

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PERTURBATION DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DANS UN MODÈLE IN VITRO DE
LA SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE JUVÉNILE : RÔLE DE LA PROTÉINE
SIGMA-1R

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

VINA BANOUVONG

AOÛT 2025

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais avant tout exprimer mon immense gratitude envers mon directeur de recherche, Professeur Saïd Kourrich, pour avoir misé sur moi et de m'avoir donné une chance dans son équipe lorsque j'étais à la recherche d'un stage. Je me souviens de la joie qui m'a envahie lorsque j'ai appris que j'allais continuer en maîtrise au même laboratoire. Son encouragement constant et sa bienveillance continuelle ont fortement soutenu mon travail au laboratoire. Je suis extrêmement reconnaissante du temps et de la patience qu'il m'a attribués durant ma maîtrise. Je tiens à cœur chaque discussion que nous avons eues de même pour tous les conseils précieux qu'il m'a permis de m'approprier grâce à son expertise. Je me compte chanceuse d'avoir pu faire ma maîtrise au sein de son laboratoire.

Je voudrais également remercier énormément ma co-directrice, Professeure Véronik Lachance, grâce à qui j'ai acquis autant de techniques. J'apprécierai pour toujours les efforts qu'elle a mis sur ma formation et sur ma supervision. Elle m'a aidé à m'améliorer la qualité de mon travail écrit en plus de mon travail pratique. Sa persévérance et sa persistance dans mon apprentissage m'ont aidée à continuer mon travail de recherche avec confiance. Je suis honorée qu'elle ait consacré autant d'heures inestimables pour m'aider à faire valoir mes travaux et à embellir mon expérience dans mes études.

Je considère aussi mes collègues de laboratoire qui ont rendu mes journées au travail agréables et divertissantes. C'était un plaisir de passer mes journées à vos côtés et de partager des conversations avec vous. Je réalise comment il est difficile de trouver une équipe qui s'entend aussi bien et je vois la chance que nous avons eue.

Finalement, mon entourage, ma famille et mes amis, je vous remercie de tout mon cœur pour votre accompagnement dans cette étape de ma vie. Ce n'était pas facile, j'ai eu des bons moments comme des mauvais. Vous m'avez permis de conserver ma joie de vivre durant toutes ces périodes. Merci.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	ix
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xii
RÉSUMÉ.....	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
1.1 Sclérose latérale amyotrophique (SLA).....	4
1.1.1 Différentes formes de SLA	5
1.1.2 Variants connus.....	6
1.2 Sigma-1R (S1R).....	8
1.2.1 Structure	9
1.2.2 États d'oligomérisation et activation.....	12
1.2.3 Localisation et fonctions	15
1.3 Autophagie.....	19
1.3.1 Mécanisme général.....	20
1.3.2 Induction	20
1.3.2.1 Séquestration et chargement.....	21
1.3.2.2 Maturation et fusion	22
1.3.2.3 Dégradation	23
1.3.3 Marqueurs d'activité autophagique.....	23
1.3.4 S1R, activité autophagique et SLA	24
1.4 Activité neuronale.....	25
1.4.1 Transmission synaptique.....	27
1.4.2 Excitabilité intrinsèque.....	28
1.4.3 Canaux potassiques voltage-dépendants (Kv)	30
1.4.3.1 Sous-unités auxiliaires (β).....	33
1.4.4 S1R, Kv et SLA.....	33
1.5 Problématique	34
1.6 Objectifs de recherche	34

CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	36
2.1 Réactifs	36
2.2 Anticorps.....	36
2.3 Culture cellulaire	36
2.4 Construction de plasmides	37
2.5 Transfection	38
2.6 Lignées cellulaires stables	39
2.7 Traitements	39
2.7.1 Localisation	39
2.7.2 Autophagie	39
2.7.3 Kv1.2.....	40
2.8 Extraction, quantification et dénaturation de protéines	40
2.9 Fractionnement	40
2.9.1 Triton-X-100 soluble et insoluble	41
2.9.2 Total, cytoplasmique et nucléaire	41
2.10 Immunoprécipitation.....	41
2.11 Immunobuvardage	42
2.12 ELISA	43
2.13 Densitométrie.....	43
2.14 Analyse statistique	43
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....	45
3.1 Le variant E102Q augmente l'accumulation de dimères insolubles de S1R.....	45
3.2 Le variant cause l'accumulation de la protéine de liaison à l'ARN, TDP43, au niveau nucléaire.	50
3.3 Les niveaux d'expression des marqueurs autophagiques p62 et LC3B-I sont perturbés par le variant E102Q.	52
3.4 La présence de S1R avec un agoniste augmente davantage l'expression de surface de Kv1.2 que son variant.	55
CHAPITRE 4 DISCUSSION.....	59
4.1 Effets du variant E102Q sur la solubilité et la localisation de S1R.....	60
4.2 Impact du variant sur le transport nucléocytoplasmique de TDP43.....	64
4.3 Fonctions autophagiques perturbées par E102Q	65
4.4 Rôle du variant dans l'action de S1R sur l'expression du canal Kv1.2 à la surface cellulaire	69

CONCLUSION	74
ANNEXE A IMAGES BRUTES.....	78
RÉFÉRENCES.....	88

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Schéma montrant les différentes parties impliquées dans les cas de SLA à début spinal (gauche) versus bulbaire (droite).....	6
Figure 1.2 : Schéma représentatif résumant les différentes formes de la SLA et les principaux gènes impliqués (<i>C9ORF72</i> , <i>SOD1</i> , <i>FUS</i> , <i>TARDBP</i> et <i>SIGMAR1</i>).....	8
Figure 1.3 : Schéma représentatif de la structure du variant de transcription 1 de <i>SIGMAR1</i> et des différents isoformes protéiques chez l'humain. Inspiré de (Pan <i>et al.</i> , 2017).....	9
Figure 1.4 : Représentation visuelle de la structure tertiaire de S1R.	10
Figure 1.5 : Schémas représentant les différentes topologies proposées pour S1R à travers le temps.	11
Figure 1.6 : Vue d'ensemble des interactions impliquant E102 en structure 3D.....	12
Figure 1.7 : Schémas de l'interrelation entre les états l'oligomérisation de S1R et ses ligands. ...	13
Figure 1.8 : Structure tertiaire de S1R avec le site d'ancrage de ligand prédit en gris, pour accueillir un agoniste ou un antagoniste.	14
Figure 1.9 : Schémas des différentes localisations de S1R.	16
Figure 1.10 : Schéma illustrant le mécanisme général de l'autophagie.	20
Figure 1.11 : Schéma illustrant les acteurs Atg12, Atg5, Atg6, Atg7, Atg10 et Atg3 impliqués à l'étape de séquestration de l'autophagie.	22
Figure 1.12 : Schéma illustrant les acteurs p62, LC3B-I et LC3B-II impliqués dans la sélection de cargo aux autophagosomes durant l'autophagie.	24
Figure 1.13 : Schéma représentant un réseau neuronal où un potentiel d'action présynaptique est acheminé aux synapses et des neurotransmetteurs sont libérés au neurone postsynaptique (Qin <i>et al.</i> , 2023-05-23).....	26
Figure 1.14 : Schéma résumant les mécanismes des récepteurs AMPA, NMDA et GABA.	28
Figure 1.15 : Schéma de l'organisation structurelle d'un neurone montrant l'initiation et la propagation d'un PA (Freeman <i>et al.</i> , 2016).....	29
Figure 1.16 : Graphique résumant les différentes phases d'un potentiel d'action.	30
Figure 1.17 : Schéma illustrant les différents stimuli provoquant l'ouverture ou la fermeture des canaux ioniques.	30

Figure 1.18 : Diagramme représentant la diversité des familles de canaux K^+ incluant les Kv (Taura <i>et al.</i> , 2021).....	31
Figure 1.19 : Représentation schématique des Kv.	32
Figure 3.1 : Le variant E102Q est davantage présent sous forme insoluble et dimérique que la protéine sauvage.	47
Figure 3.2 : Le variant E102Q est davantage présent au niveau nucléaire ainsi qu'à l'état dimérique que la protéine sauvage.	49
Figure 3.3 : Le variant E102Q semble causer l'accumulation nucléaire de TDP43 à la suite d'un stress protéotoxique.	51
Figure 3.4 : Les niveaux des marqueurs autophagiques p62 et LC3B-I varient en présence du variant E102Q.	53
Figure 3.5 : L'expression de LC3B-II est plus élevée avec le variant E102Q qu'avec la protéine sauvage chez les cellules HEK293T lorsque les lysosomes sont inhibés.	54
Figure 3.6 : L'expression de surface du canal potassique Kv1.2 augmente en présence de S1R et de son agoniste chez les cellules HEK293T.....	57
Figure 3.7 : Kv1.2 semble interagir davantage avec le variant E102Q qu'avec la protéine sauvage S1R.	58
Figure A.1 : Images brutes utilisées pour le montage des panneaux A (A) et C (B) de la figure 3.1.	78
Figure A.2 : Images brutes utilisées pour le montage du panneau A de la figure 3.2.....	79
Figure A.3 : Images brutes utilisées pour le montage des panneaux D (A) et E (B) de la figure 3.2.	80
Figure A.4 : Images brutes utilisées pour le montage du panneau A de la figure 3.3.....	81
Figure A.5 : Images brutes utilisées pour le montage des panneaux C de la figure 3.3.	82
Figure A.6 : Images brutes utilisées pour le montage des panneaux D de la figure 3.3.	83
Figure A.7 : Images brutes utilisées pour le montage du panneau A de la figure 3.4.....	84
Figure A.8 : Images brutes utilisées pour le montage du panneau A de la figure 3.5.....	85
Figure A.9 : Images brutes utilisées pour le montage du panneau D de la figure 3.5.....	86
Figure A.10 : Images brutes utilisées pour le montage du panneau A de la figure 3.7.....	87

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Liste abrégée de ligands connus de S1R et de leur fonction (résumé du texte).	15
Tableau 1.2 : Résumé des interprétations possibles des niveaux de p62, de LC3B-I et de LC3B-II sur l'activité autophagique.	24

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIS	Segment initial de l'axone
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AMPK	Protéine kinase activée par AMP
ANOVA	Analyse de variance
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Atg	Protéines associées à l'autophagie
ATP	Adénosine triphosphate
BCA	Méthode acide bicichoninique
C9ORF72	Cadre de lecture ouvert 72 du chromosome 9
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
FUS	<i>Fused In Sarcoma</i>
GABA	<i>Gamma-Aminobutyric Acid</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney cell</i>
HRP	Peroxydase de raifort
jSLA	Sclérose latérale amyotrophique juvénile
KD	<i>Knockdown</i>

Kv	Canal potassique voltage-dépendant
LAMP	Protéine membranaire associée aux lysosomes
LC3B	Protéine associée aux microtubules 1B chaîne légère 3
MAP	Protéine associée aux microtubules
Nav	Canaux sodiques voltage-dépendant
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
Nup	Nucléoprotéine
PA	Potentiel d'action
PBS	Tampon salin à base de phosphate
PE	Phosphatidyléthanolamine
PRE-084	2-(4-morpholino)éthyl-1-phénylcyclohexane-1-carboxylate
RE	Réticulum endoplasmique
S1R	Sigma-1R
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SEM	Erreur standard de la moyenne
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SOD1	Superoxyde dismutase-1
TBS	Tampon salin à base de Tris
TBS-T	Tampon salin à base de Tris supplémenté du détergent Tween 20

TDP43	<i>TAR DNA Binding Protein</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
UPR	Réponse aux protéines mal repliées
UTR	<i>Untranslated region</i>
WT	Type sauvage

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

°C Degré Celsius

M Mole/L

mL Millilitre

mM Millimolaire

mm Millimètre

nM Nanomolaire

nm Nanomètre

µg Microgramme

µM Micromolaire

RÉSUMÉ

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative rare affectant les motoneurones. Ses symptômes incluent la perte de contrôle des mouvements volontaires et peuvent mener à la paralysie. La SLA évolue rapidement et environ 80% des patients décèdent dans les cinq années suivant le diagnostic. La forme juvénile de la maladie (jSLA) est plus rare et se distingue par l'apparition des symptômes avant l'âge de 25 ans. La pathologie de la jSLA inclue l'agrégation de protéines, l'altération des niveaux de protéines et l'hyperexcitabilité neuronale qui a été associée avec une faible expression du canal potassique Kv1.2. Une mutation a été identifiée dans la séquence codante de la protéine Sigma-1R (S1R) (c.304G>C, p.E102Q) en lien avec la jSLA. S1R est une protéine chaperonne qui exerce des rôles dans le transport nucléocytoplasmique et les processus autophagiques. Cependant, les mécanismes par lesquels S1R exerce ces fonctions et comment le variant E102Q altère l'activité neuronale ne sont toujours pas élucidés. À l'aide de modèles cellulaires, nous avons évalué l'impact du variant E102Q sur la localisation de S1R. Ensuite, nous avons testé le déplacement de la protéine de liaison à l'ARN, TDP43, du noyau au cytoplasme, puis les niveaux des marqueurs autophagiques p62, LC3B-I et LC3B-II. Finalement, nous avons évalué les effets du variant dans le trafic de Kv1.2 à la membrane plasmique. Nos données montrent que le variant cause l'accumulation de dimères nucléaires de S1R, qu'il bloque le transport nucléocytoplasmique et qu'il module les niveaux d'activité autophagique. Il en résulte la restriction des fonctions de S1R dans le transport de Kv1.2 à la membrane lors de son activation par un agoniste. Ces résultats supportent et valident certaines dysfonctions associées au variant E102Q de la jSLA, mettant en évidence son impact dans ces multiples rôles et ouvrant des voies pour des recherches plus approfondies.

Mots clés : Sigma-1R, SLA, trafic intracellulaire, autophagie, Kv1.2

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating rare neurodegenerative disorder that impacts motor neurons and causes a relentless decline marked by muscle weakness, atrophy, and the loss of voluntary movement. The disease takes a rapid toll, with roughly 80% of patients passing away within five years of diagnosis. Juvenile ALS (jALS) is a unique and exceptionally rare form of ALS distinguished by the onset of symptoms before the age of 25. jALS pathology includes protein aggregation, altered protein levels and neuronal hyperexcitability, which has been associated with a decreased expression of the Kv1.2 potassium channel. A rare mutation has been identified in the coding sequence of the Sigma-1R (S1R) protein (c.304G>C, p.E102Q) in relation to jALS. S1R is a multifunctional chaperone protein with roles in many essential functions. These include nucleocytoplasmic transport and autophagic processes. However, the precise mechanisms by which S1R exerts these functions and the pathological consequences of the E102Q variant on neuronal activity remain unclear. Using cell-based assays, we evaluate the impact of the E102Q variant on S1R localization. We then test its functions in the transport of an RNA-binding protein, TDP43 and in autophagic markers p62, LC3B-I and LC3B-II levels. Ultimately, we evaluated the effects of the variant in the trafficking of Kv1.2 at the plasma membrane. Our data revealed that the variant promotes S1R dimerization and nuclear localization, blocks nucleocytoplasmic transport and alters autophagic protein levels. This results in the impairment of S1R functions in Kv1.2 trafficking to the plasma membrane upon S1R's agonist-induced activity. Together, these findings support and confirm some of the dysfunctions associated with the E102Q variant of S1R in jALS. They highlight its impact on nucleocytoplasmic transport, autophagy and ion channel regulation, and paving the way for further investigations.

Key words: Sigma-1R, ALS, intracellular trafficking, autophagy, Kv1.2

INTRODUCTION

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative rare, progressive et généralement fatale qui est caractérisée par la dégénérescence des neurones moteurs. Elle entraîne une paralysie progressive des muscles squelettiques, résultant en une perte de mobilité. Malgré des avancées dans la compréhension de certains aspects de la SLA, les causes précises de la maladie demeurent à être élucidées. La forme sporadique représente environ 90 à 95 % des cas, tandis que les formes familiales en constituent environ 5 à 10 % (Renton *et al.*, 2014). Ces dernières sont souvent liées à des mutations génétiques identifiées. Parmi les formes les plus rares et les moins étudiées, la SLA juvénile (jSLA) se manifeste par une apparition des symptômes avant l'âge de 25 ans. La jSLA se démarque par son association plus fréquente à des mutations génétiques (Picher-Martel *et al.*, 2020). La rareté de cette forme est limitante dans l'avancement des recherches thérapeutiques ciblées.

Une des mutations associées à la jSLA a récemment été identifiée dans le gène codant pour la protéine Sigma-1R (S1R), sous la forme d'un changement de nucléotide c.304G>C (p.E102Q) (Al-Saif *et al.*, 2011). S1R est une protéine chaperonne localisée principalement au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Hayashi et Su, 2004). Elle est unique dans ses rôles variés, comme dans la régulation du stress cellulaire et la modulation du trafic intracellulaire (Aydar *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2013; Rosen *et al.*, 2019). Puisque l'absence de S1R cause une hyperexcitabilité et que les niveaux de plusieurs canaux potassiques sont faibles dans les motoneurones de patients de la SLA, nous nous sommes concentrés sur des fonctions qui peuvent affecter leur expression (Mavlyutov *et al.*, 2015; Stringer et Weiss, 2023). Parmi les rôles de S1R, ses fonctions dans le transport nucléocytoplasmique et dans l'autophagie peuvent contribuer à la modulation du trafic de canaux potassiques (Aydar *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2020; Miki *et al.*, 2014; Miki *et al.*, 2015; Prause *et al.*, 2013; Vollrath *et al.*, 2014). Les fonctions diverses de S1R en fait une cible d'intérêt croissant dans de nombreuses pathologies neurodégénératives, notamment la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, et bien sûr la SLA. Cependant, malgré l'importance fonctionnelle de S1R, les mécanismes précis de son action et les conséquences exactes du variant E102Q restent encore à explorer en détail.

Le variant E102Q de la protéine S1R semble entraîner des conséquences profondes dans la pathologie de la jSLA. Nous avons comme hypothèse que le variant affecte les fonctions de S1R, notamment dans le transport de protéines et dans les mécanismes de dégradation. Dans ce contexte, mon projet de recherche a eu pour objectif d'évaluer comment le variant E102Q impacte ultimement l'excitabilité neuronale en employant divers modèles cellulaires. Nous avons avant tout examiné la localisation intracellulaire du variant en comparaison avec la protéine sauvage, afin de déterminer si cette variation génétique affecte sa distribution au sein des compartiments cellulaires. Par ailleurs, nous avons évalué les effets du variant sur des processus spécifiques qui sont régulés par S1R, en commençant par le transport nucléocytoplasmique. Pour ce faire, nous avons étudié la protéine TDP43, une protéine de liaison à l'ARN dont la mauvaise localisation est un marqueur pathologique reconnu dans la SLA. Par ses rôles dans le métabolisme des ARNm, la délocalisation de TDP43 peut participer à la régulation des canaux potassiques (Birsa *et al.*, 2020). Par la suite, nous avons testé l'activité autophagique qui permet aux cellules d'éliminer les protéines mal repliées ou endommagées avec les marqueurs p62, LC3B-I et LC3B-II. Le renouvellement de protéines par les processus autophagiques est primordial pour le maintien de l'excitabilité neuronal (Kuijpers *et al.*, 2022). Enfin, nous avons exploré la capacité de S1R à moduler le trafic du canal potassique Kv1.2 à la membrane plasmique, un processus essentiel pour la régulation de l'excitabilité neuronale.

Les résultats de notre étude montrent que le variant E102Q entraîne une accumulation anormale de dimères nucléaires de S1R. Nous avons trouvé que le variant semble causer une accumulation de TDP43 au niveau nucléaire, suggérant que S1R joue un rôle dans le transport nucléocytoplasmique qui est entravé par le variant. Cela évoque en conséquence des défauts dans les rôles de TDP43 comme la régulation d'ARNm. De plus, E102Q perturbe significativement les niveaux d'expression des marqueurs autophagiques p62, LC3B-I et LC3B-II, témoignant d'une altération du processus de dégradation cellulaire. Cela indique alors que les niveaux des protéines sont irréguliers. Enfin, nous avons observé une diminution de l'expression de Kv1.2 et une incapacité à promouvoir le transport de Kv1.2 à la surface cellulaire en présence du variant E102Q et d'un agoniste de S1R. Cela suggère un défaut dans le trafic du canal qui peut être dû en partie aux dysfonctions de TDP43 et de l'autophagie, pouvant affecter la régulation de l'excitabilité neuronale.

Ces altérations, prises ensemble, renforcent l'hypothèse que le variant E102Q compromet des fonctions essentielles de S1R, telle que la régulation de l'excitabilité neuronale, contribuant potentiellement de manière causale à la pathologie de la jSLA. En mettant en évidence plusieurs mécanismes perturbés, notre étude offre de nouvelles perspectives pour comprendre les bases moléculaires de cette maladie rare et grave. Elle souligne également l'importance de S1R comme acteur central dans l'équilibre cellulaire des neurones moteurs. Dans un contexte où les options thérapeutiques restent limitées et où la SLA demeure une maladie incurable, chaque avancée dans la compréhension des mécanismes moléculaires constitue une étape cruciale vers le développement de traitements efficaces. L'étude approfondie des formes génétiques rares comme la jSLA, bien que complexe, représente une opportunité unique de découvrir de nouveaux mécanismes fondamentaux, applicables potentiellement aux formes sporadiques de la maladie.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Sclérose latérale amyotrophique (SLA)

Parmi toutes les maladies neurologiques, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) est celle qui cause le plus de décès au Canada (<https://als.ca>). Également connue sous le nom de maladie de Lou Gehrig ou de Charcot, la SLA est une affection rare et complexe touchant les neurones moteurs. Son taux d'incidence est estimé à 2 personnes sur 100 000 par année, son évolution est rapide et environ 80% des patients ne survivent pas plus que cinq années suivant le diagnostic (Talbot, 2009).

La SLA a pour effet de progressivement affaiblir les muscles, les patients perdent donc graduellement le contrôle de leurs muscles volontaires jusqu'à la paralysie. Les symptômes ne paraissent pas tous au même stade et les expériences varient d'un patient à l'autre. De plus, il n'est pas toujours évident que les symptômes observés sont dus à la, ils peuvent être confondus avec des signes de vieillissement. Les symptômes des gens affectés par la SLA incluent les crampes musculaires, la rigidité des muscles, le sentiment de faiblesse et la fatigue (Wijesekera et Leigh, 2009). Avant que les malades ne se rendent compte de leurs symptômes, leur entourage peut remarquer des signes de la maladie, tels que les périodes de rires incontrôlables, la perte de poids, le souffle court, les réflexes différents et les trébuchements. Les symptômes peuvent devenir plus sévères avec la toux durant l'alimentation, la salive excessive ou la bouche sèche, l'insomnie causée par l'inconfort, la difficulté à former des phrases, les changements cognitifs et la difficulté à respirer (<https://als.org>).

Les conséquences de la maladie n'affectent pas seulement les personnes diagnostiquées. En effet, l'impact se rend jusqu'à l'entourage des patients. Puisque la SLA rend la tâche de bouger, de marcher, de parler et d'avaler difficile, les personnes souffrantes perdent de l'indépendance et ce sont leurs proches-aidants qui prennent soin d'eux au quotidien (<https://als.ca>). Le nombre de gens réellement affectés se voit donc minimalement doubler. Les équipements et les soins requis aux souffrants sont d'autant plus coûteux, les gens impliqués ne sont pas seulement épuisés en ressources physiques et émotionnelles, mais aussi en ressources financières. Il est question d'environ 200 000\$ pour une famille canadienne affectée (<https://sla-quebec.ca>).

Alors que des thérapies complémentaires telles que la méditation, l'hypnose, l'acupuncture et les massages aident à réduire le poids des symptômes et des maux, aucune cure n'existe pour la SLA. Il existe peu de traitements et ceux-ci se concentrent sur l'allègement des symptômes sans avoir de forts impacts sur la progression de la maladie. C'est la maladie qui cause le plus de morts neurologiques au Canada, d'où l'urgence de trouver de nouvelles solutions pour aider ces patients (<https://als.ca>).

1.1.1 Différentes formes de SLA

La SLA est une maladie qui frappe les gens de tout genre et âge et de tout groupe ethnique et socio-économique. Il n'y a pas une cause connue de la SLA, c'est plutôt un mélange de causes basées sur des facteurs environnementaux et des mutations génétiques (Al-Chalabi et Hardiman, 2013).

Pour mieux comprendre cette maladie, qui a tant de répercussions, il est pertinent de savoir qu'elle se catégorise en différentes formes principales, soit la forme familiale et la forme sporadique. La forme familiale représente 5 à 10% des cas de SLA, elle est composée des cas héréditaires où des variants génétiques sont trouvés dans l'historique de la famille et transmis à travers les générations (Renton *et al.*, 2014). La plus courante est la forme sporadique, qui caractérise les cas où il n'y a aucun membre de la famille qui est touché. Parmi toutes ces formes, les facteurs génétiques restent la cause particulièrement étudiée (Al-Chalabi et Hardiman, 2013).

De toutes les formes confondues, environ 20% sont des cas bulbaires, décrivant les cas où les motoneurones se situant dans la région corticobulbaire sont les premiers affectés. Dans ces cas, les premiers muscles à être paralysés sont ceux du cou et au-dessus (Amato et Russell, 2008; Chio *et al.*, 2011). Les formes les plus communément discutées sont les cas de SLA à début spinal. Ils dépeignent les cas où l'apparition des symptômes arrive vers l'âge de 60 ans avec des faiblesses sans douleur aux membres de manière asymétrique (**Figure 1.1**) (Amato et Russell, 2008; Rowland et Shneider, 2001).

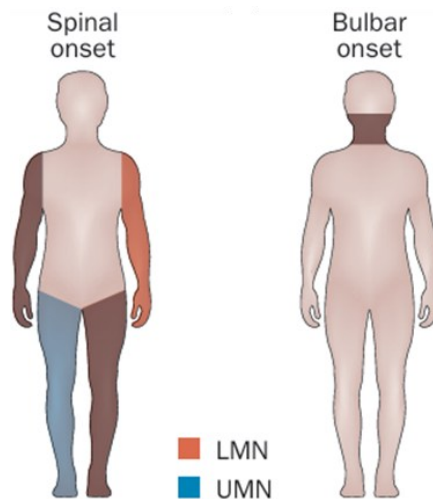


Figure 1.1 : Schéma montrant les différentes parties impliquées dans les cas de SLA à début spinal (gauche) versus bulbaire (droite). La couleur orange indique l'implication des neurones moteurs inférieurs (LMN) et la couleur bleue indique l'implication des neurones moteurs supérieurs (UMN). Figure adaptée de (Swinnen et Robberecht, 2014).

Se retrouvant plus à l'écart, la forme juvénile de la SLA (jSLA) est une rare forme avec un taux d'incidence estimé à moins de 1 personne sur 1 000 000 (Liu *et al.*, 2017). Elle représente les cas où le début des symptômes arrive avant l'âge de 25 ans. Parfois, les cas où les symptômes apparaissent avant l'âge de 18 ans sont sous-catégorisés dans la forme pédiatrique de la SLA (Picher-Martel *et al.*, 2020). La jSLA se différencie des autres formes par le fait que les causes génétiques comptent pour une plus grande proportion des cas juvéniles que des cas adultes, il est question ici de 40% comparativement à 10% (Lehky et Grunseich, 2021).

