 2015;43(9):4627-39.
176. Bebee TW, Gladman JT, Chandler DS. Splicing of the Survival Motor Neuron genes and implications for treatment of SMA. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 01 2010;15:1191-204.

177. Sun S, Ling S-C, Qiu J, Albuquerque CP, Zhou Y, Tokunaga S, et al. ALS-causative mutations in FUS/TLS confer gain and loss of function by altered association with SMN and U1-snRNP. *Nature Communications*. 27 janv 2015;6:6171.