1.1.2 Variants connus

Dans la recherche des causes de la SLA, plusieurs gènes ont été identifiés comme jouant un rôle dans le développement de la maladie et la majorité des cas familiaux sont associés à des variants connus de la SLA (Al-Chalabi et Hardiman, 2013). Les gènes les plus ciblés aujourd'hui dans les tests diagnostiques de la maladie, autant pour la forme familiale que la forme sporadique, sont les gènes *C9ORF72* et *SOD1*. En effet, des mutations dans la région non codante du cadre de lecture ouvert 72 du chromosome 9 (*C9ORF72*), créant un nombre anormalement élevé de répétitions de l'hexanucléotide GGGGCC, sont communes chez les patients de la SLA. Ces mutations mènent à une perte de fonction en intervenant dans l'expression de la protéine associée C9ORF72 et à un gain de fonction en générant des ARN toxiques (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*,

2011). Les rôles de la protéine C9ORF72 étaient peu connus quand les mutations reliées à la SLA ont été identifiées. Des fonctions dans la régulation autophagique et le trafic vésiculaire au niveau des neurones ont depuis été dévoilées en lien avec C9ORF72 (Smeyers *et al.*, 2021). D'autre part, une mutation de substitution de 11 acides aminés a d'abord été trouvée dans la séquence primaire de la protéine superoxyde dismutase-1 (SOD1) et elle a été reliée à la SLA (Rosen *et al.*, 1993). Plusieurs autres polymorphismes de SOD1 ont par la suite été identifiés en lien avec la SLA, incluant des substitutions, des troncatures et des décalages de cadres (Abel *et al.*, 2012; Wright *et al.*, 2019). Les mutations trouvées dans *SOD1* ont pour effets de perturber le processus de maturation de la protéine en réduisant ses capacités de repliement. En diminuant aussi sa demi-vie, les mutations de *SOD1* peuvent également mener à des accumulations toxiques dans les neurones (Wright *et al.*, 2019). SOD1 est une enzyme qui contribue principalement à la régulation des niveaux de radicaux libres superoxydes en catalysant leur conversion en oxygène et peroxyde d'hydrogène (McCord et Fridovich, 1969).

Parmi les gènes affectés connus de la SLA, il y a aussi le *fused in sarcoma (FUS)*, où de multiples mutations ont été identifiées. Elles ont comme résultat l'accumulation de la protéine FUS dans le cytoplasme des neurones en plus de nuire au métabolisme, à l'épissage et au transport des ARN (Kwiatkowski *et al.*, 2009; Vance *et al.*, 2009). De même pour le *TAR DNA binding protein (TDP43)*, des mutations dans le gène associé *TARDBP* ont été mises en évidence (Sreedharan *et al.*, 2008). La protéine TDP43 est semblable à FUS dans sa structure et dans ses fonctions; ce sont toutes les deux des protéines de liaison à l'ARN/ADN qui sont impliquées à plusieurs niveaux dans le traitement de l'ARN. Elles jouent toutes les deux des rôles dans la transcription, l'épissage, le transport et la traduction des ARN. La pathologie est similaire avec des agrégats, des accumulations cytoplasmiques et des défauts dans le métabolisme des ARN (Lagier-Tourenne *et al.*, 2010).

Le gène *C9ORF72*, le plus associé avec les formes tardives de la SLA, n'a pas été répertorié dans la forme juvénile. Plutôt, les gènes *SOD1* et *TARDBP* ont été identifiés comme causes de la jSLA en plus de *FUS*, la plus commune (Lehky et Grunseich, 2021). Plus rarement, le gène *SIGMAR1* a aussi été retrouvé comme acteur responsable de la maladie dans une famille en Arabie Saoudite par une étude de *Genome-Wide Association Study (GWAS) Single Nucleotide Polymorphism (SNP)* (**Figure 1.2**) (Al-Saif *et al.*, 2011).

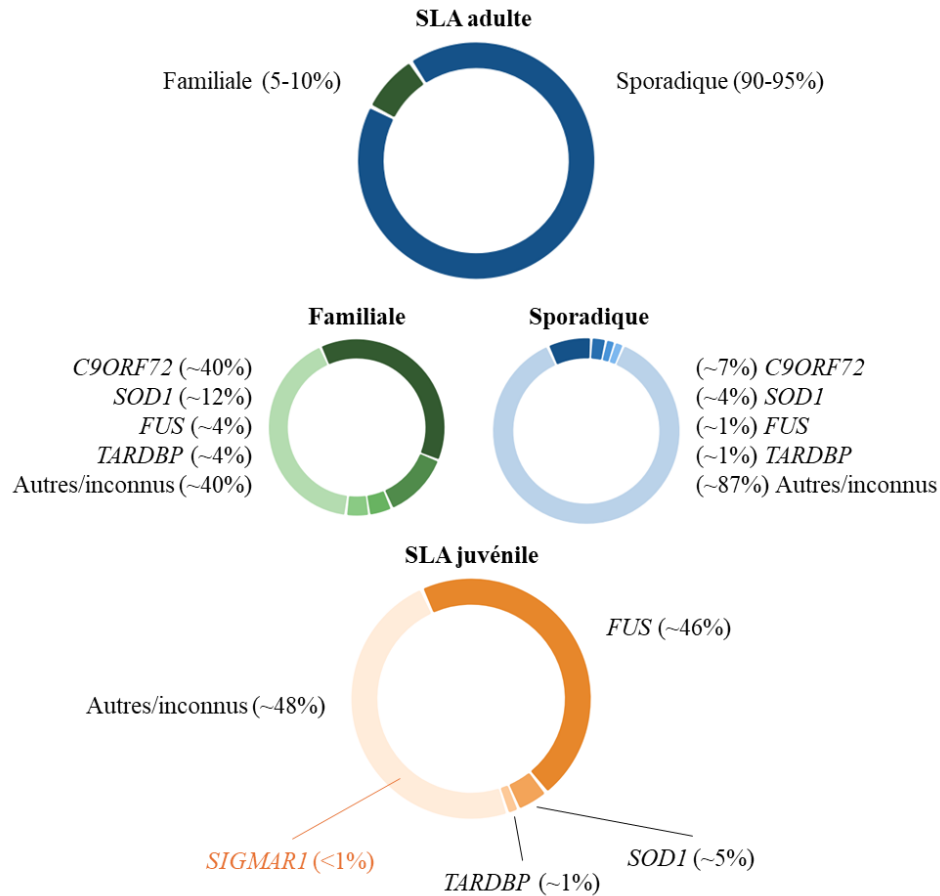


Figure 1.2 : Schéma représentatif résumant les différentes formes de la SLA et les principaux gènes impliqués (*C9ORF72*, *SOD1*, *FUS*, *TARDBP* et *SIGMAR1*). Inspiré de (Picher-Martel *et al.*, 2020).

Dans les études démontrées dans l'article de Al-Saif, une mutation dans le gène *SIGMAR1* codant pour la protéine Sigma-1R (S1R) a été identifiée chez des patients de jSLA. Une substitution d'un nucléotide (c.304G>C) modifie le codon GAG pour CAG, changeant l'acide aminé glutamate pour la glutamine (p.E102Q) (Al-Saif *et al.*, 2011). Les cas de SLA associés à *SIGMAR1* sont caractérisés par l'apparition des symptômes vers l'âge de 1 à 2 ans sous forme de spasticité et de faiblesse. La progression de la maladie est lente dans ces cas et il n'y a pas de perte cognitive observée (Lehky et Grunseich, 2021). Le présent projet porte particulièrement sur la protéine S1R qui sera détaillée dans la prochaine section.

1.2 Sigma-1R (S1R)

Par son expression ubiquitaire et son vaste catalogue de fonctions, la protéine S1R suscite un intérêt important. D'abord, S1R est reconnue comme une protéine chaperonne activable par des ligands

et sensible au calcium, résidant au réticulum endoplasmique (RE) (Hayashi et Su, 2004). Le terme chaperonne désigne une protéine capable d'empêcher les mauvais repliements et les agrégations en aidant au repliement et à la maturation d'autres protéines. Les chaperonnes sont aussi capables de rétablir leurs fonctions en simplifiant le dépliement et la désagrégation (Jeng *et al.*, 2015). Par sa capacité de lier une multitude de ligands, la protéine S1R a finalement été classée comme un récepteur intracellulaire non opioïde (Alexander *et al.*, 2013; Su, 1982; Su *et al.*, 1988). Pour bien comprendre cette chaperonne et son importance, une vue d'ensemble sur sa structure, sa localisation et ses fonctions biologiques connues est nécessaire.

1.2.1 Structure

S1R est une protéine de 223 acides aminés d'une masse moléculaire de 25 314 Da (Hanner *et al.*, 1996). Son gène associé *SIGMAR1* se retrouve sur le chromosome 9 et est assemblé de quatre exons et de trois introns. Plusieurs isoformes existent, mais les travaux présentés dans ce mémoire se concentrent sur l'isoforme 1 (**Figure 1.3**) (Prasad *et al.*, 1998; Seth *et al.*, 1997).

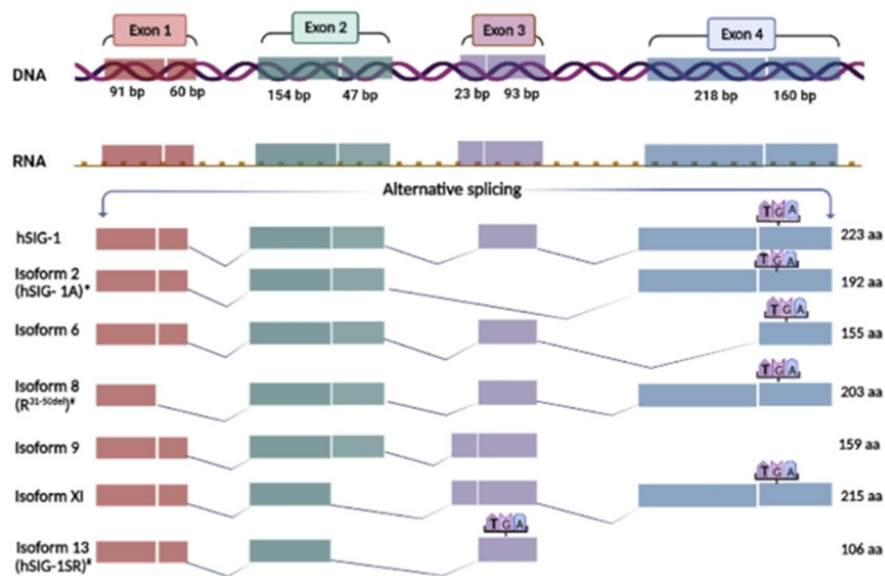


Figure 1.3 : Schéma représentatif de la structure du variant de transcription 1 de *SIGMAR1* et des différents isoformes protéiques chez l'humain. Inspiré de (Pan *et al.*, 2017).

Pour ce qui est de la composition de la structure tertiaire de la protéine, S1R est arrangé d'un centre de feuillets β antiparallèles créant un baril entouré d'hélices α . La terminaison amine (NH_2) contient l'hélice transmembranaire suivi de deux autres hélices formant une épingle sur le plus volumineux

des deux feuillets β . La terminaison carboxyle (-COOH) est alors assemblée de deux hélices constituant une surface plane hydrophobique pouvant interagir avec les membranes (**Figure 1.4**) (Ossa *et al.*, 2017).

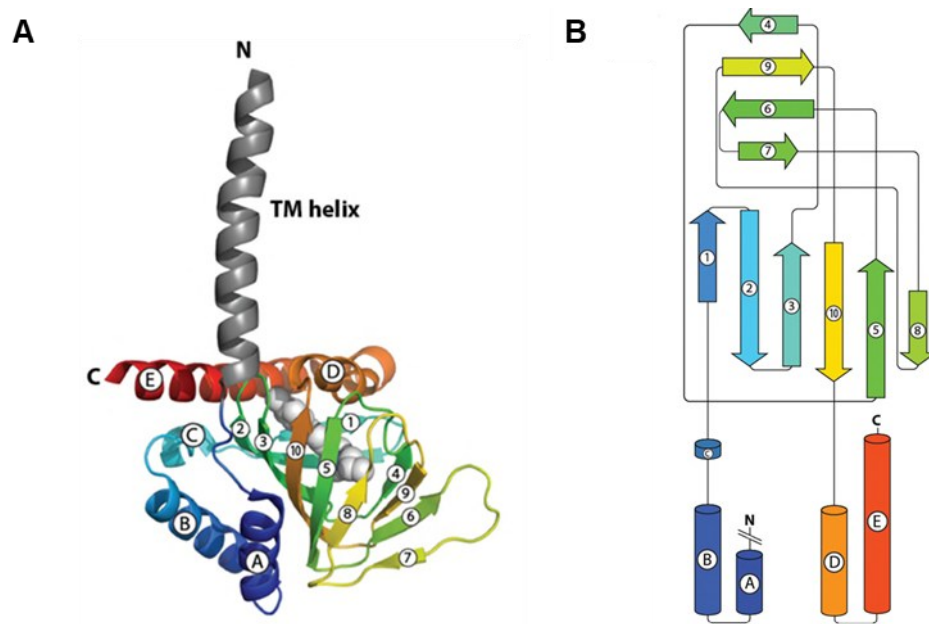


Figure 1.4 : Représentation visuelle de la structure tertiaire de S1R. (A) Structure monomérique 3D de S1R avec les emplacements des structures secondaires détaillés en (B). (B) Schéma représentant la structure tertiaire de la protéine en un plan, les lettres et les chiffres correspondant à (A) (Ossa *et al.*, 2017).

La protéine a été étudiée dans son ensemble et il y a eu différentes trouvailles sur la structure et la topologie de S1R. Par exemple, il a d'abord été trouvé que S1R ne contenait qu'un seul domaine transmembranaire situé du côté N-terminal de la protéine (**Figure 1.5 A**) (Hanner *et al.*, 1996). Il a par après été proposé que S1R possédait deux domaines transmembranaires et que les deux extrémités N- et C-terminales étaient orientées vers le cytosol (Aydar *et al.*, 2002). Cependant, il a par la suite été démontré que les deux terminaux étaient plutôt orientés vers le lumen du RE (**Figure 1.5 B**) (Hayashi et Su, 2007). C'est en 2016 que la structure cristallographique de S1R a été résolue en exprimant la protéine dans des cellules d'insectes *Sf9* en utilisant le système baculovirus. Elle montre que la protéine chaperonne est homotrimérique et qu'elle ne possède qu'un seul domaine transmembranaire. Cette étude a également établi que le domaine C-terminal de S1R était cytosolique et qu'elle servait de site de liaison (**Figure 1.5 C-D**) (Schmidt *et al.*, 2016). Toutefois, il est toujours débattu les orientations des domaines N- et C-terminaux de S1R, puisqu'il a aussi été déterminé que le N-terminal était exposé au cytosol et que le C-terminal était exposé au lumen

dans une autre étude. Cette dernière a été menée par microscopie électronique avec la méthode d'étiquette peroxydase d'ascorbate 2 (APEX2) dans des cellules hybrides de neuroblastomes murins et de neurones de ganglions de la racine dorsale (DRG) de rats, ND7/23. Les résultats ont ensuite été confirmés *in vivo* dans des neurones de DRG (Mavylutov *et al.*, 2018).

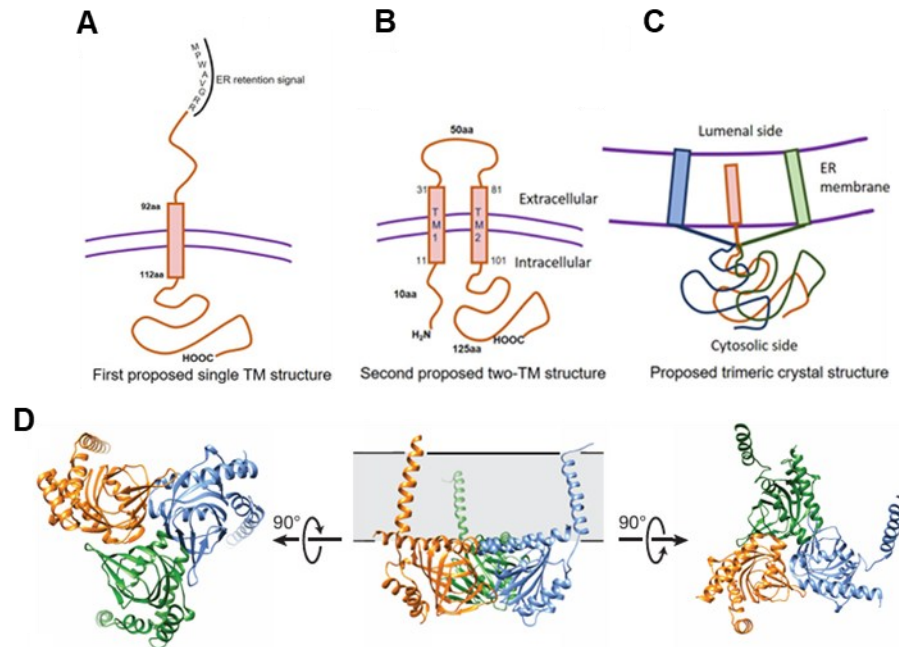


Figure 1.5 : Schémas représentant les différentes topologies proposées pour S1R à travers le temps. (A) La première topologie suggérée voyait S1R avec un domaine transmembranaire du côté N-terminal de la protéine. (B) Une structure à deux domaines transmembranaires a ensuite été pensée avec les domaines étant dans le liquide intracellulaire. (C) Un retour au domaine transmembranaire unique est arrivé et cette fois-ci avec l'information que S1R est trimérique. Cette topologie suggère que le domaine transmembranaire se trouve au N-terminal et que celui-ci fait face au lumen (Aishwarya *et al.*, 2021). (D) Structure cristallographique de S1R sous forme trimérique, vue de différents angles (Schmidt *et al.*, 2016).

Chez le variant E102Q, la mutation se trouve à une position se trouvant profondément à l'intérieur de la structure, soit dans le baril de feuillets β . Le groupe carboxyle de l'acide glutamique à la position 102 (E102) interagit dans ce cas avec les groupes amides des acides aminés spatialement à proximité provenant des hélices α en N-terminal de la valine à la position 36 (V36) et phénylalanine à la position 37 (F37) (**Figure 1.6 A**). Ces derniers acides aminés sont situés dans un lieu d'attache entre le domaine transmembranaire et le reste de la protéine. Le changement de E102 en glutamine (Q102) mènerait alors à la déstabilisation de la protéine par la modification des interactions entre les acides aminés à l'intérieur d'un monomère de S1R (**Figure 1.6 B**) (Schmidt *et al.*, 2016).

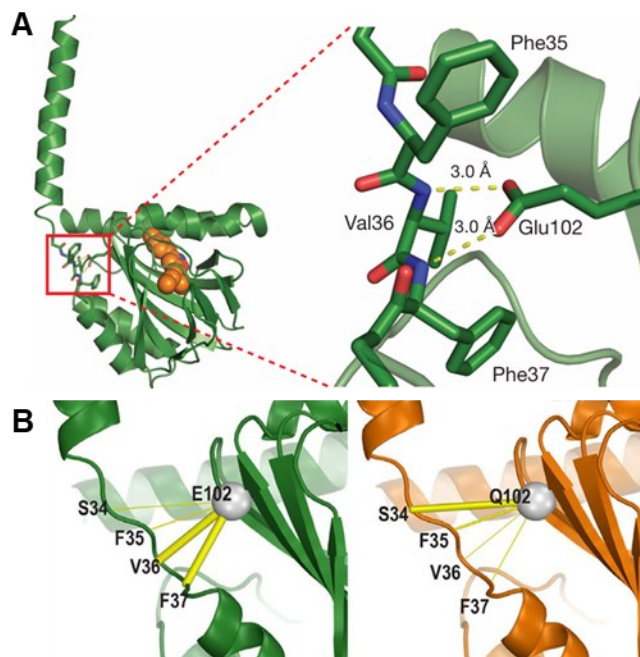


Figure 1.6 : Vue d'ensemble des interactions impliquant E102 en structure 3D. **(A)** Agrandissement de la région entre le domaine transmembranaire et le baril de feuillets β montrant les interactions entre E102 et V36 et F37. Les billes orange représentent un ligand (Schmidt *et al.*, 2016). **(B)** Comparaison des interactions entre E102 et Q102 avec V36 et F37 (Abramyan *et al.*, 2020).

1.2.2 États d'oligomérisation et activation

S1R est retrouvée sous plusieurs formes en conditions physiologiques de manière stable, autant en monomères qu'en oligomères. Cependant, il a été mentionné que S1R ne peut avoir d'activité par liaison de ligand spécifique que si elle est sous forme oligomérique. Il a été trouvé que la présence d'un motif GXXXG, se trouvant entre les positions 87 et 91, participe à l'oligomérisation de la protéine ainsi qu'à son activation (Gromek *et al.*, 2014; Ramachandran *et al.*, 2007).

Les états oligomériques de S1R sont sujets à des dissociations jusqu'à la forme monomérique lorsque la protéine est en condition de température élevée. Elle perd en même temps sa capacité de liaison aux ligands. Cependant, en présence de ligands, ces dissociations ne sont pas observées. Les ligands stabiliseraient donc les oligomères de S1R tout comme l'oligomérisation de S1R favoriserait la liaison de ligands (Gromek *et al.*, 2014). L'état et l'activité de S1R est donc dépendante des ligands présents (**Figure 1.7 A**). Il a été déterminé que les agonistes favorisent les formes monomériques et dimériques, alors que les antagonistes favorisent plutôt les formes

trimériques, tétramériques et les oligomérisations de niveaux supérieurs (**Figure 1.7 B**) (Chu et Ruoho, 2016; Mishra *et al.*, 2015).

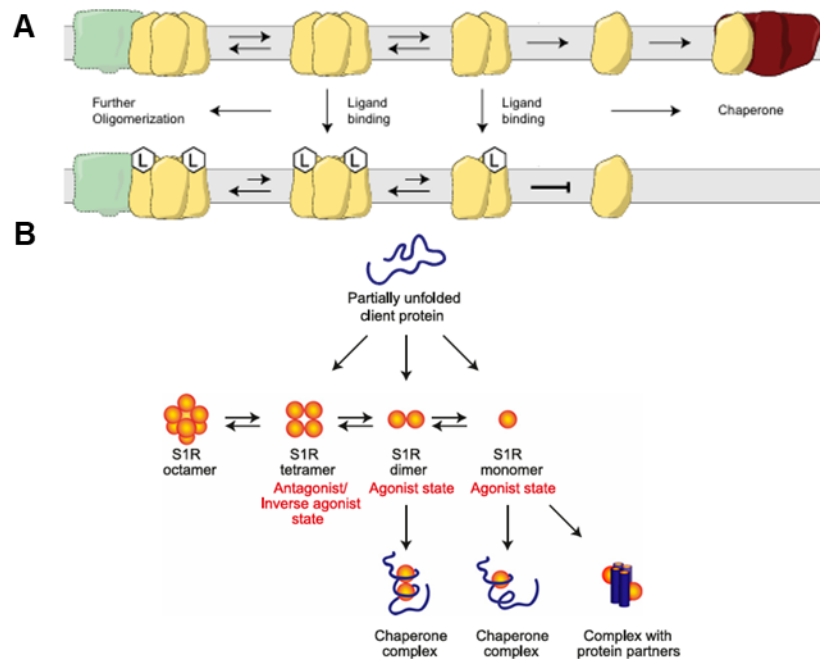


Figure 1.7 : Schémas de l'interrelation entre les états l'oligomérisation de S1R et ses ligands. **(A)** La liaison de ligands favorise l'oligomérisation de S1R et vice-versa (Gromek *et al.*, 2014). **(B)** Les états monomériques et dimériques sont favorables aux agonistes et les états d'oligomérisation supérieur sont favorables aux antagonistes (Chu et Ruoho, 2016).

D'autre part, il a été établi que S1R sous forme monomérique interagit plutôt avec des canaux ioniques comme le canal sodique voltage-dépendant Nav1.5 et que ces interactions sont empêchées par la présence de certains ligands (Balasuriya *et al.*, 2012; Gromek *et al.*, 2014). Il est alors suggéré que les formes monomériques avantagent les interactions aux canaux ioniques et que les états d'oligomérisation supérieurs avantagent la liaison de ligands. D'autres canaux voltage-dépendants connus pour interagir avec S1R incluent Kv1.5, Kv1.4, Kv1.3 et Kv1.2 (Aydar *et al.*, 2002; Kinoshita *et al.*, 2012; Kourrich *et al.*, 2013).

Il a été déterminé que les sites de liaison des ligands de S1R se trouve au centre des feuillettes β qui forment le baril décrit précédemment et que ce domaine est hautement conservé (**Figure 1.6 A et 1.8**) (Schmidt *et al.*, 2016). Il a été estimé dans plusieurs articles que S1R possède deux motifs semblant à des domaines de liaison à des stéroïdes (SBLDI et SBLDII) qui sont composés des acides

aminés se situant aux positions 91 à 109 pour le premier puis 176 à 194 pour le deuxième (Aishwarya *et al.*, 2021). Des études ont évalué que les acides aminés acide aspartique à la position 126 (D126) et acide glutamique à la position 172 (E172) de S1R sont essentiels à la liaison de ligands à haute affinité (Seth *et al.*, 2001).

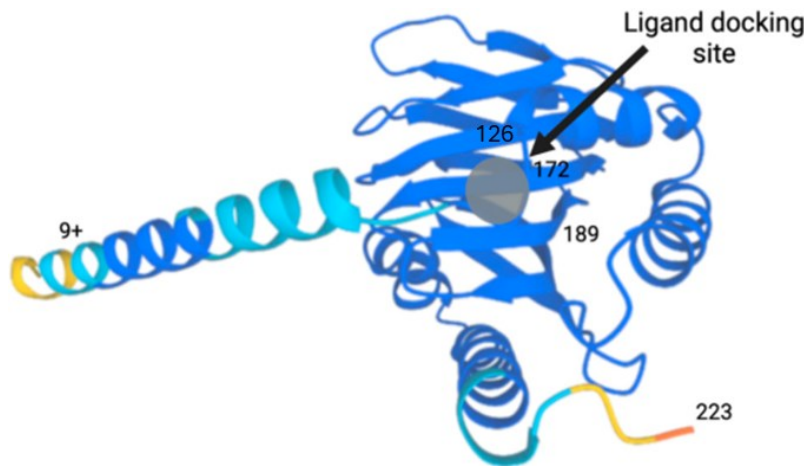


Figure 1.8 : Structure tertiaire de S1R avec le site d'ancrage de ligand prédit en gris, pour accueillir un agoniste ou un antagoniste. Figure adaptée de (Munguia-Galaviz *et al.*, 2023).

La protéine S1R a un grand nombre de ligands qui lui est associés, autant de provenance synthétique qu'endogène. Plusieurs régulateurs de S1R sont connus aujourd'hui, dont la pridopidine, la cocaïne et la PRE-084, qui sont des agonistes favorisant son activation, puis l'halopéridol, le BD-1047 et le BD-1063, qui sont des antagonistes favorisant son inactivation. Finalement, la sphingosine, la progestérone et le cholestérol sont des exemples de ligands endogènes (**Tableau 1.1**) (Chen *et al.*, 2007; Chu et Ruoho, 2016; Ye *et al.*, 2020). Toutefois, un ligand endogène officiel n'a toujours pas été associé à S1R jusqu'à présent. Il a été proposé que le *N,N*-Diméthyltryptamine (DMT) soit le ligand endogène recherchée, mais sans confirmation encore (Fontanilla *et al.*, 2009).

Tableau 1.1 : Liste abrégée de ligands connus de S1R et de leur fonction (résumé du texte).

Ligand	Fonction
(+)pentazocine	Agoniste
(+)SKF10047	
Pridopidine	
Cocaïne	
PRE-084	
Halopéridol	Antagoniste
Rimcazole	
NE-100	
BD-1047	
BD-1063	

1.2.3 Localisation et fonctions

La protéine S1R est exprimée de manière ubiquitaire. Elle est retrouvée dans des organes périphériques comme l'estomac, le foie et le pancréas, mais c'est sa présence dans le cerveau qui est pertinente dans le cadre de ce mémoire. Elle est présente à haute densité dans le système nerveux central (SNC). Dans le cerveau, son niveau est élevé dans le cortex frontal, l'hippocampe et le striatum (Hanner *et al.*, 1996; Hayashi et Su, 2004; Tarmoun *et al.*, 2024). Sa présence dans les neurones moteurs a également été reportée, ce qui suscite l'intérêt des recherches sur S1R en lien avec la SLA (Mavlyutov *et al.*, 2012).

D'un point de vue subcellulaire, la séquence de S1R contient un signal de rétention au RE dans le N-terminal, il est alors établi que sa présence est principalement au RE (**Figure 1.5 A**) (Hanner *et al.*, 1996; Hayashi et Su, 2004). Le RE est un grand réseau comprenant plusieurs sous-sections interconnectées à divers compartiments cellulaires. S1R est retrouvée à plusieurs endroits dans cet espace (**Figure 1.9**). Elle peut être transloquée dans le RE selon son activation (Hayashi et Su, 2004). La protéine est présente dans les gouttelettes lipidiques associées au RE (Hayashi et Su, 2003). Les membranes associées aux mitochondries (MAM) est son endroit de prédilection (Hayashi et Su, 2007). Elle peut être retrouvée dans la membrane externe des mitochondries (Klouz *et al.*, 2002). Il a aussi été déterminé qu'elle est présente dans les membranes plasmiques et dans l'enveloppe nucléaire associé au RE (**Figure 1.9**) (Aydar *et al.*, 2002; Dussossoy *et al.*, 1999;

Kourrich *et al.*, 2013). Il est tout de même suggéré que la localisation subcellulaire de S1R est dépendante des organes et des types cellulaires dans lesquels elle est étudiée (Aishwarya *et al.*, 2021).

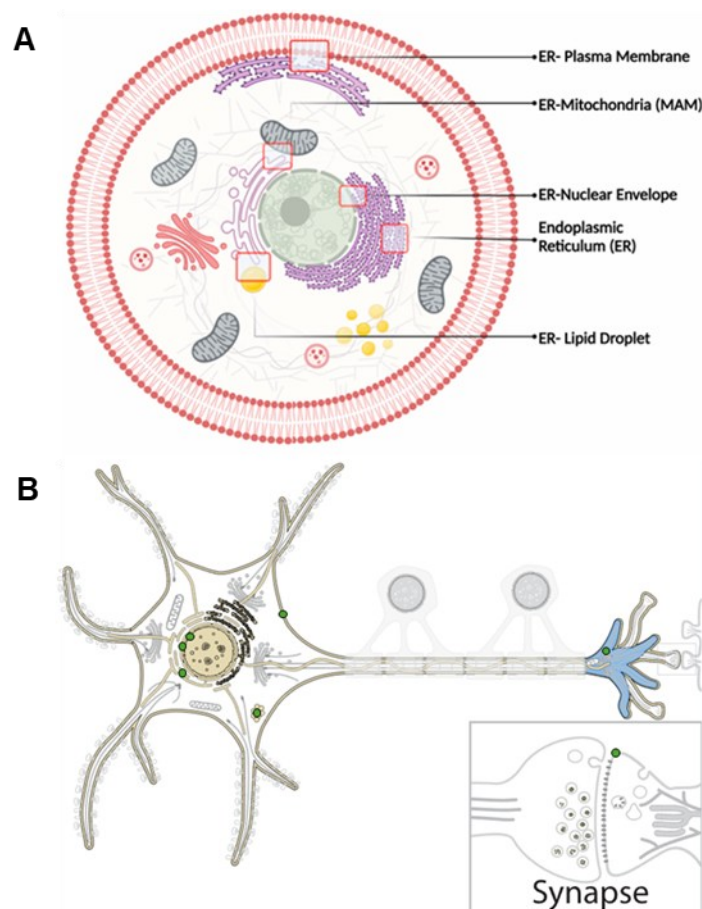


Figure 1.9 : Schémas des différentes localisations de S1R. (A) Représentation des sites de contact avec la membrane intracellulaire où S1R peut être présente. Tous liés au RE, les endroits incluent la membrane plasmique, les mitochondries, l'enveloppe nucléaire et les gouttelettes lipidiques (Lachance *et al.*, 2023). (B) Représentation des endroits où se trouve S1R dans un neurone. Les points verts reflètent S1R retrouvée au niveau de l'enveloppe nucléaire, de la membrane nucléaire interne et externe, du RE, des gouttelettes lipidiques, de la membrane cellulaire, du cône de croissance et de la membrane postsynaptique. Figure adaptée de (Uniprot #Q99720).

Dû à son rôle de chaperonne et à ses multiples localisations en plus de ses différents ligands et partenaires d'interaction, S1R est une protéine possédant plusieurs fonctions essentielles. Parmi elles sont des fonctions de régulation et de modulation en coopération avec d'autres protéines.

Des études ont montré que S1R joue un rôle dans la modulation de la réponse au stress du RE, dans la réponse aux protéines mal repliées (UPR) et qu'elle influence la localisation et la stabilité d'autres protéines (Mori *et al.*, 2013; Rosen *et al.*, 2019). En lien avec sa localisation dans les gouttelettes lipidiques du RE, S1R régule la compartimentalisation et l'exportation des lipides du RE (**Figure 1.9**) (Hayashi et Su, 2004). Une de ses fonctions répandues dans le RE est le maintien de l'homéostasie calcique. Sous conditions physiologiques, la protéine se retrouve en complexe avec une autre protéine chaperonne, *binding immunoglobulin protein* (BiP ou Grp78 ou HSPA5). Cette association hautement spécifique rend chacune des protéines moins actives, ou dites « dormantes ». C'est lorsqu'il y a un stress au niveau du RE, comme la déplétion du calcium, que le complexe se dissocie afin d'activer S1R pour qu'elle puisse lier le récepteur inositol-triphosphate (IP3R) et permettre le déplacement de calcium entre le RE et les mitochondries. La présence d'un agoniste permet cette même chaîne d'événements par la dissociation du complexe entre S1R et BiP (Hayashi et Su, 2007).

Un autre rôle joué par S1R est dans le transport nucléocytoplasmique. La protéine interagit avec des nucléoporines. Ces associations permettent de promouvoir leur stabilisation et, par ce fait, la distribution d'autres protéines entre le noyau et le cytoplasme. D'autre part, il a été proposé que S1R facilite le transport nucléocytoplasmique par la stabilisation de protéines du pore nucléaire (nucléoprotéines, Nups) telles Nup358, Nup214 et Nup50 (Lee *et al.*, 2020). L'exposition à des agonistes connus de S1R provoque sa migration des gouttelettes lipidiques vers le noyau (Tsai *et al.*, 2015). Des études ont démontré que S1R se déplace entre le noyau et le cytoplasme, elles suggèrent que S1R sert de navette et qu'elle contribue à la dégradation d'inclusions nucléaires neuronales (Miki *et al.*, 2014; Miki *et al.*, 2015). Les actions effectuées par S1R dans le transport nucléocytoplasmique ne sont néanmoins toujours pas élucidées.

Il a été démontré qu'un fragment de S1R, soit les résidus 116 à 223 du C-terminal de la protéine, avait la capacité de réduire l'agrégation de protéines (Gregianin *et al.*, 2016; Ortega-Roldan *et al.*, 2013). Des recherches ont suggéré que S1R joue un rôle dans les voies endolysosomales à la suite de découvertes sur l'accumulation de substrats autophagiques lorsque l'expression protéique de S1R est réduite (Prause *et al.*, 2013; Vollrath *et al.*, 2014). D'autre part, S1R est aussi capable de moduler des canaux ioniques comme les canaux voltage-dépendants de calcium et les canaux potassiques au niveau des membranes plasmiques (Aydar *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2000;

Morales-Lazaro *et al.*, 2019). Du fait qu'elle joue plusieurs rôles essentiels, la perturbation des fonctions de S1R a de fortes conséquences physiologiques.

Dans des études sur la SLA, une hyperexcitabilité et des niveaux diminués de canaux potassiques faibles ont été révélés (Mavlyutov *et al.*, 2015; Stringer et Weiss, 2023). À la suite de l'identification du variant E102Q de S1R, il a été démontré que la distribution subcellulaire du variant est anormale. Le variant se présente davantage sous forme de complexes ressemblant à des dimères résistants aux détergents et son expression au niveau cellulaire semble augmenter l'apoptose comparativement à la protéine de type sauvage (WT) (Al-Saif *et al.*, 2011). Étant observé que la modification de la protéine S1R cause des irrégularités, elle a depuis été étudiée avec des modèles de SLA ainsi qu'avec sa forme mutée. Plusieurs perturbations et effets de gains de fonctions toxiques en ont été ressortis en plus d'effets de pertes de fonctions de la protéine étudiée par différentes méthodes. Par exemple, des études sur le variant E102Q ont établi que la mobilité intracellulaire du variant est réduite (Wong *et al.*, 2016). Il y a des défauts de transport intracellulaire, les déplacements de vésicules entre le RE et le Golgi sont compromis. De plus, il a été dévoilé que des protéines liées à la SLA, FUS et TDP43, qui sont aussi des protéines de liaison aux ARN habituellement nucléaires, s'accumulent et s'agrègent au niveau cytoplasmique (Dreser *et al.*, 2017). Ses rôles dans le transport intracellulaire et nucléocytoplasmique peuvent aider S1R à contribuer à la régulation de l'homéostasie protéique et à la bonne localisation de protéines impliquées dans la régulation de l'activité neuronale.

D'autres études sur des modèles de SLA démontrent que la protéine S1R est accumulée dans le RE, de même que d'autres protéines mal repliées. Cela augmente le stress au RE et induit le système de UPR qui inclue l'autophagie (Prause *et al.*, 2013). Il a été déterminé que le variant interagit moins avec BiP que la protéine sauvage, contribuant à la dérégulation de l'homéostasie calcique en promouvant le déplacement du calcium vers les mitochondries (Rodriguez-Munoz *et al.*, 2020). Des défauts dans les processus autophagiques peuvent nuire à la régulation des canaux qui contrôle l'excitabilité neuronale. D'autre part, des études par méthode de délétion génétique (*knockout*, KO) de S1R ont montré que l'excitabilité des motoneurons est plus élevée chez les souris KO que chez les souris sauvages (Mavlyutov *et al.*, 2015). Les effets du variant E102Q sur l'autophagie et les relations entre S1R et l'activité neuronale seront expliqués davantage dans les prochaines sections.

1.3 Autophagie

Afin de mieux comprendre les effets que peut avoir le variant sur l'homéostasie cellulaire, une description détaillée des processus autophagiques permet de saisir l'importance des rôles que peut jouer S1R à ce niveau. Le terme autophagie décrit la dégradation de composants cytosoliques à l'intérieur de lysosomes (Cuervo, 2004a). C'est un processus qui peut être non-sélectif comme il peut être sélectif. C'est-à-dire que l'autophagie débarrasse le cytosol de manière aléatoire, mais qu'il existe des mécanismes qui font en sorte qu'une portion du cargo à dégrader est aussi choisi (Glick *et al.*, 2010). L'autophagie a plusieurs rôles physiologiques et pathophysiologiques, comme l'adaptation aux carences, le développement, l'antivieillessement et la mort cellulaire (Mizushima, 2005). L'autophagie est un processus dynamique de recyclage et de dégradation qui permet le roulement des protéines. Elle aide à laisser place à de nouvelles protéines en contribuant à la dégradation de celles qui ont eu une longue durée de vie et qui ne sont plus utiles. L'autophagie est ainsi un grand contributeur de la maintenance de l'homéostasie cellulaire. Elle est responsable de recycler les organites tels les mitochondries, le Golgi, le RE et le noyau en récupérant les produits de leur dégradation. Elle permet aussi de faire un grand ménage lorsque les autres formes de dégradation, comme le système ubiquitine/protéasome (UPS), ne sont pas disponibles (Kelekar, 2005).

Les différentes formes d'autophagie définies jusqu'à présent sont la microautophagie, la macroautophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes. La microautophagie décrit lorsque la surface des lysosomes engouffre directement du cytoplasme par la déformation de la membrane des lysosomes. La macroautophagie comprend plutôt une fusion entre les lysosomes et des vésicules à double membranes contenant de larges protéines ou organites. L'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) implique un complexe formé entre un substrat protéique et des protéines chaperonnes (Cuervo, 2004b). Les substrats contiennent un motif semblable à la séquence KFERQ qui permet leur reconnaissance par la protéine chaperonne Hsc70. Les complexes résultants interagissent avec un récepteur de la membrane lysosomale (LAMP2A) afin de permettre la translocation du substrat dans les lysosomes avant leur dépliement et dégradation (Cuervo, 2004b; Juste et Cuervo, 2019). Le terme autophagie, en référence à la macroautophagie, sera utilisé au cours des prochaines pages pour simplifier la lecture, à moins d'indication contraire.

1.3.1 Mécanisme général

L'autophagie est un processus qui se produit en distinctes phases, soit : l'induction, l'élongation, la séquestration, la maturation, la fusion et la dégradation. La phase de séquestration débute avec la génération d'un phagophore qui enveloppe du cytoplasme et des organites. Il s'agrandit et lorsqu'il se referme, il conduit à la formation d'un autophagosome à double membrane (Mizushima *et al.*, 2002). Il s'y retrouve un mélange des marqueurs provenant du RE, des endosomes et des lysosomes, en plus de contenu cytosolique (Kirkegaard *et al.*, 2004; Kopitz *et al.*, 1990; Mitchener *et al.*, 1976). Ils vont de la taille de 0,5 μm à 1,5 μm en diamètre (Dunn, 1990). La maturation du processus autophagique implique la fusion des autophagosomes avec les lysosomes et la relâche du contenu des autophagosomes pour la dégradation médiée par les protéases des lysosomes (**Figure 1.10**) (Glick *et al.*, 2010; Punnonen *et al.*, 1992). Les produits dégradés sont retournés dans le cytosol par des perméases et des transporteurs pour de nouvelles synthèses de macromolécules et du métabolisme (Mizushima, 2007). Ces événements se produisent dans l'espace d'environ 10 à 15 minutes (Pfeifer, 1978).

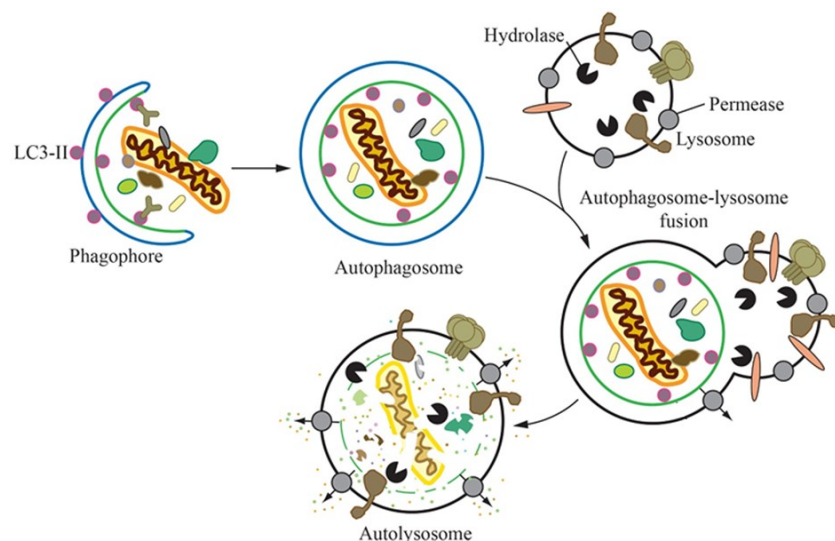


Figure 1.10 : Schéma illustrant le mécanisme général de l'autophagie. Les étapes de séquestration, de maturation et de dégradation sont visuellement représentées. Figure adaptée de (Klionsky, 2023).

1.3.2 Induction

Avant le début du processus d'autophagie, un mélange de facteurs propices à son induction a lieu. Bien qu'elle se produise en tout temps en conditions basales pour un renouvellement continu des

composants cytosoliques, il est possible d'induire l'autophagie en imposant des stress cellulaires (Mizushima, 2005). Parmi les inducteurs connus, les carences en nutriments sont les plus typiques (Mizushima, 2007). Les carences enclenchent une réponse adaptative avec l'autophagie en promouvant la survie jusqu'à ce que les nutriments redeviennent disponibles (Glick *et al.*, 2010). Une carence en sérum, en acides aminés ou en glucose a chacune un rôle dans le stress par la privation de nutriments induisant chacune une voie de signalisation spécifique résultant en l'induction des mécanismes autophagiques (Mizushima, 2007).

1.3.2.1 Séquestration et chargement

La phase de séquestration débute avec des protéines associées à l'autophagie (Atg), soit avec la liaison de Atg5 et Atg12. Cette liaison est possible grâce à l'activation de Atg12 par Atg7, puis à sa potentialisation par Atg10. Suivant cette étape, à cette liaison s'ajoute Atg16 et se forme un complexe qui se trouve au niveau des membranes d'isolation lors de l'élongation des phagophores (**Figure 1.11**) (Glick *et al.*, 2010). Atg16 est celle qui détermine où la formation des autophagosomes aura lieu (Fujita *et al.*, 2008). Il a été soutenu que ces membranes semblent provenir principalement du RE (Hayashi-Nishino *et al.*, 2009; Yla-Anttila *et al.*, 2009). Une protéine associée aux microtubules 1B (MAP1B) chaîne légère 3 (MAP1BLC3, raccourci en LC3B) se situe aussi au niveau des membranes durant l'élongation (Kabeya *et al.*, 2000). Le complexe Atg12-Atg5-Atg16 facilite la lipidation nécessaire de LC3B-I dans des étapes subséquentes (Tanida, 2011).

Pendant la formation des autophagosomes, LC3B-I, initialement cytosolique (proLC3B), subit des modifications post-traductionnelles. D'abord, il y a clivage par Atg4, transformant proLC3B en LC3B-I. Cette réaction est suivie d'une activation par Atg7 et d'une conjugaison à la phosphatidyléthanolamine (PE) médiée par Atg3, où LC3B-I devient LC3B-II (Glick *et al.*, 2010; Kabeya *et al.*, 2000; Tanida *et al.*, 2008). Le complexe Atg12-Atg5-Atg16 se dissocie progressivement des phagophores lors de l'élongation alors que l'ancrage lipidique permet à LC3B-II de se localiser aux membranes des autophagosomes (Tanida, 2011). LC3B-II est retrouvée sur la surface interne et la surface externe des autophagosomes, où elle joue un rôle dans l'hémifusion des membranes ainsi que dans la sélection de cargo pour dégradation (**Figure 1.11**) (Glick *et al.*, 2010). Une autre protéine, p62/SQSTM1, joue un rôle dans la séquestration et le

chargement en recrutant des protéines à dégrader. Dû à leur présence aux autophagosomes, p62 et LC3B-II servent de marqueurs d'activité autophagiques. La description de leurs fonctions sera détaillée dans la section 1.3.3.

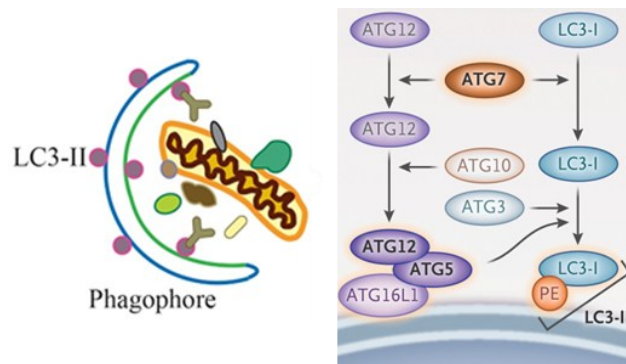


Figure 1.11 : Schéma illustrant les acteurs Atg12, Atg5, Atg6, Atg7, Atg10 et Atg3 impliqués à l'étape de séquestration de l'autophagie. Les transformations de LC3B-I sont également représentées avec la PE. Figures adaptées de (Collier *et al.*, 2021; Klionsky, 2023).

1.3.2.2 Maturation et fusion

La phase de maturation voit la formation des autophagosomes, avec LC3B-II associée aux membranes (Kabeya *et al.*, 2000). Cette phase implique aussi la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes. Avant la fusion avec les lysosomes, il a été suggéré que les autophagosomes se fusionnent d'abord avec des endosomes, mettant place aux amphisomes. Cette étape permettrait aux autophagosomes de récupérer la machinerie nécessaire pour la fusion aux lysosomes et de baisser le pH des vésicules autophagiques avant l'arrivée des protéases (Berg *et al.*, 1998; Eskelinen, 2005; Tooze *et al.*, 1990). La fusion aux lysosomes est distinguée en deux parties, soit la phase immature où les autophagosomes contiennent toujours leur double membrane et la phase mature qui consiste en les autolysosomes ayant perdu la membrane interne (Kelekar, 2005). Lors de cette étape de fusion, des protéines membranaires associées aux lysosomes 1 et 2 (LAMP1 et LAMP2) se retrouvent sur les autophagosomes immatures dits « intermédiaires » jusqu'à la fusion aux lysosomes. C'est alors que les autolysosomes matures acquièrent les enzymes de dégradation tels la cathepsine et les acides phosphatases (Punnonen *et al.*, 1992). D'autres protéines sont impliquées dans la fusion des autolysosomes comme la syntaxine STX17, SNAP29 et la protéine SNARE lysosomale VAMP8, elles ne seront pas discutées pour ce projet (Itakura et Mizushima, 2013).

1.3.2.3 Dégradation

Les enzymes digèrent le contenu des autophagosomes ainsi que le LC3B-II présent à l'intérieur des autophagosomes. Atg4 retire l'ancre lipidique des molécules de LC3B-II à la surface cytoplasmique des autophagosomes. Il en reste LC3B-I qui est renvoyé au cytosol et recyclé pour la formation de nouveaux autophagosomes. Après la dégradation, les autolysosomes deviennent des protolysosomes avant d'acquérir de nouvelles hydrolases lysosomales pour redevenir des lysosomes (Tanida, 2011).

1.3.3 Marqueurs d'activité autophagique

Plusieurs acteurs sont impliqués dans le processus d'autophagie, mais certains sont plus importants dans l'intérêt des recherches effectuées pour ce mémoire. Il sera principalement question des protéines p62, LC3B-I et LC3B-II. Il a été proposé que p62, possédant un domaine de liaison à l'ubiquitine, mène les protéines ubiquitinées aux membranes des autophagosomes pour dégradation par autophagie. LC3B-II, présent aux membranes des autophagosomes, servirait de récepteur pour p62, qui possède également une région interagissant avec LC3 (LIR) (**Figure 1.12**) (Bjorkoy *et al.*, 2005; Duran *et al.*, 2008; Glick *et al.*, 2010; Kabeya *et al.*, 2000; Pankiv *et al.*, 2007). Une accumulation de l'expression de p62 corrèle généralement avec une augmentation de l'activité autophagique, p62 est ainsi un des indicateurs de l'initiation de l'autophagie. Il a d'abord été découvert trois types de chaînes légères, soit LC1, LC2 et LC3 qui sont associées à MAP1A et MAP1B (Mann et Hammarback, 1994). LC3B-I a une masse moléculaire d'environ 17 kDa et est exprimée de manière ubiquitaire (Tanida *et al.*, 2008). Tel que mentionnée précédemment, la forme LC3B-II est recrutée aux membranes des autophagosomes et dégradée en même temps que le contenu des autophagosomes après la fusion aux lysosomes. La détection de LC3B-I et les changements de niveaux de LC3B-II plus précisément, reflètent alors différentes étapes de l'activité autophagique (Tanida *et al.*, 2008). Les niveaux d'expression de p62, de LC3B-I et de LC3B-II donnent tous les deux des informations sur l'autophagie (**Tableau 1.2**). L'évaluation des deux protéines est donc nécessaire pour l'étude du flux autophagique.

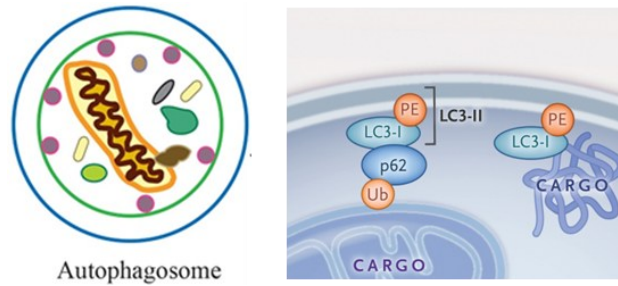


Figure 1.12 : Schéma illustrant les acteurs p62, LC3B-I et LC3B-II impliqués dans la sélection de cargo aux autophagosomes durant l'autophagie. Figures adaptées de (Collier *et al.*, 2021; Klionsky, 2023).

Tableau 1.2 : Résumé des interprétations possibles des niveaux de p62, de LC3B-I et de LC3B-II sur l'activité autophagique.

p62	LC3B-I	LC3B-II	Autophagie
+	-	-	Initiée, bloquée avant formation de LC3B-I
+	+	-	Initiée, bloquée avant lipidation de LC3B-I
+	-	+	Initiée, bloquée avant la dégradation
-	-	-	Inhibée avec défauts de formation de LC3B-I
-	+	-	Inhibée ou activée jusqu'à dégradation
-	-	+	Inhibée sans défauts de formation de LC3B-II

1.3.4 S1R, activité autophagique et SLA

Il a précédemment été mentionné que S1R possède de possibles rôles dans le processus autophagique et que le variant E102Q cause des irrégularités dans l'homéostasie cellulaire.

Des études ont montré que les niveaux de protéines ubiquitinées augmentent, la dégradation par les protéasomes est inhibée et l'apoptose est induite lorsque la fonction de S1R est réduite par l'inactivation du gène correspondant (*knockdown*, KD). De plus, il peut être observé de nombreuses vacuoles semblant contenir du matériel à dégrader (autophagosomes), suggérant une implication dans la régulation de l'autophagie (Prause *et al.*, 2013). Il a été trouvé que la dégradation médiée par les fonctions autophagiques sont perturbées lors de la perte de S1R (Vollrath *et al.*, 2014). En effet, les autophagosomes s'accumulent et ne se fusionnent pas avec les lysosomes pour former des autolysosomes nécessaires à la dégradation autophagique, selon des études faites avec le variant

E102Q (Dreser *et al.*, 2017). La dégradation protéasomique ainsi que le recyclage autophagique sont alors perturbés lors de l'absence de S1R.

Il a été déterminé que des ligands de S1R modulent le processus d'autophagie d'une manière dose-dépendante (Schrock *et al.*, 2013). Un agoniste de S1R (ANAVEX-73) a été prouvé efficace pour accroître l'autophagie et réduire la toxicité protéique en diminuant l'agrégation de protéines (Christ *et al.*, 2019). Le rôle exact de S1R dans les fonctions autophagiques n'est cependant pas encore tout à fait connu. Puisqu'elle est autant versatile et qu'une activité autophagique saine est primordiale pour le maintien de l'homéostasie neuronale, S1R est aussi étudiée dans la médiation de l'activité neuronale dans la section qui suit.

1.4 Activité neuronale

Afin de capter l'impact du variant E102Q sur l'excitabilité neuronale, une revue du fonctionnement de l'activité neuronale facilitera la compréhension des différents rôles de S1R dans ces processus. L'activité neuronale est responsable de la captation, l'intégration et la transmission des informations dans le système nerveux, ce qui est crucial pour toutes fonctions cérébrales (Catterall, 1984). Le système nerveux contrôle le corps en assurant une bonne communication entre ses cellules neuronales et non neuronales. Une importante propriété des neurones est qu'ils sont excitables. Leur excitabilité réfère à leur capacité à utiliser un signal chimique (neurotransmetteur) et à le transformer en flux de courant électrique à travers la membrane cellulaire et de déclencher un potentiel d'action (PA) (Catterall, 1984; Meriney *et al.*, 2019). Le PA transmet un signal à partir du segment initial de l'axone (AIS) du corps cellulaire (soma), tout le long de l'axone jusqu'aux terminaisons nerveuses (**Figure 1.13** et **1.15**). Ces actions décrivent l'excitabilité intrinsèque qui sera détaillée dans une section suivante. La synapse est la zone de contact entre deux neurones. La terminaison nerveuse du premier neurone (présynaptique) transmet des signaux chimiques sous forme de neurotransmetteurs aux dendrites du neurone suivant (postsynaptique) (**Figure 1.13**) (Meriney *et al.*, 2019). Les dendrites sont responsables de recevoir l'entrée d'information provenant des événements présynaptiques et de répondre avec des changements en potentiel de membrane. Le soma agit de même, en plus d'être le point de cumulation pour tous les changements de potentiel survenus dans les dendrites (**Figure 1.13**) (Catterall, 1984). Les événements au niveau

des synapses décrivent la transmission synaptique, dépendante largement de facteurs extrinsèques. Elle sera discutée dans la section suivante.

L'activité neuronale globale dépend de l'interaction constante entre l'excitabilité synaptique et intrinsèque. Les propriétés neuronales intrinsèques dépendent du nombre et de la distribution des canaux ioniques voltage-dépendants exprimés par un neurone. La génération de PA dépend aussi de ces canaux, par leur rôle dans le cycle de dépolarisation et de repolarisation. Il y a une continuité dans les rôles intrinsèques et synaptiques pour l'excitabilité neuronale. Ils déterminent comment les neurones reçoivent, intègrent et transmettent les informations (Pratt et Aizenman, 2007).

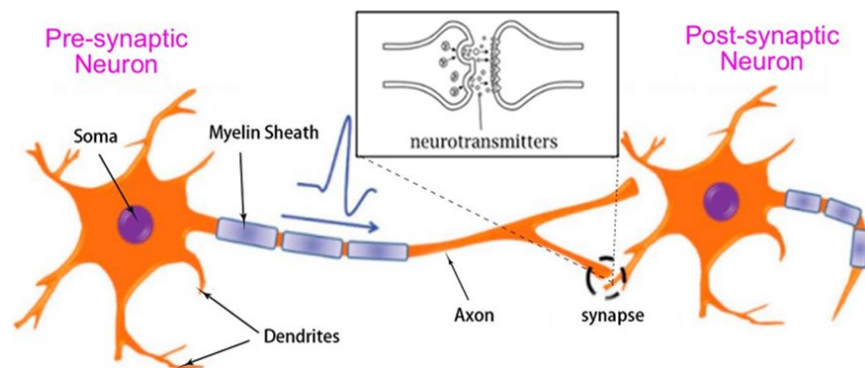


Figure 1.13 : Schéma représentant un réseau neuronal où un potentiel d'action présynaptique est acheminé aux synapses et des neurotransmetteurs sont libérés au neurone postsynaptique (Qin *et al.*, 2023-05-23).

L'excitabilité d'un neurone dépendant de son potentiel membranaire. Celui-ci désigne la différence de voltage à l'intérieur de la membrane par rapport au voltage à l'extérieur de la membrane neuronale. Au repos, le potentiel de membrane reste autour de -65 mV. Les PA sont seulement générés lorsque la dépolarisation atteint un seuil d'excitation qui active des canaux ioniques voltage-dépendants (Chen et Lui, 2025; Meriney *et al.*, 2019). Cette dépolarisation est possible grâce aux courants électriques créés par les échanges d'ions à travers la membrane plasmique. Les déplacements d'ions sont motivés par une distribution inégale de la charge d'ions spécifiques de part et d'autre de cette membrane. Ce déséquilibre est rectifié par l'ouverture des pores de canaux spécifiques à ces ions et le gradient de concentration s'occupe généralement de la direction des échanges (Catterall, 1984; Meriney *et al.*, 2019). Il est connu que le liquide intracellulaire a une plus grande concentration en ions K^+ , alors que le fluide extracellulaire est plus concentré en ions Na^+ et Ca^{2+} (Catterall, 1984). La membrane est perméable aux ions K^+ , car tous les neurones

expriment un type de canal K^+ qui reste ouvert au potentiel de repos (Aller *et al.*, 2005; Talley *et al.*, 2000; Talley *et al.*, 2001). La sortie de K^+ de manière spontanée est plus rapide que l'entrée des autres ions, rendant le potentiel de repos interne négatif à -65 mV (Catterall, 1984).

1.4.1 Transmission synaptique

Le mécanisme de transmission synaptique dépend du PA généré au niveau présynaptique pour voyager du AIS jusqu'aux terminaisons nerveuses (Meriney *et al.*, 2019). L'arrivée du PA permet l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (Cav). Une fois ouverts, ils permettent l'influx d'ions calcium (Ca^{2+}) et ainsi l'augmentation de sa concentration locale dans la région présynaptique. Cela facilite la relâche de neurotransmetteurs qui sont déjà emmagasinés dans des vésicules présynaptiques. Ce mécanisme implique la liaison du Ca^{2+} par les synaptotagmines. Cette interaction permet l'activation de la machinerie nécessaire à la fusion membranaire pour l'exocytose à l'aide des complexines et des protéines SNARE (Sudhof, 2012). Les neurotransmetteurs libérés peuvent traverser la fente synaptique et lier des récepteurs postsynaptiques spécifiques, soit les canaux ligand-dépendants qui seront résumés dans le paragraphe suivant. Une fois liés, ces derniers permettent l'influx de différents ions et la modulation du potentiel de membrane du neurone postsynaptique. Le tout pour convertir un signal électrique provenant de la cellule présynaptique en signal chimique qui peut ensuite traverser la fente synaptique et initier un signal à la cellule postsynaptique (Meriney *et al.*, 2019).

Parmi les récepteurs pouvant répondre aux neurotransmetteurs, il y a les récepteurs métabotropiques et les récepteurs ionotropiques. Les récepteurs métabotropiques fonctionnent avec des protéines G (les identifiant comme des récepteurs couplés aux protéines G, GPCR). Ils activent des cascades de voies de signalisation et modulent indirectement les passages d'ions. Les récepteurs ionotropiques répondent simplement aux neurotransmetteurs en tant que canaux ligand-dépendants et réagissent rapidement avec des flux d'ions (Roth, 2019). Les récepteurs ionotropiques, les canaux ligand-dépendants, sont ceux d'intérêt. Selon la nature des neurotransmetteurs, les neurones postsynaptiques portent alors une action excitatrice ou inhibitrice (Catterall, 1984). Parmi les neurotransmetteurs les plus répandus, il y a le glutamate et l'acide γ -aminobutyrique (GABA). Ce sont les principaux neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs, respectivement. Les récepteurs du glutamate incluent α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-

isoxalepropionique (AMPA) et N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Lorsqu'activés par le glutamate, ces récepteurs permettent l'entrée d'ions sodium (Na^+) et d'ions potassium (K^+). Les récepteurs NMDA permettent aussi le passage de Ca^{2+} , dépolarisant davantage la membrane (Traynelis *et al.*, 2010). Les récepteurs du GABA sont catégorisés en GABA_A et en GABA_B . Les GABA_B sont métabotropiques et ne seront pas discutés. Les récepteurs GABA_A laissent le passage d'ion chlore (Cl^-), ce qui a comme action d'hyperpolariser la membrane (**Figure 1.14**) (Olsen et Sieghart, 2009).

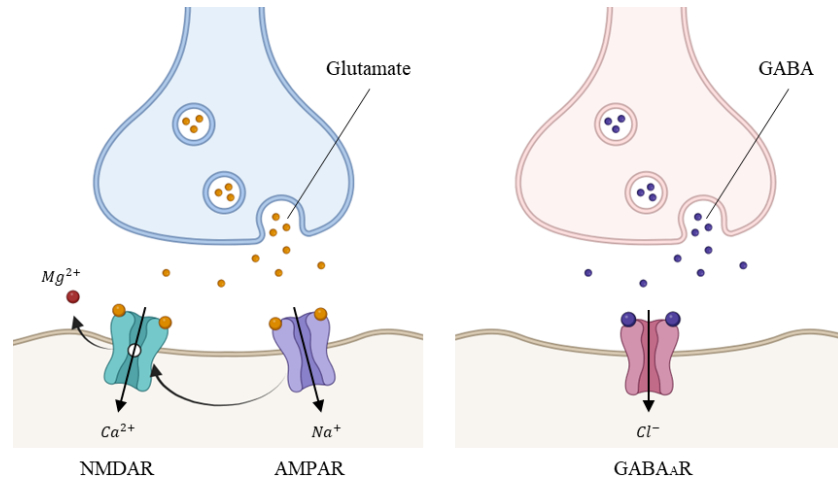


Figure 1.14 : Schéma résumant les mécanismes des récepteurs AMPA, NMDA et GABA. Les événements excitateurs sont illustrés à gauche avec AMPAR et NMDAR. Les événements inhibiteurs sont illustrés à droite avec GABA_A . Inspiré de (Wang et Kriegstein, 2008).

Les neurones postsynaptiques répondent à ces signaux avec des changements de potentiel excitateurs (PPSE) ou inhibiteurs (PPSI) grâce aux canaux ligand-dépendants. Leur sommation se rend jusqu'au AIS, où elle dicte du seuil d'excitation. Les neurones sont en constante adaptation selon l'excitation synaptique (Schulz *et al.*, 2006). Dès le passage des signaux au neurone postsynaptique, les mécanismes d'excitabilité intrinsèque sont déclenchés.

1.4.2 Excitabilité intrinsèque

Les propriétés intrinsèques des neurones déterminent les événements survenant de l'arrivée au niveau synaptique jusqu'à la transmission aux axones. Cette relation entre la captation et la transmission du signal est le cœur de toute activité du système nerveux (Schulz *et al.*, 2006). Lorsque le seuil d'excitation est atteint par l'arrivée des signaux chimiques transmis par les synapses, un PA est déclenché à partir de l'AIS (**Figure 1.15**) (Catterall, 1984). Les canaux

ioniques voltage-dépendants jouent des rôles importants dans l'excitabilité intrinsèque. Leur expression, leur composition et leur activation déterminent les états d'excitabilité neuronale, que ce soit physiologique ou pathophysiologique. La régulation de ces canaux ioniques permet de stabiliser l'excitabilité neuronale et de contrer les changements subits (Schulz *et al.*, 2006). Au AIS, une grande concentration de canaux sodiques est présente (**Figure 1.15**). Les canaux les plus souvent mentionnés sont les canaux sodiques (Na^+), potassiques (K^+), chloriques (Cl^-) et calciques (Ca^{2+}) (Meriney *et al.*, 2019).

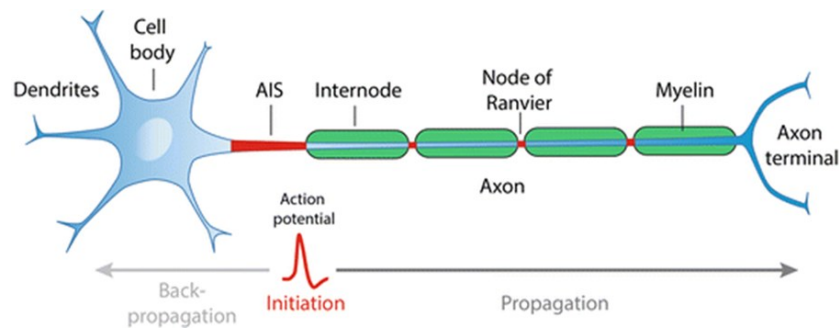


Figure 1.15 : Schéma de l'organisation structurelle d'un neurone montrant l'initiation et la propagation d'un PA (Freeman *et al.*, 2016). Le AIS est concentré en canaux ioniques voltage-dépendants pouvant moduler le potentiel de membrane et déclencher des PA.

L'atteinte du seuil de voltage active les canaux Nav et dépolarise la membrane. Un PA est généré, augmentant le potentiel de membrane par l'entrée d'ions Na^+ et les canaux Nav se referment rapidement (Chen et Lui, 2025; Meriney *et al.*, 2019). En même temps, les canaux Kv s'ouvrent, mais plus lentement dû au temps de changement de conformation. La sortie d'ions K^+ repolarise la membrane jusqu'au retour au potentiel de repos. La fermeture lente des canaux Kv a comme conséquence l'hyperpolarisation temporaire. Le potentiel revient au repos lorsque les canaux Kv se referment et que la pompe ATPase Na^+/K^+ rectifie la distribution des charges (**Figure 1.16**) (Kuang *et al.*, 2015; Meriney *et al.*, 2019).

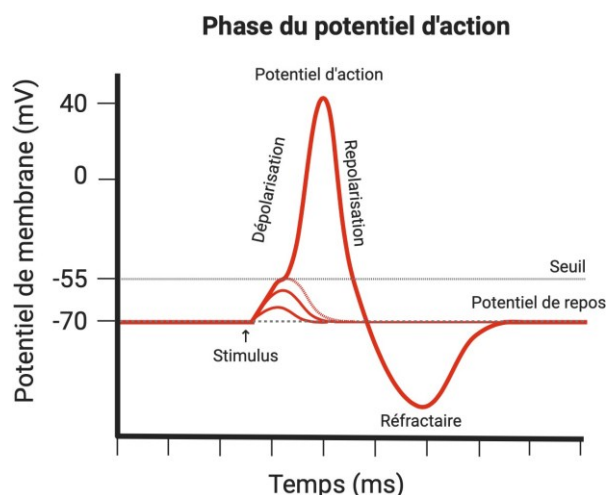


Figure 1.16 : Graphique résumant les différentes phases d'un potentiel d'action. Le PA est déclenché par une sommation de PPSE et PPSI atteignant le seuil d'excitation. La membrane est repolarisée jusqu'à une légère hyperpolarisation. La membrane retourne au potentiel de repos. Image générée par (<https://biorender.com>).

1.4.3 Canaux potassiques voltage-dépendants (Kv)

Une grande diversité de canaux ioniques voltage-dépendants est présente dans le cerveau. Leurs propriétés diffèrent par leur expression et leur localisation subcellulaire. Selon leurs rôles, les canaux K^+ voltage-dépendants sont ainsi d'importants modulateurs de l'excitabilité intrinsèque (**Figure 1.17**) (Vacher et Trimmer, 2012).

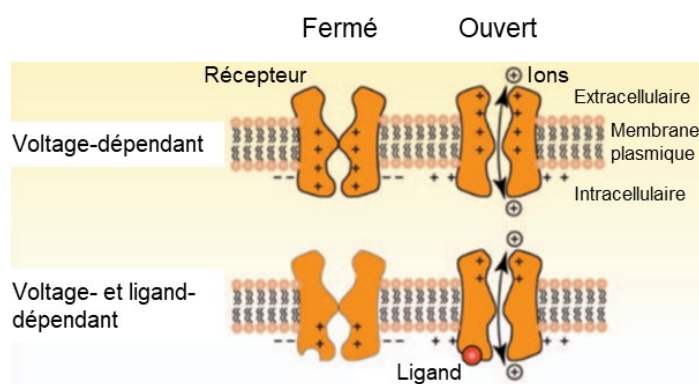


Figure 1.17 : Schéma illustrant les différents stimuli provoquant l'ouverture ou la fermeture des canaux ioniques. L'activation par un ligand extracellulaire ou intracellulaire, par une différence de voltage ainsi que par la combinaison de voltage et de ligand est montrée. Figure adaptée de (Meriney *et al.*, 2019).

Les Kv se démarquent par leurs multiples sous-unités. Les sous-unités qui forment le pore et permettent le passage des ions sont appelées α . Les sous-unités auxiliaires sont plutôt nommées β .

Chaque sous-unité α des Kv peut être associée à une sous-unité β (Meriney *et al.*, 2019). Il y a plus de 30 différents types de sous-unités α et plus de 10 types de sous-unités β chez les Kv. Il existe un nombre élevé de combinaisons de ces sous-unités, 12 sous-familles en ont été formées allant de Kv1 à Kv12 (**Figure 1.18**) (Gonzalez *et al.*, 2012). Les sous-familles Kv1 à Kv4 sont celles qui ont le plus souvent été associées avec le système nerveux (Robbins et Tempel, 2012). Cette grande variété fait en sorte que les canaux Kv peuvent être faits sur mesure pour plusieurs fonctions neuronales distinctes, telles que la régulation du potentiel de repos et la repolarisation du PA (Meriney *et al.*, 2019). Par leur présence aux axones et aux dendrites, une de leurs fonctions principales est de réguler le flux des ions K^+ au niveau de la membrane plasmique, ce qui est primordial dans l'excitabilité neuronale (Jensen *et al.*, 2011; Kuang *et al.*, 2015). Pour assurer leurs fonctions d'importance capitale, une régulation stricte de leur expression, de leur distribution et de leur localisation est de mise (Schulz *et al.*, 2008).

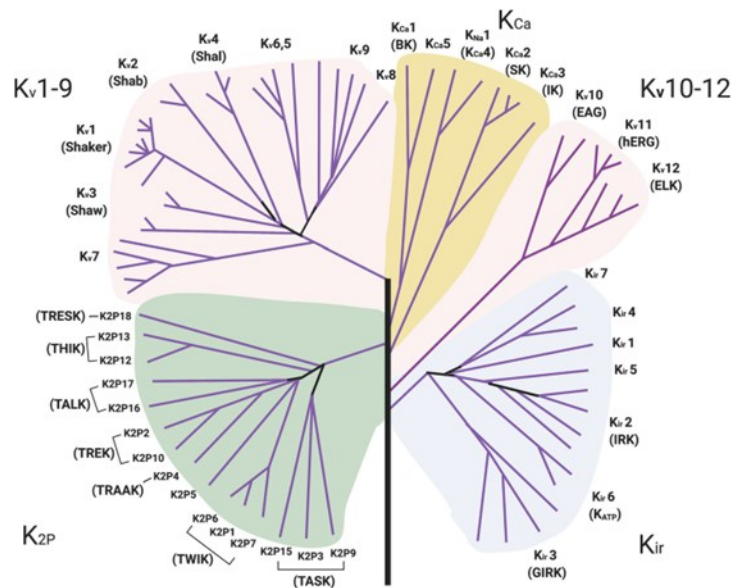


Figure 1.18 : Diagramme représentant la diversité des familles de canaux K^+ incluant les Kv (Taura *et al.*, 2021).

Chaque sous-unité α monomère des Kv est composée de six hélices transmembranaires. Les régions N- et C-terminales sont intracellulaires et le côté N-terminale contient le domaine T1, important pour le routage du canal à la surface cellulaire et la tétramérisation. Les quatre premières hélices (S1 à S4) forment le domaine du capteur de tension qui détecte les variations de potentiel

membranaire. Les deux autres hélices (S5 et S6) forment le domaine du pore qui permet le passage des ions K^+ . Ces deux domaines sont responsables des changements de conformation et des ouvertures et fermetures du canal. Les résidus chargés positivement se trouvant dans l'hélice S4 contribuent à ces mouvements (**Figure 1.19 A**) (Kuang *et al.*, 2015).

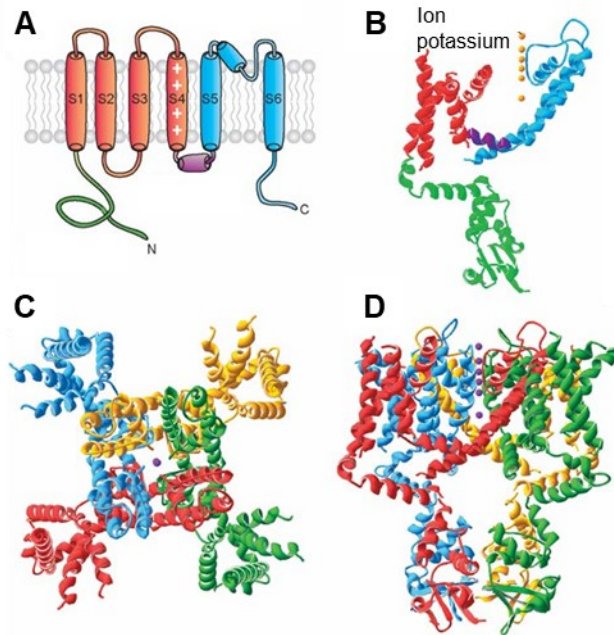


Figure 1.19 : Représentation schématique des Kv. (A) Schéma de la structure 2D d'une sous-unité α d'un Kv montrant les six hélices transmembranaires différenciant le domaine du capteur de tension en rouge et le domaine du pore en bleu. La région N-terminale est représentée en vert et contient le domaine T1. (B) Représentation 3D de la structure d'une sous-unité α monomérique d'un Kv. (C) Représentation 3D de la structure d'un tétramère formant un Kv vue de dessus avec une couleur distincte pour chaque sous-unité α . (D) Représentation 3D du tétramère vue de côté. Figure adaptée de (Tombola *et al.*, 2006).

Les Kv sont formés de sous-unités α qui s'assemblent pour obtenir des complexes tétramériques (**Figure 1.19 B-C-D**). Ces assemblages ont lieu dans le RE et ils déterminent le taux d'expression des Kv à la surface cellulaire (Jensen *et al.*, 2011). La destination des Kv dépendent de plusieurs facteurs comme les sous-unités auxiliaires β ou les interactions protéine-protéine. Ces facteurs dictent par le fait même les rôles spécifiques des Kv en déterminant leur localisation (Capera *et al.*, 2019). Une fois arrivés à leurs destinations, les Kv doivent avoir recours à des mécanismes qui les retiennent à ces endroits, tels des interactions avec d'autres protéines.

1.4.3.1 Sous-unités auxiliaires (β)

Les sous-unités auxiliaires β sont importantes dans la régulation des canaux, que ce soit dans leur activation et leur inactivation ou dans leur perméabilité aux ions. Elles sont capables de préciser leur conductance ionique ainsi que leur localisation subcellulaire (Deutsch, 2002; Vacher et Trimmer, 2011). Certaines sous-unités modulent les Kv en modifiant leur sensibilité au potentiel membranaire (Yu et Catterall, 2004).

La protéine chaperonne S1R pourrait être considérée comme une sous-unité auxiliaire atypique des canaux voltage-dépendants (Kourrich, 2017). À l'opposé des sous-unités auxiliaires conventionnelles qui sont présentes à la membrane plasmique, S1R peut être retrouvée à différents endroits dans la cellule (**Figure 1.9**) (Lachance *et al.*, 2023; Vacher *et al.*, 2008). De plus, S1R ne correspond pas exactement aux critères des sous-unités auxiliaires, parce qu'elle ne s'associe pas intégralement aux sous-unités principales formant le pore des canaux (Kourrich, 2017; Kourrich *et al.*, 2013). Alors que les sous-unités auxiliaires typiques sont généralement spécifiques à des sous-familles de canaux ioniques, S1R répond aux caractéristiques pour plusieurs sous-familles, incluant les Kv1 (Aydar *et al.*, 2002; Kourrich, 2017; Kourrich *et al.*, 2012).

1.4.4 S1R, Kv et SLA

Il a été mentionné que l'absence de S1R cause une hyperexcitabilité dans un modèle murin dans des études en lien avec la SLA. En effet, le KO de S1R semble augmenter la génération de PA (Mavlyutov *et al.*, 2013; Mavlyutov *et al.*, 2015). Il a également été documenté que de multiples canaux potassiques, dont Kv1.2, ont un niveau d'expression diminué dans les neurones moteurs de patients de la SLA (Stringer et Weiss, 2023).

Des recherches ont montré l'interaction entre Kv1.4 et S1R et ont déterminé que l'activation de S1R inhibe les courants K^+ (Aydar *et al.*, 2002). De plus, il a par ailleurs été observé que S1R joue un rôle dans le trafic des canaux vers la membrane plasmique en augmentant l'expression à la surface de la membrane de Kv1.2 (Delint-Ramirez *et al.*, 2020; Kourrich *et al.*, 2013).

Puisque les Kv sont d'importants modulateurs de l'activité neuronale, leur régulation est cruciale à un fonctionnement normal des neurones. Vu l'implication de S1R dans le trafic de Kv1.2 et dans

l'hyperexcitabilité observée en relations avec la SLA, il serait intéressant de voir l'effet du variant dans la pathologie de la SLA. Les mécanismes par lesquels S1R régule ce canal ne sont toutefois pas complètement saisis. Le manque de connaissance à propos des fonctions spécifiques de S1R invite aussi à en apprendre davantage.

1.5 Problématique

La SLA est une maladie dont la pathologie touche plusieurs aspects de la motilité. Toujours incurable, elle mérite d'être étudiée davantage dans le but d'avancer les connaissances pouvant mener éventuellement à de meilleurs traitements. L'hyperexcitabilité est un des symptômes connus de la maladie qui est étudiée. La jSLA, d'où la mutation E102Q de la protéine S1R a été tirée, est moins investiguée dû à sa rareté. Cependant, quelques anomalies pertinentes du variant E102Q ont été ressorties des études existantes. Parmi les fonctions affectées, le transport nucléocytoplasmique et les processus autophagiques peuvent jouer un rôle dans l'excitabilité par leur contribution à la régulation des protéines impliquées. Aujourd'hui, les mécanismes et les déterminants moléculaires associés à ces dysfonctions ne sont pas encore connus. Par conséquent, afin d'obtenir une meilleure compréhension du rôle neuroprotecteur de la protéine sauvage et du rôle de son variant dans la pathogénèse de la jSLA, il est primordial de déterminer l'impact de ce variant sur les mécanismes cellulaires neuroprotecteurs.

1.6 Objectifs de recherche

Comme il a été décrit, la protéine chaperonne S1R par elle-même joue plusieurs rôles essentiels dans la régulation de fonctions neuroprotectrices. Alors déjà, une altération dans sa nature avec le variant E102Q associé à la jSLA vient perturber une protéine importante. Pour en rajouter, il a été découvert que S1R est essentielle dans la modulation de mécanismes primordiaux comme le transport nucléocytoplasmique, l'autophagie et l'activité neuronale. En se concentrant sur l'hyperexcitabilité observée dans la SLA, mon projet explore les effets de la mutation E102Q sur les mécanismes régulant l'activité neuronale, en particulier ceux impliqués dans le contrôle de l'excitabilité.

Nous proposons alors que le variant E102Q cause des irrégularités dans sa structure et sa localisation subcellulaire et, par ce fait, perturbe ses fonctions. Nous estimons que S1R joue un

rôle dans le transport nucléocytoplasmique de protéines responsables du métabolisme des ARN comme TDP43. De plus, nous croyons qu'elle aide à la fusion des autophagosomes aux lysosomes dans l'autophagie, régulant les niveaux de protéines et leur recyclage. Finalement, nous pensons que les dysfonctions menées par le variant E102Q empêchent S1R de participer au trafic du canal Kv1.2 jusqu'à la surface membranaire en bouleversant sa traduction, sa stabilisation et sa localisation.

L'objectif principal des recherches de ce mémoire a alors pour but de caractériser l'impact du variant E102Q sur la localisation et les fonctions biologiques de S1R. Nous avons comme but de définir comment ces fonctions mènent à l'hyperexcitabilité observée dans la SLA. Nous avons réalisé le projet en développant 4 sous-objectifs.

S-obj. 1 : Définir la localisation de S1R et de son variant avec des essais de fractionnement subcellulaire.

S-obj. 2 : Déterminer comment la localisation du variant affecte le rôle de S1R dans les déplacements nucléocytoplasmiques d'une protéine de liaison à l'ARN associée à la SLA, TDP43, avec des essais de fractionnement.

S-obj. 3 : Déterminer comment les troubles du variant dans le transport nucléocytoplasmique perturbe les mécanismes par lesquels S1R modulent l'autophagie en testant l'expression de marqueurs autophagiques.

S-obj. 4 : Évaluer l'impact des altérations du variant sur le transport et l'autophagie sur l'expression membranaire de Kv1.2, en présence ou non d'un agoniste.

Ces études sont faites dans l'ambition d'approfondir les connaissances sur S1R et ses multitudes de fonctions pour arriver à des fins thérapeutiques. En avantage, elles permettent aussi d'approfondir les notions sur la protéine chaperonne de façon fondamentale.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Réactifs

Les réactifs utilisés ont été achetés de différentes compagnies : Tris-Base (BioShop #TRS001), dodécylsulfate de sodium (SDS) (BioShop #SDS001), IGEPAL (SigmaAldrich #I8896), inhibiteur de protéases *Ultra_Protease Inhibitor* (ThermoFisher #A32955), glycine (Wisent #800-045-LG), billes de sépharose conjuguées à la protéine A (ThermoFisher #101041), acrylamide/bisacrylamide 40% (BioRad #1610149), persulfate d'ammonium (APS) (BioRad #1610700), tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (BioBasic #110-18-9), membranes de nitrocellulose 0,2 µM (BioRad #1620112), *Ponceau S Staining Solution* (ThermoFisher #A40000278) et 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) *TMB Chromogen Solution (for ELISA)* (ThermoFisher #002023).

2.2 Anticorps

Les anticorps utilisés dans le cadre des expériences ont été obtenus de différentes compagnies : anti-SIGMAR1 (clone D4J2E) (CellSignaling #61994S, AB_2799617), anti-Lamin A/C (4C11) (CellSignaling #4777S, AB_10545756), anti-TDP43 (clone G400) (CellSignaling #3448S, AB_2271509), anti-p62/SQSTM1 (Progen #GP62-C, AB_2687531), anti-LC3B (D11) (CellSignaling #3868S, AB_2137707), anti-GFP (GF28R) (ThermoFisher #MA5-15256, AB_10979281), anti-V5 (clone 7/4) (AB_2566387), anti-Kv1.2 (clone K14/16) (MilliporeSigma #MABN77, AB_10806493), anti-Kv1.2 (ThermoFisher #PA5-76901, AB_2720628), anti-Mouse-HRP (ThermoFisher #31436), anti-Rabbit-HRP (ThermoFisher #31461) et anti-Guinea Pig-HRP (ThermoFisher #A18775).

2.3 Culture cellulaire

Des cellules de reins embryonnaires humaines HEK293T (ATCC #CRL-3216) ont été maintenues en culture dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Wisent #319-005-CS), alors que des cellules de neuroblastomes humains SH-SY5Y (SigmaAldrich #94030304-1VL) ont été maintenues dans du milieu DMEM/F12 (*Nutrient Mixture F-12*) (Wisent #319-075-CS). Chaque lignée a été supplémentée de sérum de veau fœtal (FBS) (Wisent #080-150) à 10%. Les cellules ont été conservées à une température de 37°C dans une atmosphère de 5% de CO₂. Les

cellules HEK293T ont été ensemencées au compte de 350 000 cellules par puits dans des plaques de 6 puits pour les expériences de fractionnement et d'autophagie et au compte de 700 000 cellules par puits dans des plaques de 6 puits pour les expériences d'immunoprécipitation. Les cellules SH-SY5Y ont été ensemencées au compte de 700 000 cellules par puits de plaques 6 puits pour les expériences d'autophagie et 80 000 cellules par puits de plaques 24 puits pour les expériences ELISA. Des puits 100 mm à confluence de 80% des cellules SH-SY5Y ont été utilisés pour les expériences de fractionnement.

2.4 Construction de plasmides

Certains ADN plasmidiques utilisés lors des expériences ont été construits au laboratoire. Les inserts d'intérêt ont été amplifiés par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) avec le kit *Phusion High-Fidelity PCR Kit* (NEB #E0553L) avec les oligonucléotides correspondants. Pour produire hS1R-WT-V5, les oligonucléotides sens 5'-GGCGGTACCATGCAGTGGGCCGTGGGCCG-3' et antisens 5'-GGCCTCGAGCGAGGGTCCTGGCCAAAGAGG-3' ont été utilisés pour cloner S1R (NM_005866.4) dans le vecteur pcDNA3.1 V5-6xHis-TOPO TA entre les sites de restriction Kpn I et Xho I avec l'étiquette V5-6xHis positionnée en C-terminal. Pour produire hS1R-YFP, les oligonucléotides sens 5'-GGCGAATTCATGCAGTGGGCCGTGGGCCG-3' et antisens 5'-GGCGGATCCCGAGGGTCCTGGCCAAAGAGG-3' ont été utilisés pour cloner S1R (NM_005866.4) dans le vecteur pEYFP-N1 entre EcoRI et Bam HI avec l'étiquette YFP positionnée en C-terminal. Pour FLAG-mKv1.2, les oligonucléotides sens 5'-GGGGGATCCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGACAGTGGCCACCGGAGACCC-3' et antisens 5'-GGGCTCGAGTCAGACATCAGTTAACATTTTGG-3' ont été utilisés pour cloner Kv1.2 (BC138651.1) dans le vecteur pcDNA 3.1(+) zeo entre les sites de restriction BamHI et XhoI avec l'étiquette FLAG positionnée en N-Terminal. Pour FLAG-mKv1.2-TOPO, les oligonucléotides sens 5'-GGGAAGCTTATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGACAGTGGCCACCGGAGACCC-3' et antisens 5'-GGGCTCGAGTCAGACATCAGTTAACATTTTGG-3' ont été utilisés pour cloner Kv1.2 (BC138651.1) dans le vecteur pcDNA3.1 V5-6xHis-TOPO TA entre les sites de restriction Hind III et Xho I avec l'étiquette FLAG positionnée en N-terminal.

Pour produire les ADN plasmidiques comprenant la mutation E102Q, hS1R-E102Q-V5 et hS1R-E102Q-YFP, une mutagenèse dirigée a été effectuée avec le kit *Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (Without Competent Cells)* (NEB #E0552S) avec les oligonucléotides sens 5'-GCCTCGCTGTCCCAGTATGTGCTG-3' et antisens 5'-GTGCAGAAGGCACATGGCGCC-3' avant de les amplifier avec la méthode décrite précédemment. Les séquences codantes de chaque plasmide ont été validées par séquençage de Sanger.

2.5 Transfection

Les cellules ont été transfectées 24 heures après l'ensemencement avec de l'ADN plasmidique en utilisant l'agent de transfection TransIT-LT1 (MJS BioLynx #MIR2305) en combinaison avec du Opti-MEM (ThermoFisher #31985070) pour les cellules HEK293T. Le réactif de transfection Lipofectamine 2000 (ThermoFisher #31985070) en combinaison du DMEM/F12 sans sérum a été utilisé avec les cellules SH-SY5Y. Les ADN plasmidiques utilisés incluent pcDNA3.1 (-) (ThermoFisher #V79020) et pcDNA3.1(+) zeo (ThermoFisher #V86020) provenant du laboratoire de Pr. Pilon, hS1R-V5, hS1R-E102Q-V5, pCMV-3XFLAG-LC3B-WT (Addgene #123092) qui présente l'étiquette 3XFLAG en N-terminal, FLAG-mKv1.2 et FLAG-mKv1.2-TOPO. Les quantités transfectées étaient de 2 µg total pour les essais de fractionnement avec les cellules HEK293T, soit avec 0,5 µg de hS1R-V5 ou de hS1R-E102Q-V5 complété de pcDNA3.1 (-) ou pcDNA3.1(+) zeo. Pour les essais d'autophagie avec les cellules SH-V5 et HEK293T, 1 µg total a été transfecté avec 0,5 µg de pCMV-3XFLAG-LC3B-WT complété de pcDNA3.1 (-) ou pcDNA3.1(+) zeo. Pour les ELISA avec les cellules SH-SY5Y, 1 µg de pcDNA3.1 (-) ou pcDNA3.1(+) zeo ou de FLAG-mKv1.2-TOPO a été transfecté. Pour les ELISA avec les cellules HEK293T, 2 µg total ont été transfectés avec 0,5 µg de FLAG-mKv1.2, soit complété de pcDNA3.1 (-) ou de pcDNA3.1(+) zeo, soit avec 0,5 µg de hS1R-V5 ou de hS1R-E102Q-V5 avant d'être complété de pcDNA3.1(-) ou de pcDNA3.1(+) zeo. Pour les essais d'immunoprécipitation, 3 µg total ont été transfectés avec 1,5 µg de hS1R-V5 complété de pcDNA3.1(-) ou de pcDNA3.1(+) zeo ou avec 1,5 µg de Flag-mKv1.2-TOPO et 1,5 µg de hS1R-V5 ou de hS1R-E102Q-V5. Les cellules transfectées ont été incubées à 37°C et à 5% de CO₂ pour une durée de 48 heures.

2.6 Lignées cellulaires stables

Les SH-SY5Y ont été transfectées par la même méthode avec le vecteur vide pEYFP-N1 (ClonTech #6006-1) provenant du laboratoire de Pr. Pilon, avec hS1R-YFP, hS1R-E102-YFP, hS1R-V5 et hS1R-E102Q-V5. Après 48 heures de transfection, les cellules ont été sujet à un changement de milieu supplémenté de l'antibiotique de sélection généticine G418 (Wisent #400-130) à une concentration finale de 800 ug/mL. Elles ont été maintenues ainsi avec un changement de milieu tous les 3 jours jusqu'à ce qu'il y ait suffisamment de colonies de cellules résistantes. Les cellules ont par la suite été entretenues avec 400 ug/mL de G418 afin d'avoir des populations de cellules exprimant stablement les protéines d'intérêt. Les expressions des protéines de chacune des lignées stables ont été vérifiées par immunobuvardage. Afin d'obtenir de meilleures expressions pour les lignées hS1R-V5 et hS1R-E102Q-V5, des lignées monoclonales ont été générées. Une sélection de cellules uniques a été faite sur chacune des lignées afin de poursuivre leur croissance de manière isolée. À quelques reprises, une nouvelle sélection a été effectuée dans chaque population résultante dans le but d'assurer leur monoclonalité, puis les derniers clones ont été maintenues. Des tests d'expression par immunobuvardage ont ensuite été effectués sur la population dérivée de chacun des clones finaux avant de sélectionner ceux avec les meilleures expressions. Dans le cas des lignées YFP stables, leur enrichissement a été accompli par cytométrie de flux.

2.7 Traitements

2.7.1 Localisation

Pour les expériences de localisation, les cellules ont été traitées avec de l'époxomicine (SigmaAldrich #324800) à une concentration finale de 1 μ M pendant 16 heures à 37°C avant l'extraction des protéines. Le traitement permet d'induire un stress protéotoxique en liant des sous-unités des protéasomes, inhibant principalement leur activité de type chymotrypsine et de localiser S1R, son variant et TDP43 selon leur réponse au stress.

2.7.2 Autophagie

Pour les expériences d'autophagie, les cellules ont été traitées avec des milieux en carence soit de sérum (DMEM ou DMEM/F12 sans FBS), soit d'acides aminés (*Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) (ThermoFisher #14170112)), soit de glucose (DMEM sans glucose (Wisent #319-062-

CL)). Les milieux sans acides aminés et sans glucose ont été supplémenté de sérum dialysé (Wisent #080-910). Le traitement a été fait pendant 6 heures à 37°C dans le but d'induire l'autophagie avant l'extraction des protéines. Certaines expériences ont aussi requis un traitement à la bafilomycine A1 (SigmaAldrich #196000) à une concentration finale de 100 nM pendant 6 heures à 37°C dans le but d'empêcher la dégradation autophagique en inhibant l'activité lysosomale. La bafilomycine inhibe l'acidification des autolysosomes nécessaire à leur activité en interagissant avec les pompes de proton de type vacuolaire (V-ATPases).

2.7.3 Kv1.2

Pour les expériences avec Kv1.2, les cellules ont été traitées avec du PRE-084 (SigmaAldrich #P2607) à une concentration finale de 3 µM pendant 10 minutes, 30 minutes et 60 minutes à 37°C dans le but d'avoir un effet d'activation avec un agoniste connu de S1R.

2.8 Extraction, quantification et dénaturation de protéines

Pour les essais d'autophagie, les cellules ont été récoltées et lysées avec du tampon de lyse (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Base pH 8.0, 10 mM Na₄P₂O₇, 5mM EDTA pH 8.0, 0,1% de SDS, 0,5% Na-Deoxycholate, 1% IGEPAL et 1X d'inhibiteur de protéases *Ultra_Protease Inhibitor*) pendant 30 minutes à 4°C. La solution de lyse pour les essais d'immunoprécipitation diffère par le retrait de l'EDTA et du SDS et par l'ajout de 10% de glycérol. Les protéines insolubles ont été retirées des lysats par centrifugation. Les concentrations protéiques de chacun des extraits ont été déterminées par dosage avec la méthode acide bicinchoninique (BCA) avec le kit *Pierce BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher #23225) afin d'avoir des quantités équivalentes pour l'immunobuvardage. Les échantillons ont ensuite été dénaturés avec du tampon de dénaturation (pour des concentrations finales de 50 mM Tris-Base, 10% glycérol, 2% SDS, 1% 2-mercaptoéthanol et solution de bromophénol) pendant 5 minutes à 95°C.

2.9 Fractionnement

Pour les essais de localisation, les cellules ont été sujets à différents protocoles de fractionnement, soit un distinguant les protéines solubles des protéines insolubles au Triton-X-100 et un séparant les protéines totales, les protéines cytoplasmiques et les protéines nucléaires tel décrit dans le protocole *Rapid Isolation of Nuclei from Cells In Vitro* (Nabbi et Riabowol, 2015).

2.9.1 Triton-X-100 soluble et insoluble

Les cellules ont été lysées dans une solution de tampon phosphate salin (PBS) contenant 1% de Triton-X-100 et 1X d'inhibiteur de protéases pendant 30 minutes à 4°C. Les lysats ont été centrifugés à 15 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C pour obtenir les fractions solubles avec les surnageants. Les culots ont été lavés 4 fois avec la solution de lyse puis incubés à nouveau dans une solution de PBS contenant 1% de Triton-X-100 en plus de 1% de SDS avec 1X d'inhibiteur de protéases pendant 1 heure à 60°C. Les lysats ont été centrifugés à 15 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C et les surnageants ont été récoltés pour les fractions insolubles. Les quantités de protéines ont été dosées à partir des échantillons avec le même kit de BCA et les échantillons ont été dénaturés avec du tampon de dénaturation pendant 30 minutes à température pièce.

2.9.2 Total, cytoplasmique et nucléaire

Les cellules ont été lysées par 5 triturations avec une solution de PBS contenant 0,1% d'IGEPAL. Les fractions totales ont été récoltées, puis les extraits ont été centrifugés à 4 000 rpm pendant 3 minutes. Les fractions cytoplasmiques ont été récoltées dans les surnageants, puis les culots ont été nettoyés avec la solution de lyse par re-suspension. Les culots, les fractions nucléaires, ont été re-suspendus dans le tampon de dénaturation décrit précédemment. Les fractions totales et nucléaire avec le tampon de dénaturation ont été incubées au bain sonicateur *Fisherbrand M Series Mechanical Ultrasonic Cleaning Bath* (ThermoFisher #15337408) avec une fréquence de 40 kHz pendant 3 minutes. Toutes les fractions ont ensuite été dénaturées pendant 5 minutes à 95°C.

2.10 Immunoprécipitation

Pour les essais d'immunoprécipitation, les cellules ont été traitées avec du PRE-084 comme décrit à la section 2.7.3 pendant 10 minutes et 60 minutes. Les cellules ont été récoltées, lysées et les protéines quantifiées comme décrit à la section 2.8 (sans EDTA, sans SDS et avec l'ajout de 10% de glycérol dans la solution de lyse). Des échantillons de quantités égales de protéines ont été préparés pour chaque condition avant d'être incubés avec 0,5 µg de l'anticorps primaire anti-V5 (clone 7/4) (AB_2566387) ciblant la protéine d'intérêt pendant 3 heures à 4°C. Après le temps d'incubation, 30 µL de billes de sépharose conjuguées à la protéine A y ont été ajoutées pour immunoprécipiter la protéine liée à l'anticorps ainsi que toutes protéines interagissant avec cette

protéine visée pour une durée d'une nuit. Les billes ont ensuite été lavées 5 fois avec la solution de lyse sans inhibiteur de protéases et dénaturées pendant 30 minutes à température pièce.

2.11 Immunobuvardage

Toutes les expériences mentionnées précédemment sont passées à l'étape d'immunobuvardage dans le but de détecter l'expression des protéines d'intérêt. Après la dénaturation des protéines, les échantillons ont été déposés sur des gels de polyacrylamide pour l'électrophorèse SDS (SDS-PAGE) 10% ou 12% acrylamide/bisacrylamide (375 mM Tris-Base, 0,1% SDS, 0,05% APS et 0,1% TEMED) et les protéines ont migré pendant 1 heure à 150 V dans un tampon de migration (25 mM Tris-Base, 192 mM glycine et 0,1% SDS). Les protéines ont par la suite été transférées sur membranes de nitrocellulose 0.2 µm pendant 1 heure à 100 V. Les membranes ont ensuite été colorées au rouge de Ponceau S avant d'être scannées, décolorées et puis incubées dans une solution de blocage contenant du TBS-T 0,1% (20 mM Tris-Base pH 8.0, 167 mM NaCl, 0,1% Tween 20) avec 5% de lait écrémé en poudre pendant 30 minutes à température pièce. Les membranes ont alors été incubées avec un des anticorps primaires à des dilutions différentes dans la solution de blocage pendant une nuit à 4°C ou pendant 1 à 3 heures à température pièce. Parmi les anticorps primaires utilisés, il y a anti-SIGMAR1 (clone D4J2E) dilué 1/2000, anti-TDP43 (clone G400) dilué 1/250, anti-p62/SQSTM1 dilué 1/1000, anti-LC3B (D11) dilué 1/1000, anti-GFP (GF28R) dilué 1/1000, anti-V5 (clone 7/4) dilué 1/1000 et anti-Kv1.2 (clone K14/16) dilué 1/1000. Les membranes ont été lavées 3 fois pendant 8 minutes au TBS-T 0,1% avant d'être incubées à nouveau avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) ciblant l'anticorps primaire approprié selon l'hôte de l'anticorps primaire dilué 1/10 000 dans la solution de blocage pendant 45 minutes à température pièce. Parmi les anticorps secondaires utilisés, il y a anti-Mouse-HRP, anti-Rabbit-HRP et anti-Guinea Pig-HRP. Après des lavages au TBS-T 0,1% au TBS (20 mM Tris-Base pH 8.0 et 167 mM NaCl), les protéines des membranes ont été révélées par l'ajout du substrat provenant de la trousse *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (SigmaAldrich #WBKLS0500) grâce à la chimioluminescence et l'acquisition des images a été faite à l'aide d'un appareil Fusion FX7 (Montreal Biotech Inc. Lab Equipment).

2.12 ELISA

Pour les expériences de trafic, les plaques, dans lesquelles ont été ensemencées les cellules, ont été prétraités à la Poly-L-Lysine (PLL) afin d'augmenter l'adhérence des cellules aux puits. Les cellules ont été traitées avec du PRE-084 comme décrit à la section 2.7.3 pendant 10 minutes, 30 minutes et 60 minutes. Après les traitements, les cellules ont été fixées avec une solution de TBS1X avec 3,7% de formaldéhyde avant d'être bloquées pendant 30 minutes à température pièce dans une solution de TBS avec 5% de sérum de chèvre (SigmaAldrich #S26-LITER) sans perméabilisation. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire anti-Kv1.2 reconnaissant une région externe de la protéine dilué 1/3000 dans la solution de blocage pendant 1 heure à température pièce. À la suite de lavages au TBS et d'une période de 10 minutes de blocage, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti-Rabbit-HRP dilué 1/10 000 dans la solution de blocage pendant 1 heure à température pièce. Les cellules ont été lavées à nouveau avec du TBS, puis les anticorps liés ont été détectés par l'ajout d'une solution de TMB (ThermoFisher #002023) pendant 15 à 20 minutes. Les réactions colorimétriques ont été arrêtées par l'ajout de HCl 1N. Les colorations ont été quantifiées par la lecture des densités optiques à 450 nm avec un lecteur de microplaque Gen5.0.

2.13 Densitométrie

Les résultats d'immunobuvardage ont été étudiés quantitativement par l'analyse densitométrique des images obtenues du Fusion FX. Pour ce faire, le logiciel ImageJ (version 2.14.0/1.54f) a été utilisé. L'intensité des bandes observées pour les protéines d'intérêt sur les membranes a été mesurée en excluant le bruit de fond, puis normalisée sur l'intensité des bandes de protéines totales obtenues par la coloration Ponceau S, pour chaque condition. Les valeurs de densité normalisée ont alors été prises pour évaluer l'expression relative des protéines étudiées selon les conditions expérimentales.

2.14 Analyse statistique

Le logiciel GraphPad de Prism (version 10.4.0) a été utilisé pour les analyses statistiques, qui ont été présentées en moyenne $\pm$ erreur standard de la moyenne (SEM). Les différences statistiques ont été déterminées avec les tests appropriés en fonction de l'expérience et des données. Des analyses de test t de Student ou des analyses de variance (ANOVA) à un ou à deux facteurs ont été faits

avec des tests de comparaisons multiples Bonferroni. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée significative et marquée par une étoile (*), $p < 0,01$ était marquée par deux étoiles (**), $p < 0,001$ était marquée par trois étoiles (***), puis $p < 0,0001$ était marquée par trois étoiles (****). Les résultats proviennent plus de trois expériences indépendantes.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Dans le but de déterminer les effets du variant E102Q sur la protéine chaperonne S1R, les recherches de ce mémoire ont eu lieu en quatre phases. Nous avons débuté avec la caractérisation du variant par l'étude de ses états, c'est-à-dire sa localisation et son état d'oligomérisation. Ensuite, quelques-unes des fonctions connues de S1R ont été investiguées tout en comparant au variant E102Q dans l'intérêt de comprendre leurs rôles dans l'hyperexcitabilité caractéristique de la SLA. Ses capacités de transport nucléocytoplasmique ont été testées avec l'aide d'une protéine impliquée dans la SLA, TDP43, qui nécessite des déplacements entre ces compartiments subcellulaires. Puisque la dérégulation du métabolisme des ARN par TDP43 peut mener à des conséquences sur l'homéostasie protéique, les processus autophagiques ont été testés. Le rôle de S1R dans l'autophagie a par la suite été examiné en expérimentant sur l'effet de E102Q sur les niveaux de marqueurs autophagiques. Étant donné les altérations possibles des niveaux de canaux potassiques causées par les défauts de ces dernières fonctions, le trafic d'un canal reconnu pour son activité dans l'excitabilité neuronale, Kv1.2, a finalement été étudié. Son niveau d'expression à la surface membranaire en présence de S1R ou de son variant E102Q a été mesuré. L'utilisation de différentes lignées cellulaires et différents modes d'expression nous ont permis de valider les résultats ou plutôt de cibler les facteurs causant les différences entre elles. Nous avons les lignées SH-SY5Y qui expriment de façon stable les protéines d'intérêt, puis nous avons la lignée HEK293T qui exprime de manière transitoire les mêmes protéines.

3.1 Le variant E102Q augmente l'accumulation de dimères insolubles de S1R.

Afin de voir les effets du variant sur la localisation et l'état d'oligomérisation de S1R, nous avons effectué des essais de fractionnement séparant les protéines solubles des protéines insolubles au Triton-X-100. Ces essais ont d'abord été réalisés à l'aide de cellules SH-SY5Y pour représenter un modèle semblable aux neurones. La protéine S1R est exprimée de façon stable avec une étiquette V5 et différentes lignées cellulaires monoclonales ont été testés comptant pour plusieurs réplicas. Nous observons d'abord que la protéine endogène monomère est présente seulement dans les fractions solubles. De plus, nous avons observé que la protéine étiquetée du variant E102Q-V5 ne semble pas du tout présente dans la fraction soluble, mais qu'elle est majoritairement détectée

dans la fraction insoluble. C'est le contraire pour la protéine sauvage S1R-V5. Les formes identifiées dans les fractions insolubles sont principalement les monomères (~25-30 kDa) et les dimères (~50-60 kDa) (**Figure 3.1 A**). L'analyse par immunobuvardage montre un ratio d'expression protéique de S1R insoluble sur soluble plus élevé chez le variant E102Q que chez la protéine sauvage (**Figure 3.1 A-B**). Nous avons reproduit l'expérience avec la lignée cellulaire HEK293T afin d'évaluer si l'effet observé est conservé entre différentes lignées cellulaires et différentes méthodes d'expression. Cette fois-ci, la transfection transitoire de S1R-V5 et E102Q-V5 a été effectuée. De plus, un contrôle positif d'agrégats insolubles a été ajouté avec un stress protéotoxique induit par l'époxomicine qui sert d'inhibiteur de protéasomes. Il permet également de localiser S1R ou son variant selon leurs rôles dans la réponse au stress. Cette fois-ci, la protéine étiquetée du variant E102Q-V5 est bien présente dans la fraction soluble, bien qu'elle semble tout de même moins bien exprimée que la protéine WT S1R-V5. Les fractions solubles et insolubles présentent des formes monomères et dimères de la protéine. Cependant, la fraction insoluble semble montrer une forme avec un poids moléculaire au-dessus du poids des dimères (~75 kDa), ce qui suppose des trimères ou des dimères présentant potentiellement des modifications post-traductionnelles (**Figure 3.1 C**). La même conclusion en est tirée pour l'analyse du ratio d'expression protéique de S1R insoluble sur S1R soluble, le ratio étant plus élevé pour le variant que pour S1R-WT pour les cellules HEK293T en condition normale et en condition de stress (**Figure 3.1 C-D**). Le variant E102Q favorise donc l'accumulation d'agrégats protéiques insolubles de S1R.

Par la suite, nous avons effectué des essais de fractionnement séparant cette fois-ci les composants cytoplasmiques des composants nucléaires sur les mêmes lignées de cellules. Ces essais ont été faits dans le but de connaître les effets du variant E102Q sur la localisation subcellulaire de S1R. Les résultats avec le marqueur nucléaire Lamin A/C montrent que le fractionnement sépare bien les protéines nucléaires des protéines cytoplasmiques par la présence de bandes seulement dans les fractions totales et nucléaires (**Figure 3.2 A-D-E**). L'analyse par immunobuvardage montre une tendance à la hausse du niveau d'expression nucléaire du variant E102Q comparativement à la protéine de type sauvage, exprimés par les cellules SH-SY5Y (**Figure 3.2 A-B**). Les résultats obtenus chez les cellules HEK293T présentent également cette même tendance pour la condition véhicule et la différence est significative pour la condition de stress avec l'époxomicine. Nous

observons en plus que l'expression des protéines (WT et E102Q) semble supérieure en condition de stress, significativement pour E102Q, ce qui est attendu considérant que la présence d'époxomicine limite la dégradation (**Figure 3.2 D-E-F**).

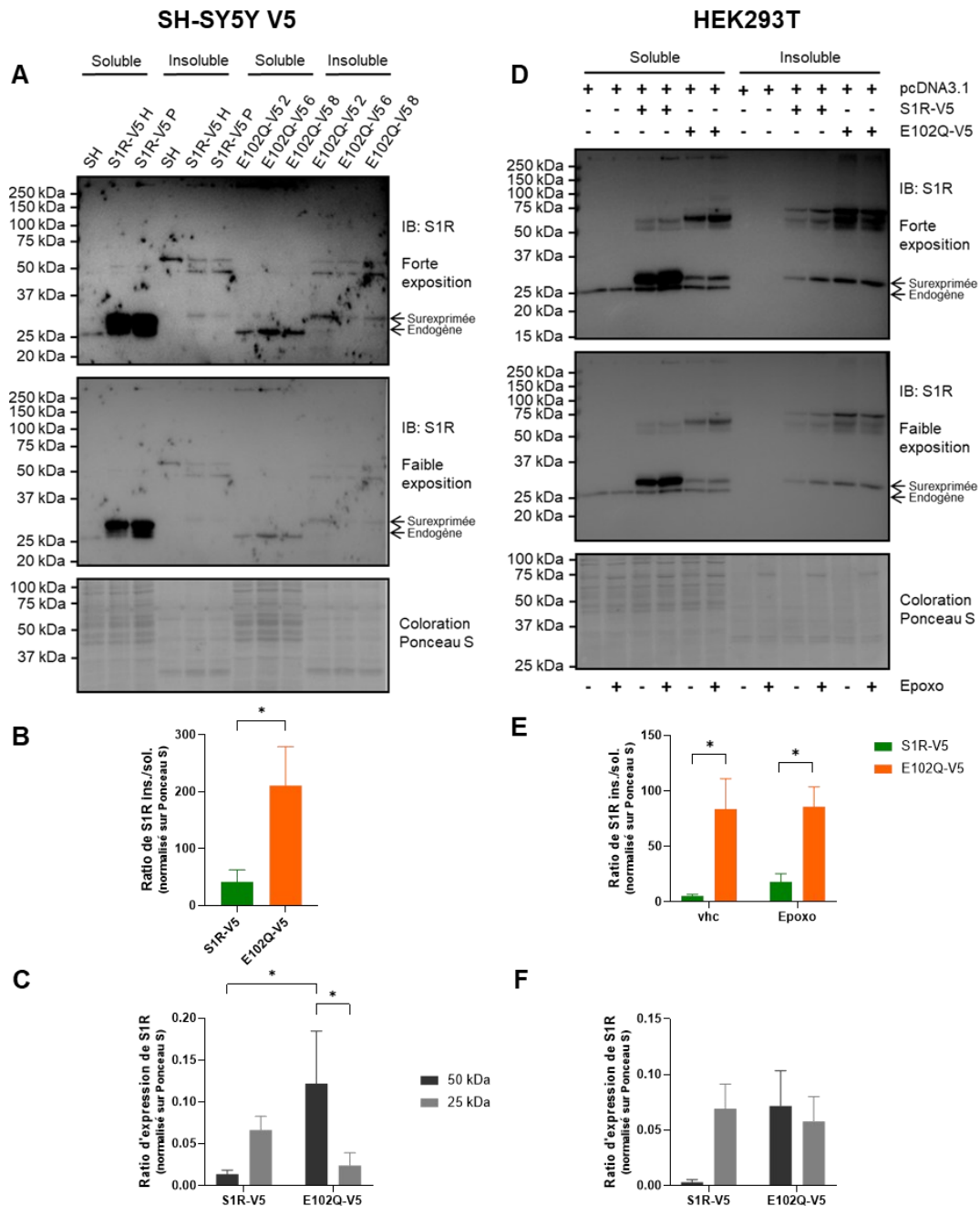


Figure 3.1 : Le variant E102Q est davantage présent sous forme insoluble et dimérique que la protéine sauvage. (A) Image représentative des expressions protéiques des fractions solubles et insolubles au Triton-X-100 obtenues des lignées SH-SY5Y monoclonales exprimant de façon stable soit la protéine S1R-V5 (clones H et P) ou son variant E102Q-V5 (clones 6 et 8) par immunobuvardage. Les niveaux d'expression

de la protéine endogène S1R ont également été vérifiés en utilisant la lignée cellulaire mère, SH-SY5Y (SH) (Annexe A). (B) La quantification des protéines a d'abord été ajustée sur la coloration Ponceau S correspondante. Le ratio d'expression de S1R insoluble sur S1R soluble a été quantifié en comparant les résultats entre S1R-V5 et E102Q-V5. (C) Les expressions de S1R monomérique (~25-30 kDa) et dimérique (~50-60 kDa) ont été quantifiées et comparées entre S1R-V5 et E102Q-V5. (D) Image représentative des expressions protéiques des fractions de la lignée cellulaire HEK293T. Les protéines S1R-V5 ou E102Q-V5 ont été transfectées avec pcDNA3.1 comme vecteur de contrôle. Les cellules des conditions Epoxo ont été traitées avec 1 μ M d'époxomicine pendant 16 heures à 37°C (Annexe A). (E) Le ratio d'expression de S1R insoluble sur S1R soluble a été quantifié en comparant les résultats entre S1R-V5 et E102Q-V5. (F) Les expressions de S1R monomérique (~25-30 kDa) et dimérique (~50-60 kDa) ont été quantifiées et comparées entre S1R-V5 et E102Q-V5. Les résultats sont les moyennes $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes. Une analyse statistique de test t et des ANOVA à deux facteurs ont été faites avec un test de comparaisons multiples Bonferroni. * $p=0,05$. IB: immunomarquage.

Dans ces essais de fractionnement, la somme des niveaux d'expression de S1R de chaque fraction sans traitement à haut poids moléculaire (~50-60 kDa) ou à faible poids moléculaire (~25-30 kDa) a été calculée afin d'observer les différences d'oligomérisation entre S1R et son variant. Puisque le poids moléculaire attendu de S1R avec l'étiquette V5 est de 25-30 kDa, les bandes observées représentent les formes dimériques et monomériques de la protéine. Chez les cellules SH-SY5Y, le niveau d'expression de S1R à l'état dimérique est prédominant chez les cellules exprimant le variant comparativement aux cellules exprimant la protéine sauvage pour le fractionnement au Triton-X-100 et cytoplasmique/nucléaire. Nous en ressortons aussi que le variant a un niveau plus élevé de S1R sous forme dimérique que sous forme monomérique (**Figure 3.1 A-C, 3.2 A-C**). Chez les cellules HEK293T, la même tendance est observée pour le fractionnement au Triton-X-100, mais avec moins de différence entre les deux états d'oligomérisation pour E102Q (**Figure 3.1 C-F**). Le niveau de protéine monomérique est significativement supérieur au niveau de protéine dimérique pour le fractionnement cytoplasmique/nucléaire des cellules HEK293T. Les niveaux d'expression des formes dimériques sont très faibles, proches de 0 (**Figure 3.2 D-E-G**). Les différentes méthodes de lyse cellulaire et de dénaturation peuvent jouer dans la différence de résultats. Il est aussi observé visuellement que les dimères semblent davantage dans les fractions insolubles et cytoplasmiques que dans les fractions solubles et nucléaires. Il y a alors une dimérisation importante de la protéine S1R en présence du variant E102Q qui a l'air de former des agrégats insolubles au niveau du cytoplasme.

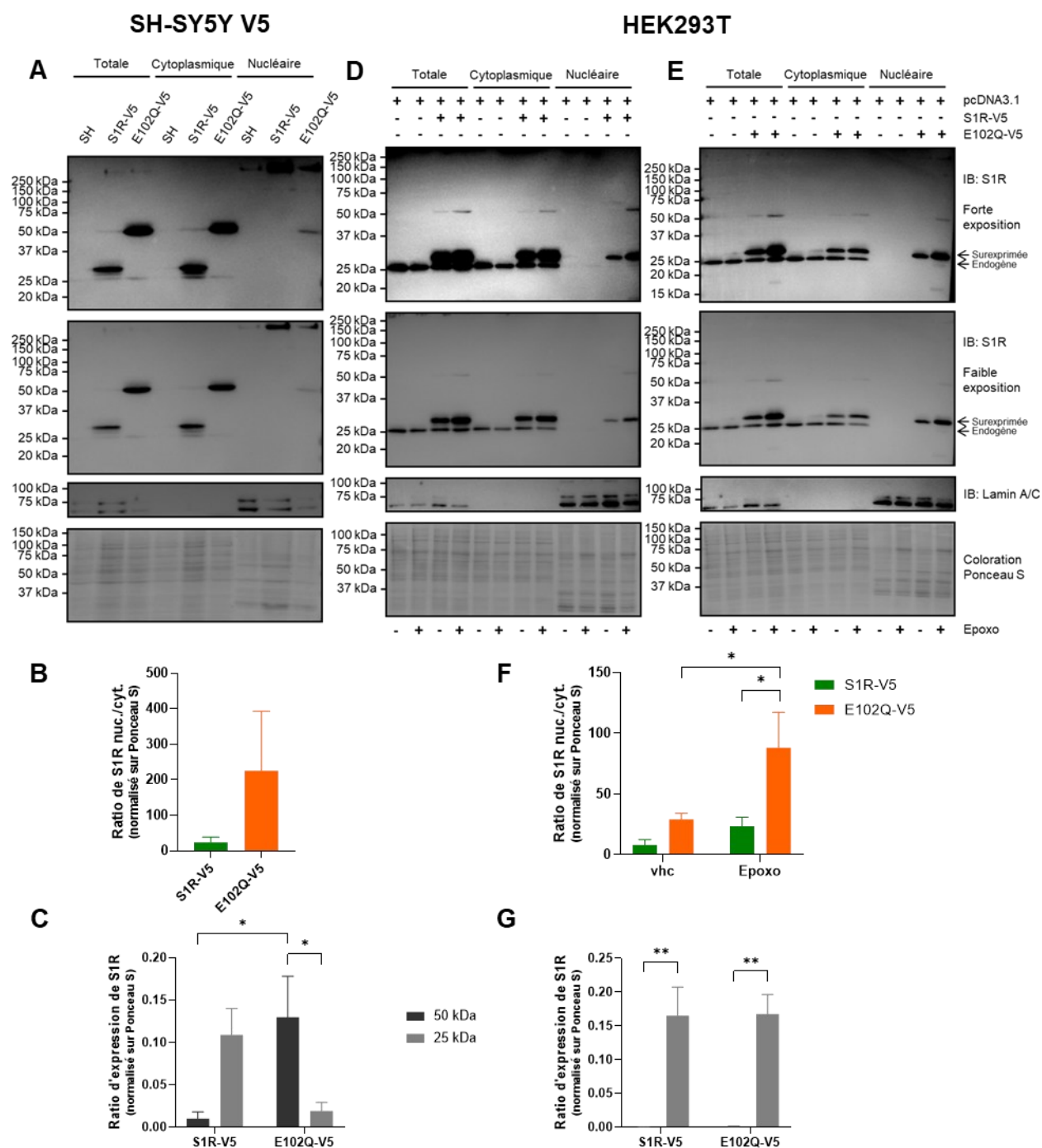


Figure 3.2 : Le variant E102Q est davantage présent au niveau nucléaire ainsi qu'à l'état dimérique que la protéine sauvage. (A) Image représentative des expressions protéiques des fractions totales, cytoplasmiques et nucléaires obtenues des lignées SH-SY5Y exprimant de façon stable soit la protéine S1R-V5 ou son variant E102Q-V5 par immunobuvardage. Les niveaux d'expression de la protéine endogène S1R ont également été vérifiés en utilisant la lignée cellulaire mère, SH-SY5Y (SH). La Lamin A/C sert de contrôle positif comme protéine nucléaire (Annexe A). (B) La quantification des protéines a d'abord été ajustée sur la coloration Ponceau S correspondante. Le ratio d'expression de S1R nucléaire sur S1R cytoplasmique a été quantifié en comparant les résultats entre S1R-V5 et E102Q-V5. (C) Les expressions de S1R monomérique (~25-30 kDa) et dimérique (~50-60 kDa) ont été quantifiées et comparées entre S1R-V5 et E102Q-V5. (D) Image représentative des expressions protéiques des de la lignée cellulaire HEK293T.

La protéine S1R-V5 a été transfectée avec pcDNA3.1 comme vecteur de contrôle. Les cellules des conditions Epoxo ont été traitées avec 1 μ M d'époxomicine pendant 16 heures à 37°C (Annexe A). (E) Image représentative des expressions protéiques des fractions de la lignée cellulaire HEK293T par immunobuvardage. La protéine E102Q-V5 a été transfectée avec pcDNA3.1 comme vecteur de contrôle. (F) Le ratio d'expression de S1R nucléaire sur S1R cytoplasmique a été quantifié en comparant les résultats entre S1R-V5 et E102Q-V5. (G) Les expressions de S1R monomérique (~25-30 kDa) et dimérique (~50-60 kDa) ont été quantifiées et comparées entre S1R-V5 et E102Q-V5. Les résultats sont les moyennes $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes. Une analyse statistique de test t et des ANOVA à deux facteurs ont été faites avec des tests de comparaisons multiples Bonferroni. * $p=0,05$, ** $p=0,01$. IB: immunomarquage.

3.2 Le variant cause l'accumulation de la protéine de liaison à l'ARN, TDP43, au niveau nucléaire.

Ayant déterminé que le variant provoque l'agrégation de S1R, en plus de favoriser sa dimérisation et sa localisation au niveau nucléaire, nous nous sommes intéressés à vérifier les conséquences fonctionnelles sur son activité biologique. En essayant de comprendre ce qui engendre l'hyperexcitabilité dans la SLA, nous avons ciblé des fonctions de S1R qui peuvent prendre part dans la régulation des canaux responsables de l'excitabilité. Puisque des rôles dans le transport nucléocytoplasmique ont été mentionnés pour S1R, nous avons vérifié la localisation de la protéine de liaison à l'ARN, TDP43, en présence de S1R ou de son variant (Lee *et al.*, 2020; Miki et al., 2014; Miki et al., 2015). Des études précédentes ont montré que l'accumulation de cette protéine est associée à la SLA (Lagier-Tourenne *et al.*, 2010). Les rôles de TDP43 dans le métabolisme des ARN peuvent avoir un impact dans le nombre de canaux potassiques.

En utilisant les mêmes échantillons des essais de fractionnement cytoplasmique et nucléaire, nous avons cette fois-ci détecté les niveaux de TDP43. Les résultats d'immunobuvardage ne montrent pas de différence significative des ratios de TDP43 nucléaire sur cytoplasmique entre S1R-V5 et E102Q-V5 pour les manipulations réalisées avec les cellules SH-SY5Y. Bien que TDP43 semble davantage exprimé en présence de S1R-V5, les ratios nucléaire sur cytoplasmique restent proches entre S1R-V5 et E102Q. Nous observons que TDP43 est majoritairement présente dans les fractions nucléaires, puisque les ratios sont supérieurs à 100%, ce qui est attendu pour une protéine nucléaire (**Figure 3.3 A-B**). Du côté des cellules HEK293T, il semble y avoir une augmentation de l'expression nucléaire de TDP43 lorsqu'en condition de stress avec l'époxomicine. Les expériences avec E102Q témoignent d'une tendance à la hausse de l'expression de TDP43 au niveau nucléaire comparativement à la protéine sauvage, tendance qui semble plus marquée en condition de stress à l'époxomicine (**Figure 3.3 C-D-E**). Ces résultats suggèrent que la protéine

TDP43 transloque au niveau nucléaire en condition de stress. De plus, TDP43 semble davantage retenue dans le noyau lorsque le variant E102Q est présent. Les rôles de TDP43 dans la régulation des ARN peuvent alors être perturbés. Cela nous amène à étudier l'homéostasie protéique en recherchant les effets du variant sur l'autophagie.

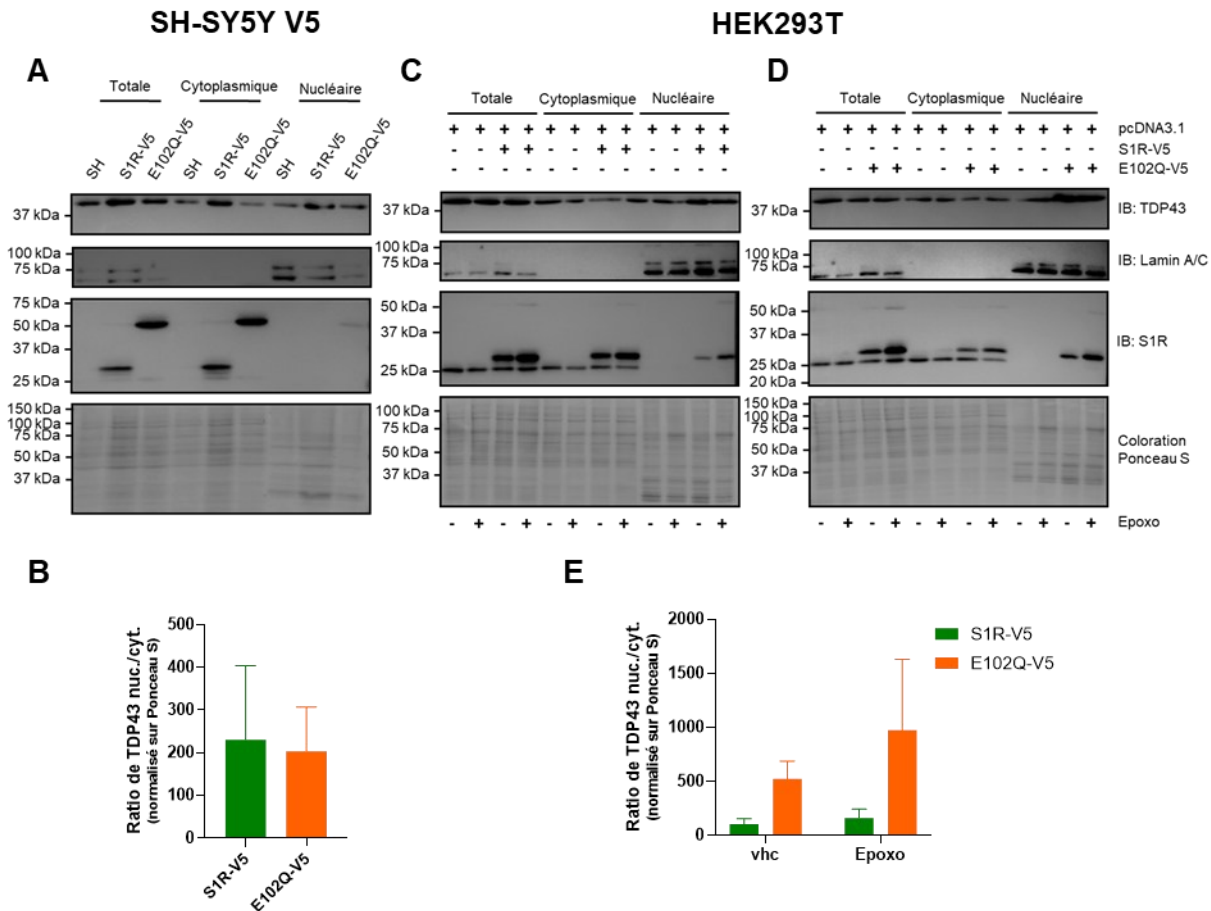


Figure 3.3 : Le variant E102Q semble causer l'accumulation nucléaire de TDP43 à la suite d'un stress protéotoxique. (A) Image représentative des expressions protéiques des fractions totales, cytoplasmiques et nucléaires obtenues des lignées SH-SY5Y exprimant de façon stable soit la protéine S1R-V5 ou son variant E102Q-V5 par immunobuvardage. La lignée cellulaire mère, SH-SY5Y (SH) sert de contrôle. La Lamin A/C sert de contrôle positif comme protéine nucléaire (Annexe A). (B) La quantification des protéines a d'abord été ajustée sur la coloration Ponceau S correspondante. Le ratio d'expression de TDP43 nucléaire sur TDP43 cytoplasmique a été quantifié en comparant les résultats entre S1R-V5 et E102Q-V5. (C) Image représentative des expressions protéiques des de la lignée cellulaire HEK293T. La protéine S1R-V5 a été transfectée avec pcDNA3.1 comme vecteur de contrôle. Les cellules des conditions Epoxo ont été traitées avec 1 μ M d'époxomicine pendant 16 heures à 37°C (Annexe A). (D) Image représentative des expressions protéiques des de la lignée cellulaire HEK293T. La protéine E102Q-V5 a été transfectée avec pcDNA3.1 comme vecteur de contrôle. (E) Le ratio d'expression de TDP43 nucléaire sur TDP43 cytoplasmique a été quantifié en comparant les résultats entre S1R-V5 et E102Q-V5. Les résultats sont les

moyennes $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes. Une analyse statistique de test t et des ANOVA à un et à deux facteurs ont été faites avec des tests de comparaisons multiples Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. IB: immunomarquage.

3.3 Les niveaux d'expression des marqueurs autophagiques p62 et LC3B-I sont perturbés par le variant E102Q.

Puisque le variant bouleverse la localisation de TDP43, une protéine responsable dans la maintenance des ARN, nous nous sommes intéressés à ses effets sur le recyclage protéique. Une autre des fonctions de S1R qui semblent être touchées par le variant E102Q est dans l'autophagie (Prause *et al.*, 2013; Vollrath *et al.*, 2014). Nous avons effectué les expériences sur les cellules SH-SY5Y en premier, avec la protéine S1R ou E102Q exprimée de manière stable avec l'étiquette YFP. Avant tout, différents milieux de carence ont été testés afin d'activer l'autophagie et d'identifier les conditions optimales d'induction de ce mécanisme en évaluant les niveaux d'expression de nos marqueurs autophagiques (p62 et LC3B-I). La détection de p62 et de LC3B-I permet d'avoir une idée sur l'évolution du processus autophagique. En analysant les différents extraits protéiques obtenus, nous remarquons d'abord que le milieu sans acides aminés ou celui sans glucose manifestent une augmentation des niveaux d'expression de p62, suggérant une augmentation du recrutement de protéines ubiquitinées pour dégradation. Dans cette même expérience, il est dévoilé que l'expression de p62 est significativement réduite en présence du variant E102Q (**Figure 3.4 A-B**). D'un autre côté, l'expression de LC3B-I est plutôt augmentée en présence de E102Q (**Figure 3.4 A-C**). Lors d'une carence en acides aminés, le variant diminue l'expression de p62 et augmente celle de LC3B-I.

Les résultats dans les cellules SH-SY5Y stables YFP ont suscité la recherche sur la même lignée cellulaire exprimant plutôt l'étiquette V5 ainsi que sur la lignée HEK293T pour voir si les mêmes conclusions en ressortent. Pour ce faire, seul le milieu sans acides aminés a été sélectionné pour effectuer les essais et la protéine LC3B a été transfectée dans toutes les expériences de la figure 3.5 pour assurer une meilleure détection de la forme LC3B-II (avec ancre lipidique). L'ajout d'un inhibiteur de lysosomes, bafilomycine A1, nous a permis une meilleure visualisation de l'accumulation des produits normalement dégradés par l'autophagie, comme la forme LC3B-II. Cela nous permet de visualiser la présence d'autophagosomes dans les extraits.

qu'avec S1R dans la lignée HEK293T (**Figure 3.5 D-F**). Le déséquilibre des marqueurs autophagiques qui est engendré par le variant nous mène à questionner comment il peut compromettre l'excitabilité neuronale.

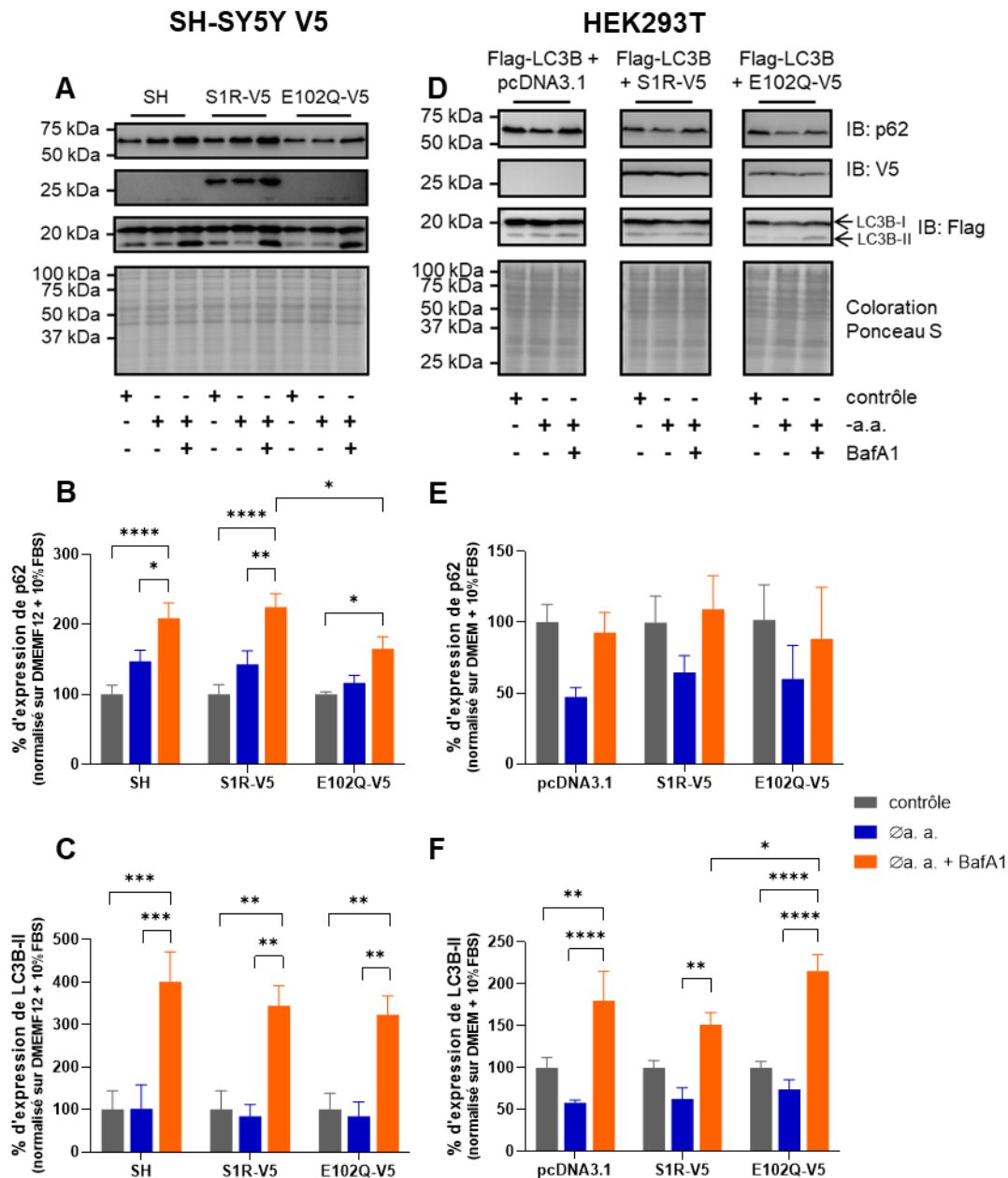


Figure 3.5 : L'expression de LC3B-II est plus élevée avec le variant E102Q qu'avec la protéine sauvage chez les cellules HEK293T lorsque les lysosomes sont inhibés. (A) Image représentative des expressions protéiques obtenues des lignées SH-SY5Y exprimant de façon stable soit la protéine S1R-V5 ou son variant E102Q-V5 par immunobuvardage. La lignée cellulaire mère, SH-SY5Y (SH) sert de contrôle. Les cellules des conditions BafA1 ont été traitées avec 100 nM de bafilomycine A1 pendant six heures à 37°C (Annexe A). (B) La quantification des protéines a d'abord été ajustée sur la coloration Ponceau S correspondante. Les résultats de chaque condition ont été normalisés sur la condition contrôle. Les niveaux

de la protéine endogène p62 ont été quantifiés et comparés entre S1R-V5 et E102Q-V5. (C) Les niveaux de la protéine transfectée LC3B-II ont été quantifiés et comparés entre S1R-V5 et E102Q-V5. (D) Image représentative des expressions protéiques de la lignée cellulaire HEK293T. Les protéines S1R-V5 ou E102Q-V5 ont été transfectées avec pcDNA3.1 comme vecteur de contrôle. (E) Les niveaux de la protéine endogène p62 ont été quantifiés et comparés entre S1R-V5 et E102Q-V5. (F) Les niveaux de la protéine transfectée LC3B-II ont été quantifiés et comparés entre S1R-V5 et E102Q-V5. Les résultats sont les moyennes $\pm$ SEM d'au moins quatre expériences indépendantes. Des analyses statistiques ANOVA à deux facteurs a été faite avec des tests de comparaisons multiples Bonferroni. * $p=0,05$, ** $p=0,01$, *** $p=0,001$. IB: immunomarquage.

3.4 La présence de S1R avec un agoniste augmente davantage l'expression de surface de Kv1.2 que son variant.

Avec les résultats montrant que le variant altère des fonctions concernant la production, le déplacement, la stabilisation et le recyclage de protéines, nous nous sommes concentrés sur son influence sur l'activité neuronale. Un autre rôle proposé de S1R, le trafic intracellulaire, a été testé pour évaluer l'effet du variant E102Q. Nous avons effectué des expériences avec Kv1.2, puisqu'il a été identifié comme un des canaux potassiques dont le niveau d'expression est faible dans les motoneurones de patients de la SLA (Stringer et Weiss, 2023). De plus, il est reconnu que S1R interagit avec le canal et influence son envoi à la surface cellulaire (Delint-Ramirez et *al.*, 2020; Kourrich et *al.*, 2013). L'analyse de l'expression de surface de Kv1.2 a été faite par ELISA en présence de S1R ou du variant. L'influence d'un agoniste de S1R, la PRE-084, a aussi été testé avec des temps d'exposition différents. Les essais ont été effectués sur les cellules SH-SY5Y stables V5 ainsi que sur les cellules HEK293T.

Pour les cellules SH-SY5Y, il est observé que la présence de S1R a comme résultat de diminuer significativement l'expression de surface de Kv1.2 à l'état basal par rapport à la lignée contrôle SH-SY5Y et la tendance est semblable par rapport à la lignée exprimant E102Q-V5 (**Figure 3.6 A**). Lorsque traitées à la PRE-084, l'expression de surface de Kv1.2 augmente à partir de 30 minutes seulement pour les lignées contrôle SH-SY5Y et stable S1R-V5 tandis que le variant semble inhiber cet effet (**Figure 3.6 B**). À 60 minutes de stimulation, seule la lignée exprimant S1R maintient un niveau d'expression à la surface de Kv1.2 plus élevée que les autres lignées (**Figure 3.6 B-C**). Dans le cas des cellules HEK293T, l'expression basale de Kv1.2 à la surface membranaire est significativement moindre en présence de S1R-V5 ou de E102Q-V5 (**Figure 3.6 D**). Nous remarquons une différence évidente de l'expression de surface de Kv1.2 en présence de S1R lorsque les cellules sont traitées avec l'agoniste PRE-084. En présence de E102Q, une

augmentation de plus faible envergure est notée. Pour l'ensemble des conditions avec les cellules HEK293T, il semble que l'agoniste a comme effet d'augmenter l'expression de surface de Kv1.2 dans les 10 premières minutes avant de la diminuer légèrement pour les cellules exprimant S1R et de retourner sous le niveau basal pour les cellules exprimant le vecteur vide ou le variant E102Q (**Figure 3.6 E**). À 60 minutes, le niveau d'expression à la surface de Kv1.2 est plus élevé en présence de S1R que les autres conditions (**Figure 3.6 E-F**). La présence de S1R a donc comme effet de diminuer l'expression de surface de Kv1.2 de manière basale. L'action de S1R d'augmenter Kv1.2 à la membrane se fait suite à son activation par son agoniste PRE-084 à différents temps pour les deux types cellulaires. Dans chacune des lignées, le variant E102Q ne semblent pas répondre à l'agoniste.

Avec l'information que S1R et E102Q modulent la présence à la surface membranaire de Kv1.2, l'interaction entre Kv1.2 et S1R ou E102Q a été étudiée, en présence ou non de l'agoniste PRE-084. Par conséquent, nous avons fait des essais d'immunoprécipitation sur les cellules HEK293T. Les protéines FLAG-Kv1.2, S1R-V5 et E102Q-V5 ont été transfectées afin de pouvoir immunoprécipiter l'étiquette V5, excluant toutes protéines endogènes.

Les résultats sous-tendent une interaction à la hausse entre Kv1.2 et E102Q à l'état basal ou en présence de l'agoniste. De plus, l'activation de S1R-WT par son agoniste PRE-084 semble diminuer les interactions entre S1R et le canal suivant les 10 premières minutes d'exposition avant de les rétablir après 60 minutes, alors que l'effet inverse est observé avec E102Q (**Figure 3.7 A-B**). Dans les résultats d'immunobuvardage, autre que les bandes représentant les monomères et les dimères, nous remarquons également que la transfection de S1R-V5 présente des bandes de S1R à un poids moléculaire plus élevé, soit vers 100-150 kDa. Nous avons constaté que ce n'est pas le cas pour la transfection de E102Q-V5, les bandes les plus élevées se trouvant autour de 75 kDa, suggérant une différence dans la capacité d'oligomérisation de la protéine. De plus, les niveaux d'expression totaux de Kv1.2 semblent beaucoup plus faibles en présence du variant E102Q qu'en présence de S1R-WT (**Figure 3.7 A**). Le canal Kv1.2 semble favoriser les interactions avec E102Q plutôt qu'avec S1R et la PRE-084 a l'air d'agir différemment avec S1R et son variant.

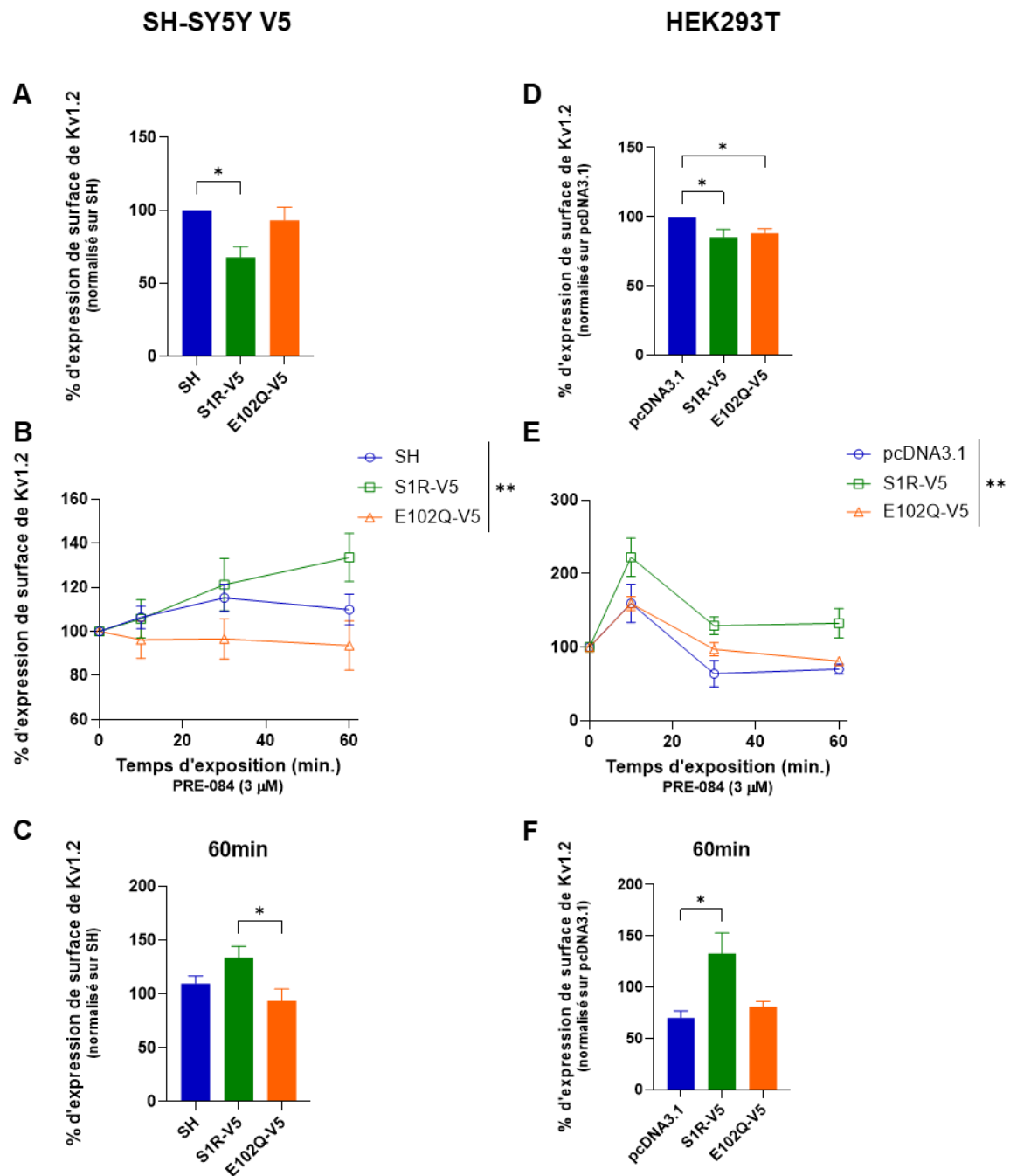


Figure 3.6 : L'expression de surface du canal potassique Kv1.2 augmente en présence de S1R et de son agoniste chez les cellules HEK293T. (A) La protéine Kv1.2 a été transfectée dans les lignées SH-SY5Y exprimant de façon stable soit la protéine S1R-V5 ou son variant E102Q-V5. La lignée cellulaire mère, SH-SY5Y (SH) sert de contrôle. L'expression de surface de Kv1.2 a été analysée par ELISA et son niveau d'expression a été quantifié en comparant S1R-V5 et E102Q-V5. (B) Les cellules des conditions PRE-084 ont été traitées avec 3 μ M de PRE-084 pendant le temps indiqué à 37°C. L'expression de surface de Kv1.2 à chaque temps de traitement a été analysée et quantifié en comparant S1R-V5 et E102Q-V5. (C) La protéine Kv1.2 a été transfectée dans la lignée HEK293T. Les protéines S1R-V5 et E102Q-V5 ont été transfectées avec pcDNA3.1 comme vecteur de contrôle. L'expression de surface de Kv1.2 a été analysée

par ELISA et son niveau d'expression a été quantifié en comparant S1R-V5 et E102Q-V5. (D) L'expression de surface de Kv1.2 à chaque temps de traitement a été analysée et quantifiée en comparant S1R-V5 et E102Q-V5. Les résultats sont les moyennes $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes. Des analyses statistiques ANOVA à un et à deux facteurs ont été faites avec des tests de comparaisons multiples Bonferroni. * $p=0,05$, *** $p=0,001$.

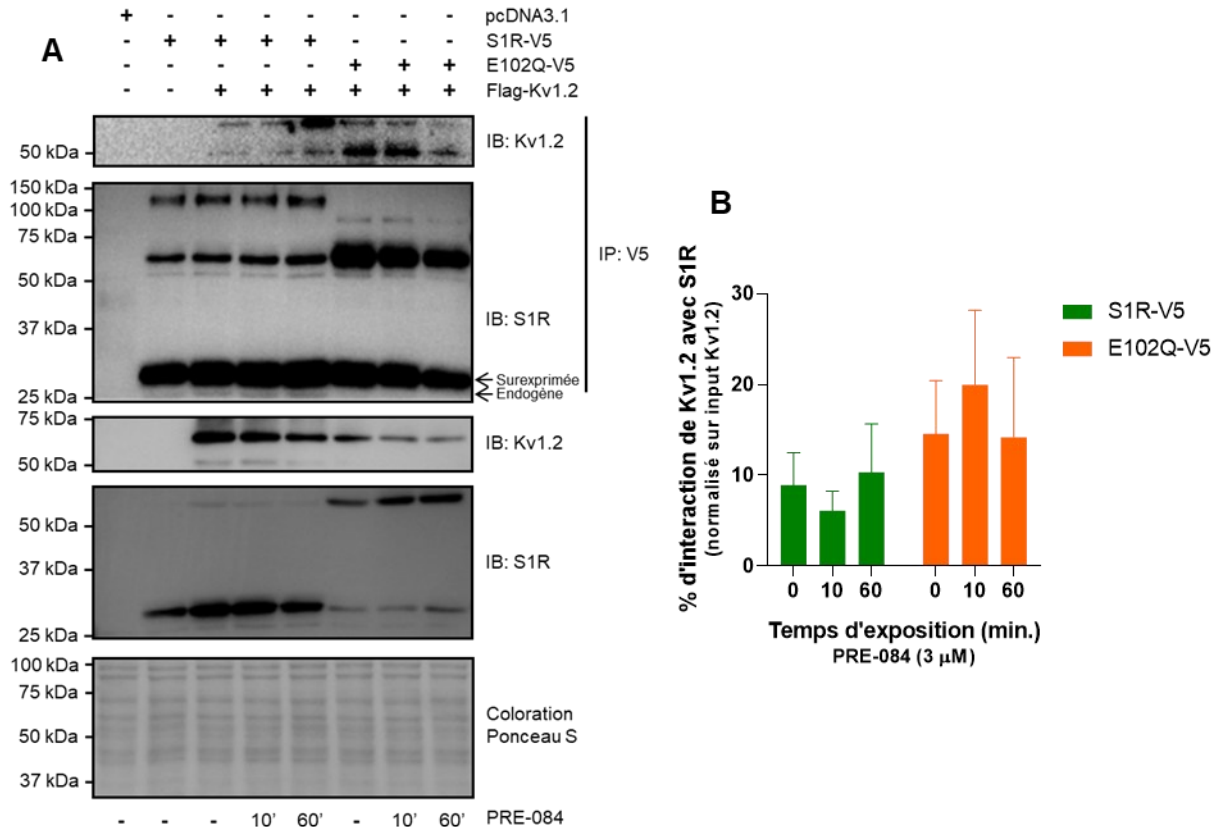


Figure 3.7 : Kv1.2 semble interagir davantage avec le variant E102Q qu'avec la protéine sauvage S1R. (A) Image représentative des expressions protéiques obtenues des lignées SH-SY5Y exprimant de façon stable soit la protéine S1R-V5 ou son variant E102Q-V5 par immunobuvardage. La lignée cellulaire mère, SH-SY5Y (SH) sert de contrôle. L'immunoprécipitation de S1R-V5 ou de E102Q-V5 transfectés dans les cellules HEK293T a d'abord été effectuée avec un anticorps ciblant l'étiquette V5. La protéine Kv1.2 transfectée et co-immunoprécipitée avec l'étiquette V5 a été extraite et analysée. Les cellules des conditions PRE-084 ont été traitées avec 3 μ M de PRE-084 pendant le temps indiqué à 37°C (Annexe A). (B) La quantification des protéines a d'abord été ajustée sur la coloration Ponceau S correspondante. Les niveaux d'interaction de la protéine Kv1.2 avec S1R-V5 ou E102Q ont été quantifiés et comparés. Les résultats sont les moyennes $\pm$ SEM d'au moins cinq expériences indépendantes. Des analyses statistiques ANOVA à deux facteurs ont été faites avec des tests de comparaisons multiples Bonferroni. IB: immunomarquage, IP: immunoprécipitation.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Comme il a été mentionné que le variant E102Q est responsable de plusieurs dysfonctions dans la SLA, le but principal de ce projet était de comprendre les effets du variant sur les rôles biologiques de S1R. Nous cherchons également à interpréter comment ces effets peuvent concourir à la pathologie de la SLA, spécifiquement l'hyperexcitabilité neuronale. Dans cette recherche, toutes les expériences ont été effectuées en comparant S1R avec son variant E102Q. Les caractéristiques de cette protéine chaperonne ont été examinées en étudiant sa forme, son état d'oligomérisation et sa localisation subcellulaire. Il en a été ressorti que le variant cause un changement dans la forme de S1R en augmentant la proportion de protéine insoluble. Il est aussi responsable d'une hausse de son état dimérique et de sa localisation nucléaire. Nous observons aussi globalement des expressions diminuées du variant par rapport à la protéine, suggérant une stabilité moindre et une dégradation accrue du variant. Pour voir comment ces irrégularités affectent les rôles de S1R, nous avons poursuivi nos recherches en ciblant les processus biologiques y étant associés.

En premier temps, le rôle de S1R dans la fonction de transport nucléocytoplasmique a été étudié. Nous avons suivi l'expression de la protéine de liaison à l'ARN, TDP43, au niveau cytoplasmique et nucléaire. TDP43 est une protéine associée à la SLA qui est un composant majoritaire des agrégats de protéines ubiquitinées retrouvés chez les patients (Lagier-Tourenne *et al.*, 2010). Elle est aussi responsable de normaliser le métabolisme des ARN, pouvant ainsi jouer dans la production de canaux importants dans l'excitabilité neuronale. Les résultats montrent une tendance à l'accumulation nucléaire de TDP43 en présence du variant, troublant les fonctions de TDP43 et suggérant un rôle de S1R dans ses déplacements.

Par la suite, les défauts dans les ARN engendrés par la délocalisation de TDP43 ont mené à des expériences sur les fonctions autophagiques. Nous avons testé l'induction du processus en comparant différentes carences en nutriment. Les résultats montrent que les voies induites par la carence en acides aminés ou en glucose sont les plus favorables pour induire ce processus dans nos lignées de cellules SH-SY5Y. L'expression de marqueurs protéiques connus de l'autophagie, p62, LC3B-I et LC3B-II, a été évalué en comparant la protéine S1R sauvage au variant E102Q. La

baisse d'expression de p62 et l'accumulation de LC3B-II en présence du variant témoignent d'une influence partiellement négative de S1R sur l'activité de ce mécanisme de dégradation. Nous en ressortons alors que les niveaux protéiques sont corrompus par les problèmes dans les processus de recyclage.

Finalement, nous nous sommes questionnés sur les impacts de ces dysfonctions sur l'efficacité d'une des protéines régulant l'excitabilité neuronale. Puisque de faibles niveaux de Kv1.2 ont été retrouvés en lien avec la SLA et que S1R a été identifiée comme une sous-unité auxiliaire des Kv, les conséquences de leur association ont été vérifiées (Kourrich, 2017; Kourrich *et al.*, 2013; Stringer et Weiss, 2023). Nous avons d'abord étudié l'expression de Kv1.2 à la surface membranaire, où il est capable de moduler l'excitabilité. De façon basale, où une baisse d'expression de Kv1.2 a été observée en présence de S1R. De plus, des essais avec un agoniste de S1R, la PRE-084, à plusieurs temps d'exposition ont montré que l'activation de S1R avec l'agoniste augmente l'expression à la surface de Kv1.2 comparativement à E102Q. Cela renforce les études précédentes démontrant que S1R aide au transport de Kv1.2 à la membrane plasmique et suggère que cette action est perturbée par le variant. Des expériences d'interaction ont ensuite été conduites dans le but de vérifier l'interaction du variant avec Kv1.2. Il semble que le variant E102Q interagisse davantage avec Kv1.2 que la protéine sauvage, malgré la diminution d'expression flagrante du canal, et propose que cette interaction empêche le trafic de Kv1.2 à la membrane en présence d'agoniste.

4.1 Effets du variant E102Q sur la solubilité et la localisation de S1R

Nos essais de fractionnement séparant les protéines solubles des protéines insolubles au Triton-X-100 nous ont permis d'en apprendre sur les effets du variant E102Q sur la solubilité de S1R. Plusieurs facteurs dictent de la solubilité d'une protéine. Les propriétés intrinsèques de la protéine telles que sa séquence d'acides aminés, sa structure tridimensionnelle et ses interactions intramoléculaires jouent un rôle dans sa solubilité. La forme soluble au Triton-X-100 de la protéine S1R endogène indique une structure bien repliée et donc favorable à son activité fonctionnelle (Ptak-Kaczor *et al.*, 2021; Vihinen, 2020). Pour les cellules de neuroblastomes humains SH-SY5Y stables, nous remarquons que la protéine étiquetée V5 monomère est fortement exprimée dans la fraction soluble et peu présente dans la fraction insoluble pour S1R, alors que c'est le contraire

pour E102Q. Les résultats de la protéine sauvage étiquetée V5 concordent avec les résultats de la protéine endogène. Nous interprétons l'insolubilité du variant comme une forme agrégée. La formation d'agrégats peut être due, entre autres, à la formation de fibrilles et de particules amorphes (Vihinen, 2020). Des changements de conformation irréversibles créent des liaisons moléculaires qui font également partie des raisons de l'agrégation insoluble des protéines. En plus de cela, l'irréversibilité de ces changements empêche la protéine de retourner dans un état soluble (Chiti et Dobson, 2017). Nous estimons alors que le variant E102Q forme des agrégats insolubles causés par les changements structurels dus à la mutation. En plus des liaisons intramoléculaires présentant la protéine sous forme monomérique, des liaisons peuvent créer des agrégats de hauts poids moléculaires insolubles au Triton-X-100 (Chiti et Dobson, 2017). L'oligomérisation des protéines est une des autres causes de leur insolubilité et agrégation (Vihinen, 2020). La présence de dimères dans les fractions insolubles est donc en cohérence avec la littérature et il semble que la protéine endogène cause davantage des agrégats oligomériques que monomériques. L'analyse quantitative des monomères et des dimères montre un ratio des protéines insolubles sur protéines solubles significativement plus élevé pour E102Q que pour S1R. Bien que l'agrégation se produit pour la protéine sauvage et le variant, elle est plus marquante pour E102Q.

L'étude des cellules de reins embryonnaires HEK293T nous a permis de comparer les expériences et de soit les valider, soit cibler les facteurs responsables de leurs différences. Puisque la littérature montre des résultats provenant de divers modèles, l'étude de deux lignées et deux méthodes d'expression nous permet de mieux se situer par rapport aux autres articles. Pour les cellules HEK293T, les formes dimériques sont présentes dans les fractions solubles en plus des fractions insolubles. La présence des dimères et de la protéine étiquetée du variant E102Q-V5 dans la fraction soluble diffèrent des résultats obtenus avec les lignées stables SH-SY5Y. Ces différences peuvent être due au fait que les protéines S1R-V5 et E102Q-V5 sont transfectées de manière transitoire dans les cellules HEK293T. Leur expression stable chez les cellules SH-SY5Y permet d'étudier les protéines d'intérêt de manière consistante, imitant artificiellement un modèle plus proche d'un modèle physiologique de SLA. Cependant, la transfection dans les cellules HEK293T promeut leur expression rapide et contrôlée pendant une période transitoire. L'analyse quantitative du ratio de protéines insoluble sur protéines solubles concorde avec celle effectuée avec les lignées stables. Puisque l'époxomicine inhibe la dégradation protéasomique, il était

attendu que les niveaux d'expression des protéines insolubles soient plus élevés. De plus, la tendance est remarquée particulièrement pour la protéine sauvage. Cette dernière est reconnue pour son rôle dans la réponse au stress ainsi que dans la UPR (Mori *et al.*, 2013; Rosen *et al.*, 2019). Il est possible que S1R soit exprimée davantage pour jouer ces rôles, mais que cette action favorise également son agrégation. L'observation de protéines autour du poids moléculaire de 75 kDa dans les fractions insolubles de S1R-V5 et de E102Q-V5 suggère d'autres formes de la protéine que les monomères et les dimères. Nous suggérons la possibilité que ce sont des trimères, mais aussi que ce sont des dimères possédant des modifications post-traductionnelles. Les protéines agrégées, par leur mauvais repliement et/ou leur fonction réduite, sont généralement dirigées vers des voies de dégradation (Sherman et Goldberg, 2001). Les agrégats sont habituellement ubiquitinés et peuvent devenir toxiques (Goswami *et al.*, 2006; Jana *et al.*, 2000; Jana *et al.*, 2001; Ross et Poirier, 2005). L'ajout d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine, d'un poids moléculaire d'environ 8,5 kDa, concorde avec les bandes observées dans les fractions insolubles (Xu et Jaffrey, 2013). Il est commun de retrouver des accumulations de protéines mal repliées dans les maladies neurodégénératives, incluant la SLA. Ces agrégations sont souvent associées à des protéines mutées et ubiquitinées ou polyubiquitinées, pouvant empêcher leur bon repliement ou leur liaison à des cofacteurs stabilisants. L'ensemble de nos résultats corrèle avec les phénotypes moléculaires retrouvés dans d'autres contextes neurodégénératifs et nous permet de conclure que le variant E102Q cause l'agrégation de dimères protéiques insolubles et potentiellement ubiquitinés (Ross et Poirier, 2004). Les effets du variant sur son oligomérisation et sa solubilité nous mène à étudier sa localisation subcellulaire.

Nos expériences de fractionnement séparant les protéines localisées au niveau nucléaire des protéines localisées dans le cytoplasme nous ont ensuite permis d'identifier les changements de localisation subcellulaire de S1R et de son variant. Pour les cellules SH-SY5Y, le ratio de protéines nucléaires sur cytoplasmiques montre une tendance à la hausse pour le variant E102Q comparativement à la protéine sauvage S1R. Malgré une grande variabilité l'augmentation de ce ratio est évidente et reproductible. Les expériences faites sur les cellules HEK293T montrent des résultats qui correspondent à ceux observés dans les cellules SH-SY5Y stables pour le ratio de protéines nucléaires sur protéines cytoplasmiques. Le ratio pour E102Q-V5 en condition de stress est supérieur au ratio en condition basale et indique que le stress induit par le traitement à

l'époxomicine promeut l'accumulation de la protéine au niveau nucléaire due à l'inhibition des protéasomes. Il est connu que S1R peut avoir plusieurs localisations subcellulaires différentes selon son activité. Une présence dans l'enveloppe nucléaire a été mentionnée (Dussossoy *et al.*, 1999). Il avait été démontré dans le passé que le variant cause une distribution subcellulaire anormale. Une localisation davantage aux fractions de basse densité que celles de haute densité d'un gradient de sucrose a été trouvée pour le variant, contraire à la protéine WT (Al-Saif *et al.*, 2011). Une étude relativement récente a déterminé que les compartiments nucléaires possèdent une plus faible densité de masse que les compartiments cytoplasmiques (Kim et Guck, 2020). Ces résultats sont donc en accord avec la littérature.

La formation de complexes représentant des dimères a aussi été trouvée pour le variant E102Q dans le passé, où l'expression des dimères était aussi plus élevée que l'expression de monomères (Al-Saif *et al.*, 2011). Il a été proposé que l'oligomérisation de S1R est favorable à la liaison de ligands spécifiques et vice-versa (Gromek *et al.*, 2014). Il a été suggéré que la forme dimérique avantage les associations aux agonistes et que la liaison d'antagonistes fait plutôt augmenter le degré d'oligomérisation (Chu et Ruoho, 2016). Nous croyons alors possible que le variant E102Q crée des liaisons avec des agonistes, qui font en sorte que la protéine reste sous forme dimérique de manière stable. Un des rôles suggérés de S1R est sa contribution à la dégradation d'inclusions nucléaires. Il est proposé qu'elle sert de navette entre le noyau et le cytoplasme (Miki *et al.*, 2014; Miki *et al.*, 2015). Les résultats générés proposent donc que le variant provoque la rétention nucléaire de S1R sous forme dimérique et que cette agglomération fait potentiellement obstacle aux multiples fonctions biologiques de S1R (Su *et al.*, 2016). Dans les deux types de fractionnement, nous avons pu observer visuellement que le variant semble moins bien exprimé que la protéine sauvage, supposant une moins bonne stabilité et une dégradation plus accélérée. Nous estimons alors que les effets du variant sur l'état d'oligomérisation, la solubilité, la localisation et la stabilité de la protéine peuvent entraîner des conséquences sur sa fonctionnalité. Plus profondément, nous croyons qu'ils peuvent affecter l'excitabilité neuronale par les différents rôles de S1R autour de la régulation de protéines qui peuvent inclure Kv1.2.

4.2 Impact du variant sur le transport nucléocytoplasmique de TDP43

À la suite des résultats montrant que le variant perturbe l'état d'oligomérisation, la solubilité et la localisation de S1R, nous avons vérifié si l'expression du variant affecte la localisation de TDP43. Cette dernière est une protéine de liaison à l'ARN qui est associée à la SLA. En effet, la distribution anormale de cette protéine, soit des inclusions cytoplasmiques ou bien intranucléaires, fait partie de la pathologie de la maladie (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006). Nos essais de fractionnement subcellulaire nous ont permis de déterminer où TDP43 se situe lorsqu'en présence de S1R-WT ou de son variant. D'abord, les résultats avec les cellules SH-SY5Y stables V5 ne montrent pas de différence significative entre les ratios de TDP43 nucléaires sur cytoplasmiques de S1R-V5 et de E102Q-V5 en condition basale. Cependant, les résultats avec les cellules HEK293T montrent une tendance à la hausse des ratios de E102Q-V5 par rapport à S1R-V5, pour les conditions véhicule et époxomicine. Toutefois, la variabilité générale ne permet pas de montrer de résultat significatif. Bien que ce sont les accumulations cytoplasmiques qui sont plus souvent associées à la SLA, ces résultats sont en accord avec des études précédentes qui montrent que TDP43 contribue aux inclusions intracellulaires (Arai *et al.*, 2006; Lagier-Tourenne *et al.*, 2010). TDP43 est une protéine physiologiquement localisée au niveau nucléaire et qui se déplace entre le cytoplasme et le noyau pour exercer ses fonctions. En plus de ses rôles dans la stabilisation, le transport et la traduction des ARN messagers (ARNm), elle participe à la réponse au stress dans le cytoplasme (Birsa *et al.*, 2020). Elle s'accumule dans les granules de stress au cytoplasme avant de retourner au noyau lorsqu'elles sont désassemblées (Tziortzouda *et al.*, 2021). Nos résultats montrent que TDP43 reste au noyau et ne transloque pas au cytoplasme en présence du variant E102Q, même lorsqu'un stress protéotoxique est induit par l'époxomicine. Ce stress protéotoxique semble condenser TDP43 dans le noyau lorsqu'en présence de E102Q (Huang *et al.*, 2024; Jung *et al.*, 2023; Lang *et al.*, 2024). Nous supposons qu'il est possible que le variant ne puisse combler le rôle de transport nucléocytoplasmique joué normalement par S1R et qu'il affecte ainsi la localisation cytoplasmique de TDP43. Bien que TDP43 soit impliquée principalement dans le métabolisme des ARN dans le noyau, il a été découvert que son accumulation excessive au niveau nucléaire résulte en des défauts dans les ARN. En effet, des exons qui sont normalement incorporés dans les ARNm sont omis lors de l'épissage (Carmen-Orozco *et al.*, 2024). Cela peut nuire à la production de protéines essentielles ou contribuer à la formation de protéines dysfonctionnelles. La rétention de TDP43 au noyau nuit en plus à ses rôles cytoplasmiques, comme la régulation de

protéines impliquées dans les processus autophagiques et de la localisation et la traduction d'ARNm au niveau des synapses (Birsa *et al.*, 2020). Il a également été rapporté que la surexpression de TDP43 réduit la densité des neurites des neurones moteurs primaires, conséquence qui est accentuée lorsque la protéine est mutée (Wang *et al.*, 2013). Ces dernières fonctions affectées pourraient être liées aux perturbations autophagiques et à l'hyperexcitabilité neuronale qui sont associées avec la SLA.

4.3 Fonctions autophagiques perturbées par E102Q

Puisque nous avons trouvé que le variant affecte des protéines autophagiques par la fonction de transport nucléocytoplasmique de S1R, nous avons étudié les fonctions autophagiques de S1R. Nos expériences d'immunobuvardage sur les marqueurs d'activité autophagique, p62, LC3B-I et LC3B-II, nous ont permis d'avoir une idée sur les conséquences du variant sur le flux autophagique. En premier temps, les différents milieux de culture ont dévoilé que les carences en acides aminés ou en glucose comme étant les meilleurs inducteurs d'autophagie, par l'augmentation des niveaux de p62. La carence en sérum induit l'autophagie en empruntant la voie de la kinase *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR). La présence de facteurs de croissance dans le sérum mène à une cascade de signalisation qui active mTOR (He et Klionsky, 2009; He *et al.*, 2018). La voie mTOR est responsable d'inhiber le détachement des ribosomes du RE, un événement nécessaire au début du mécanisme d'autophagie (Kim et Klionsky, 2000). La carence en sérum induit donc l'autophagie en inhibant la voie mTOR par l'activation de protéines en amont par la voie protéine kinase B (AKT) qui implique les complexes de sclérose tubéreuse (TSC) 1 et 2 (He et Klionsky, 2009; He *et al.*, 2018). La carence en acides aminés inhibe aussi l'activité de mTOR et augmente la traduction de LC3B en induisant l'autophagie, mais plus directement (Cutler *et al.*, 1999; Guertin et Sabatini, 2005; Jewell *et al.*, 2013; Kelekar, 2005). mTOR détecte la présence d'acides aminés, promeut le métabolisme et régule négativement l'autophagie (Dennis *et al.*, 1999). La carence en glucose induit l'autophagie en activant la voie de la kinase AMPK (Kelekar, 2005). La carence en glucose résulte en un déséquilibre indiquant un stress énergétique et une augmentation du ratio d'AMP/ATP qui est détecté par AMPK et active la kinase (Hardie, 2011). Une fois activée, AMPK inhibe mTOR tout comme la carence en acides aminés (Russell *et al.*, 2014). Il était donc attendu que les carences en acides aminés ou en glucose soient de bons inducteurs d'activité autophagique par l'augmentation des marqueurs autophagiques, p62 et LC3B-I. L'absence d'augmentation

d'expression de LC3B-I peut être indicateur d'une étape plus avancée dans l'autophagie, soit là où LC3B-I est transformé en LC3B-II. D'un autre côté, les résultats pour la lignée HEK293T semblent indiquer le contraire pour les niveaux de p62 avec la carence en acides aminés. Il est possible que les niveaux basaux de protéines dans ces types de cellules ne soient pas équivalents et qu'elles réagissent différemment aux milieux d'induction autophagique. Nous avons comme hypothèse que les niveaux de S1R dans les cellules SH-SY5Y et dans les cellules HEK293T ne sont pas égaux, résultant en des effets opposés. Selon des expériences faites sur des tissus, il semble que S1R est davantage présente dans les tissus cérébraux que dans les tissus rénaux (Hanner *et al.*, 1996). Nous estimons qu'il pourrait y avoir une possibilité que son expression soit inférieure dans les cellules d'origine embryonnaire rénale (HEK293T) que dans les cellules dérivées d'une biopsie de neuroblastome (SH-SY5Y). Pour les cellules SH-SY5Y, l'absence d'une augmentation des marqueurs autophagiques en carence au sérum peut être due également au temps d'induction. Il a été trouvé avec des expériences sur quatre lignées cellulaires mammifères différentes qu'un milieu sans sérum ni acides aminés induit rapidement le processus autophagique, soit dès 2 heures d'incubation. Il a été déterminé que le processus atteint un plateau et qu'il voit même une diminution du flux autophagique dès 6 heures d'incubation (Hasan *et al.*, 2025). Le temps d'induction de 6 heures que nous avons effectué peut avoir joué sur l'effet des carences sur le flux autophagique. Nous pensons qu'il est possible que l'induction par les carences en sérum avec ou sans acides aminés ait atteint un plateau et que les niveaux des marqueurs soient retournés à la normale. Un autre temps d'incubation aurait donc pu donner des résultats différents. Certains articles suggèrent que la dégradation de p62 est plutôt indicatrice d'autophagie, puisque p62 interagit avec les protéines ubiquitinées et qu'elle est dégradée lors de l'activité autophagique (Bjorkoy *et al.*, 2009). Cependant, il a été déterminé que p62, lorsqu'elle se lie aux protéines ubiquitinées, subit une séparation de phase. Ce sont alors plutôt les gouttelettes formées de p62 qui sont dégradés avec les protéines par le système autophagique (Huang *et al.*, 2025). Nous supposons qu'il est possible que l'induction de l'autophagie recrute davantage la protéine p62 pour effectuer son rôle et que ce sont les formes altérées qui sont dégradées une fois liées aux substrats autophagiques. Les niveaux et la dégradation de p62, de LC3B-I et de LC3B-II dans le temps sont tous à prendre en considération lors de l'interprétation de l'activité autophagique. L'autophagie est un processus complexe qui se produit en plusieurs étapes distinctes, les niveaux protéiques capturés peuvent alors avoir eu lieu à différentes phases du processus. Nous pensons que nos résultats

témoignent d'une initiation d'autophagie augmentée, expliquant la hausse de p62 et les niveaux inchangés de LC3B-I et LC3B-II.

Nous remarquons qu'à la suite d'une carence en acide aminé et en glucose, les niveaux d'expression de p62 en présence de E102Q sont significativement inférieurs à ceux retrouvés en présence de S1R. Le contraire est aperçu pour les niveaux de LC3B-I. La liaison de la bafilomycine aux pompes de protons responsables que l'acidification nécessaire à l'activité des lysosomes permet d'observer les accumulations lorsque la dégradation est inhibée. Les résultats montrent une légère baisse de l'accumulation de p62 en présence du variant. Cette baisse suggère que p62 est moins dégradé lors de l'autophagie en présence du variant, indiquant un problème dans le chargement des autophagosomes par le faible niveau de p62. Cette observation est faite avec les cellules HEK293T, malgré les résultats davantage variables. Avec les cellules HEK293T, l'accumulation de LC3B-II est supérieure en présence de E102Q que pour les mêmes cellules en présence de la protéine sauvage. Une étude a montré sur des cellules COS-7 que les niveaux de p62 sont réduits lors du traitement des cellules avec un inhibiteur de mTOR (Torin-1) et qu'ils sont rétablis lors de l'inhibition des lysosomes (bafilomycine A1) (Knupp *et al.*, 2024). Elle en conclue que l'activité autophagique est induite. L'étude montre ensuite que la dégradation de p62 est empêchée par le variant E102Q et elle en déduit que l'autophagie est perturbée par l'absence de S1R. Il en a aussi été ressorti que le variant de S1R réduit l'expression de LC3B-I et de LC3B-II. Les chercheurs concluent dans cet article que S1R interagit avec la séquence 3' UTR de l'ARNm de LC3B. Elle peut permettre la localisation des ARNm au niveau du RE, où la traduction de LC3B est favorisée pour l'élongation et la maturation des autophagosomes. L'étude montre aussi la diminution des niveaux de LC3B-II lors d'un KD de S1R, avec ou sans induction autophagique ou inhibition lysosomale (Knupp *et al.*, 2024). L'accumulation de p62 lors d'une déficience en S1R a été observée auparavant avec des cellules A431, MCF-7, NSC-34 et NIH-3T3 (Dreser *et al.*, 2017; Vollrath *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2019). D'autres mutations de S1R montrent plutôt la baisse de p62 dans des cellules SH-SY5Y (Kong *et al.*, 2024). Des études contradictoires ont été trouvées pour les niveaux de LC3B-II. Un article a déterminé que le KD de S1R avait comme résultat d'augmenter l'expression de LC3B-II. Une différence est que cette dernière a travaillé avec des cellules exprimant la protéine LC3B de manière stable avec une étiquette (GFP-LC3) (Vollrath *et al.*, 2014). Il est possible que cette construction ne contienne pas la séquence 3' UTR de la protéine

endogène nécessaire pour l'action de S1R (Knupp *et al.*, 2024). Un autre article montre pourtant l'accumulation de LC3B-II endogène lorsqu'en présence du variant E102Q, avec ou sans induction de l'autophagie (Dreser *et al.*, 2017). L'accumulation de LC3B-II lors d'une déficience en S1R semble commun à plusieurs articles (Dreser *et al.*, 2017; Vollrath *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2019). Des tests effectués sur les niveaux de LC3B-II ont également démontré leur augmentation dans des tissus de patients de la SLA (Prause *et al.*, 2013). Les résultats semblent varier d'une étude à l'autre pour les niveaux de p62, de LC3B-I et de LC3B-II, mais elles montrent tous que la déficience de S1R affecte les niveaux des protéines autophagiques. Nous supposons que le métabolisme des lignées cellulaires réagit différemment aux processus autophagiques. Nos résultats de p62 concordent avec les études portées sur les mêmes cellules. Dans notre situation, nous pensons que la protéine p62 est davantage présente parce qu'il y a une accumulation de protéines à identifier pour la dégradation due au stress induit par les carences. L'étude de Knupp a obtenu ces résultats en utilisant des constructions avec des étiquettes HA en N-terminal, alors que nous utilisons des étiquettes V5 en C-terminal (Knupp *et al.*, 2024). Il a été démontré qu'une étiquette positionnée en N-terminal peut affecter l'orientation de la protéine par rapport à la membrane (Sharma *et al.*, 2021). Nous estimons qu'il est alors aussi probable qu'elle affecte ses fonctions. Cependant, l'étude a aussi démontré ces résultats avec la protéine endogène en la déplétant avec des ARN interférant. Ces résultats ont été obtenus en induisant l'autophagie avec l'inhibition directe pharmacologique de mTOR par la Torin-1 pour une durée de 4 heures (Knupp *et al.*, 2024). Nos expériences utilisent une carence pendant 6 heures qui agit plus lentement sur la voie mTOR en activant la cascade de signalisation. Il est possible que la protéine p62 soit d'abord accumulée avant d'être dégradée lorsque l'autophagie est induite et que c'est ce que nous observons avec nos résultats. La même conclusion est tout de même portée, puisque le variant E102Q a l'effet contraire sur p62, soit l'inhibition de l'accumulation de p62. Il a été déterminé que p62, bien que généralement considérée cytosolique, fait la navette entre les compartiments cytosoliques et nucléaires. L'inhibition de l'exportation nucléaire résulte en l'accumulation de protéines ubiquitinées dans le noyau, accélérant le trafic de p62 vers le noyau (Pankiv *et al.*, 2010). L'autophagie est un processus qui a lieu au cytoplasme, alors que la réponse aux ADN abimés a lieu au niveau nucléaire. Cependant, il a été rapporté que les ADN endommagés du noyau peuvent être transportés au cytoplasme et dégradés par l'autophagie (Ivanov *et al.*, 2013; Rello-Varona *et al.*, 2012). Comme nous avons observé l'accumulation du variant et de TDP43 au niveau nucléaire, nous suggérons qu'un des

rôles de S1R dans l'autophagie est le transport nucléocytoplasmique qui est inhibé par E102Q. L'accumulation de p62 au noyau peut mener à la diminution de son expression au cytosol, résultant en une baisse du niveau d'expression de la protéine soluble. La diminution du niveau de p62 lors de l'utilisation de bafilomycine en présence du variant indique que son rôle dans l'autophagie semble perturbé. Nous croyons alors que le chargement des autophagosomes par p62 est diminué. Nous pensons qu'une proportion du surplus de p62 qui pouvait résulter de l'inhibition de l'activité lysosomale par la bafilomycine est acheminé au noyau pour répondre aux ADN et qu'il y reste séquestré. Bien que le variant ne puisse pas promouvoir la traduction de LC3B, nous estimons que les protéines traduites s'accumulent dû à des défauts dans les étapes suivantes de l'autophagie, empêchant leur dégradation. Nous observons par l'accumulation de LC3B-II en présence du variant que LC3B-I à l'air de pouvoir se transformer en LC3B-II, mais l'accumulation de LC3B-I nous indique que la conversion est peut-être ralentie. Les résultats montrant que LC3B-II est aussi bien accumulée après l'ajout de bafilomycine en présence du variant qu'en présence de la protéine sauvage nous suggère une vitesse de dégradation semblable. Nous pensons donc que les défauts dans le rôle de transport nucléocytoplasmique de S1R peuvent être responsables de certaines perturbations autophagiques, telle la baisse d'expression de p62 cytosolique pouvant nuire au chargement des autophagosomes. De plus, l'accumulation de LC3B-I due au variant peut mener à des agrégats toxiques. Ceux-ci peuvent également entraîner d'autres protéines dysfonctionnelles ou instables produites par les anomalies causées par la délocalisation de TDP43.

4.4 Rôle du variant dans l'action de S1R sur l'expression du canal Kv1.2 à la surface cellulaire

Les défauts du variant dans la régulation des ARNm et de l'autophagie nous ont aidés à chercher comment ils affectent les protéines impliquées dans l'excitabilité neuronale. Étant donné que nous connaissons que la SLA cause une hyperexcitabilité et une baisse d'expression du canal Kv1.2, nous avons évalué les fonctions de S1R sur le trafic intracellulaire en analysant l'expression de surface de Kv1.2 (Mavlyutov *et al.*, 2015; Stringer et Weiss, 2023). Avec les cellules SH-SY5Y stables V5, les résultats montrent que l'expression membranaire basale de Kv1.2 est diminuée en présence de S1R-V5. Puisque S1R est une protéine chaperonne généralement localisée au niveau du RE, il est attendu qu'elle ne favorise pas le transport du canal à la surface cellulaire à l'état basal. Nous estimons que son association avec Kv1.2 provoque une rétention du canal avant de promouvoir sa translocation à la membrane plasmique lorsqu'en présence d'agoniste, expliquant

le niveau diminué de Kv1.2 à la surface en présence de S1R-V5. Le niveau inchangé de Kv1.2 à la surface en présence de E102Q par rapport au contrôle SH semble indiquer que le variant ne joue pas ce rôle. Le traitement des cellules à la PRE-084 a comme effet de faire augmenter l'expression de surface de Kv1.2, sauf pour le variant E102Q. Il a été démontré dans le passé que la localisation de Kv1.2 à la membrane plasmique augmente en présence de S1R suivant son activation par la cocaïne *in vivo* (Delint-Ramirez *et al.*, 2020; Kourrich, 2013). Il a aussi été déterminé que le variant E102Q module les canaux Kv1.2 *in vitro*, mais pas de la même façon que S1R (Abraham *et al.*, 2019). Il n'est alors pas surprenant que les niveaux d'expression de Kv1.2 à la surface ne semblent pas varier en présence du variant. Les résultats à 60 minutes d'activation à la PRE-084 montrent plus clairement que Kv1.2 est davantage exprimé à la surface de la membrane lorsqu'en présence de S1R. Les résultats pour les cellules HEK293T sont semblables, avec une diminution de l'expression de surface de Kv1.2 en présence de S1R-V5 ou en présence de E102Q-V5. Il est possible que la transfection transitoire de S1R-V5 ou de E102Q ait induit un stress qui a eu pour effet de diminuer les niveaux de Kv1.2 totalement aux conditions basales. L'effet de l'agoniste montre toujours une hausse d'expression de Kv1.2 en présence de S1R. La même conclusion est ressortie en comparant les données à 60 minutes de traitement à la PRE-084. Les résultats de la lignée contrôle SH sont plus proches des résultats de S1R-V5 pour les lignées SH-SY5Y et ceux de la condition contrôle pcDNA3.1 sont plus proche des résultats de la condition E102Q pour la lignée HEK293T. Comme l'hypothèse que nous avons émise précédemment, nous croyons que les différences entre les niveaux d'expression de la protéine endogène entre les types cellulaires peuvent expliquer ces variations. Les résultats avec les cellules SH-SY5Y montrent une augmentation à partir de 30 minutes, alors que ceux avec les cellules HEK293T montrent cette augmentation plus tôt, à 10 minutes avant d'être atténuée. Cela nous indique que les modèles cellulaires réagissent différemment en présence d'un agoniste et que le temps d'exposition peut changer ses effets. En somme, l'agoniste ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de surface de Kv1.2 en présence du variant E102Q. Il a été déterminé auparavant que les ligands stabilisent les oligomères de S1R (Gromek *et al.*, 2014). De plus, les agonistes favorisent les formes monomériques et dimériques (Chu et Ruoho, 2016; Mishra *et al.*, 2015). Puisque nos résultats ont montré que le variant E102Q est davantage présent sous forme de dimères, nous suggérons que l'agoniste s'associe aux protéines dimériques et les conserve en dimères. Nous supposons donc que les dimères de E102Q forment des complexes avec l'agoniste, mais que son état dimérique

persistante l'empêche d'induire une réponse à l'agoniste et d'avoir un effet sur l'expression membranaire de Kv1.2.

Nous avons ensuite exécuté des essais d'immunoprécipitation dans le but de définir l'effet du variant sur les interactions entre Kv1.2 et S1R ou E102Q. Nous observons d'abord que le variant E102Q semble avoir comme effet de diminuer les niveaux d'expression de Kv1.2. Puisque S1R est une protéine chaperonne, nous croyons qu'elle joue un rôle dans la stabilité et la maturation d'autres protéines (Crottes *et al.*, 2011). Nous supposons qu'elle stabilise alors Kv1.2 et que cette action ne peut être exercée par le variant. Les résultats montrent que Kv1.2 interagit avec S1R ainsi qu'avec son variant E102Q. Il a été démontré par le passé que le canal co-immunoprécipite avec la protéine S1R de façon basale, ce qui concorde avec nos résultats (Kourrich *et al.*, 2013). Une autre étude confirme leur association à l'état basal par la méthode FRET (Abraham *et al.*, 2019). Nos résultats semblent aussi indiquer une hausse d'interaction entre Kv1.2 et E102Q. Ces résultats vont à l'encontre de ce qui a déjà été démontré. L'étude d'Abraham montre par la méthode FRET que l'interaction entre Kv1.2 et E102Q est moindre qu'avec S1R. La différence peut être due à la technique, les recherches présentées dans l'article d'Abraham utilisent la transfection des protéines d'intérêt avec des étiquettes fluorescentes qui ont un poids moléculaire plus important que V5 (Abraham *et al.*, 2019). La méthode FRET permet d'identifier lorsque les protéines d'intérêt sont à une proximité entre 1 à 10 nm (Jares-Erijman et Jovin, 2003). Selon une étude sur le volume moléculaire de S1R, il a été déterminé que la protéine, avec une étiquette FLAG, a un volume d'environ 56 nm³ (Balasuriya *et al.*, 2014). Comme nous observons que le variant est exprimé davantage sous forme de dimères agrégés, nous supposons que son oligomérisation et son aggrégation peuvent éloigner les protéines fluorescentes et empêcher le transfert d'énergie nécessaire à la méthode. Nous pensons donc la méthode FRET ne peut identifier les interactions avec les formes oligomériques et/ou agrégats protéiques formés par E102Q. Nos résultats comprennent toutes les formes des protéines et permettent d'identifier toutes les associations aux protéines immunoprécipitées, incluant celles formées de complexes. Nous estimons alors que Kv1.2 est davantage assemblé au variant par l'intermédiaire de complexes protéiques ou sous forme d'agrégats insolubles.

Les niveaux d'expression de Kv1.2 qui a co-immunoprécipité avec S1R-V5 montrent une baisse après 10 minutes d'exposition à la PRE-084 avant le rétablissement à 60 minutes, le contraire est

observé avec E102Q. La littérature montre qu'un agoniste, la cocaïne, augmente l'interaction entre Kv1.2 et S1R avec une concentration de 3 μ M après 60 minutes et plus d'exposition (Delint-Ramirez *et al.*, 2020; Kourrich *et al.*, 2013). Il est possible que 10 minutes ne suffisent pas pour avoir un effet sur S1R. L'ajout de l'agoniste peut induire un stress ressenti dans le début du temps d'exposition, résultant en une interaction moindre. Nos résultats montrent une légère tendance à la hausse à 60 minutes, sans être marquée. Nos résultats précédents ont montré que l'expression du canal à la membrane cellulaire est élevée dans les 10 première minutes avant de descendre vers 60 minutes. Cela explique les niveaux d'expression opposés observés en immunoprécipitation dans le cytoplasme. Nous estimons que les complexes Kv1.2-S1R se déplacent rapidement à la membrane plasmique et que nos expériences ne peuvent détecter la majorité des interactions dû à leur emplacement. Autrement, l'utilisation d'un autre agoniste, SKF10047, avec une concentration de 50 μ M pendant 20 minutes, ne montre pas de différence d'interaction avec la méthode FRET (Abraham *et al.*, 2019). Comme il semble que les effets des agonistes diffèrent entre eux, nous estimons que la cinétique de la réponse de S1R suivant l'activation par la cocaïne et la PRE-084 peut différer. Nous croyons que nous observons des complexes d'agrégats comprenant les formes immatures de Kv1.2 et le variant E102Q qui sont probablement dirigés vers les voies de dégradation. Nous supposons donc que l'envoi à la membrane plasmique du canal est entravé par son agrégation et sa retenue au cytoplasme, dues au variant E102Q.

En somme, nous pensons que le variant E102Q empêche la protéine sauvage S1R de jouer son rôle dans le transport nucléocytoplasmique de protéines clés, telle TDP43. Par conséquent, le variant peut contribuer à la dérégulation d'ARNm et ainsi de synthèse protéique. Nous estimons qu'une des responsabilités de S1R perturbée par le variant dans l'autophagie est le transport de p62 dans le cytosol. De plus, nous croyons que l'accumulation de LC3B-I et de LC3B-II observée en présence de E102Q promeut la formation d'agrégats toxiques due aux défauts dans la dégradation autophagique. Parmi les ARNm et les protéines impliquées dans ces dysfonctions, nous avons l'idée qu'il y en a qui sont associés à l'activité neuronale, comme Kv1.2. Par ce fait, la baisse d'expression à la surface de Kv1.2 ainsi que sa baisse d'expression totale observées en présence du variant semblent être expliquées partiellement par les défauts dans le transport ainsi que dans l'autophagie. La tendance à la hausse de l'interaction de Kv1.2 avec E102Q semble indiquer que le variant et les formes instables de Kv1.2 sont pris dans le cytosol. La dérégulation de ce canal

peut donc avoir comme effet de déstabiliser la modulation de l'excitabilité. Nous en concluons que chacun de ces effets du variant joue un rôle dans l'hyperexcitabilité neuronale qui est un des points importants de la pathologie de la SLA.

CONCLUSION

En résumé, notre étude a permis d'élucider l'impact du variant E102Q sur les états et la localisation de la protéine S1R. Elle a en plus ciblé certaines de ses fonctions essentielles qui sont affectées par conséquent. Nous avons découvert que le variant cause l'accumulation d'agrégats oligomériques et nucléaires de S1R. Cela nous a invité à étudier diverses fonctions de S1R sur lesquelles le variant pouvait avoir un effet.

Nous avons trouvé que E102Q semble responsable de l'accumulation nucléaire de la protéine de liaison à l'ARN, TDP43. L'accumulation cytoplasmique de la protéine a plus souvent été associée à la SLA (Lagier-Tourenne *et al.*, 2010). L'accumulation nucléaire de TDP43 dans la neurodégénération a peu été retrouvée dans la littérature, mais elle est tout aussi problématique. Nos résultats suggèrent un rôle de S1R dans son transport au cytoplasme qui semble entravé par le variant. Autant que la protéine est requise au noyau pour effectuer ses rôles dans le métabolisme d'ARN, leur présence excessive peut mener à des complications également (Carmen-Orozco *et al.*, 2024). Nous en avons ressorti que les rôles perturbés de TDP43 dû au variant peuvent jouer un rôle dans la baisse d'expression observée de Kv1.2 dans la SLA (Stringer et Weiss, 2023). Nous pensons que l'étude d'une autre protéine de liaison à l'ARN, FUS, est pertinente pour continuer cette recherche. L'analyse de ces protéines dans des essais de fractionnement peut être intéressante pour observer si les mêmes résultats en ressortent dans nos lignées cellulaires. Ce sont toutes les deux des protéines qui sont associées à la pathologie de la SLA (Kwiatkowski *et al.*, 2009; Lagier-Tourenne *et al.*, 2010; Sreedharan *et al.*, 2008; Vance *et al.*, 2009). Nous estimons que le variant E102Q peut avoir le même effet sur le transport de FUS que sur celui de TDP43. Autrement, l'observation des ces accumulations nucléaires par imagerie confocale peut renforcer les résultats. Pour y arriver, des anticorps fluorescents ciblant les protéines d'intérêt, TDP43 et FUS, et les ADN comme marqueurs nucléaires peuvent être utilisés.

Autrement, nous avons observé que le variant altère les niveaux d'expression de protéines autophagiques, p62, LC3B-I et LC3B-II, supportant un rôle de S1R dans les processus autophagiques. Nous en avons suggéré que le transport de p62 du noyau au cytosol fait partie des rôles de S1R dans l'autophagie. Nous en avons également soupçonné que l'altération du recyclage

autophagique contribue à l'expression faible de Kv1.2 observée en lien avec la SLA (Stringer et Weiss, 2023). Nous suggérons d'abord des expériences sur l'expression de p62 sur une période d'environ 30 minutes, afin d'observer sa dégradation dans le temps. Cela peut mieux informer sur le flux autophagique. Nous croyons qu'il y a moins de p62 aux autophagosomes en présence du variant et donc que p62 est moins dégradé que la protéine sauvage. Nous proposons la poursuite des recherches sur l'effet du variant E102Q sur la quantité de protéines ubiquitinées. Nous avons comme hypothèse que p62 est accumulé au noyau avec des protéines ubiquitinées et qu'elles ne sont pas dégradées parce que le variant empêche S1R de faire le transport entre le noyau et le cytoplasme. Nous pensons à des essais de fractionnement pour voir si p62 est bien davantage au noyau en présence de E102Q. Autrement, nous pensons qu'il peut être intéressant d'observer le déplacement de p62 entre le noyau et le cytoplasme en temps réel en présence de S1R ou de E102Q. Pour y parvenir, de l'imagerie en direct peut être effectué en utilisant une construction de p62 avec une étiquette fluorescente à transfecter dans les cellules exprimant S1R ou E102Q. Nous pensons que la présence du variant ne permet que la translocation de p62 en direction du noyau, alors que la présence de la protéine sauvage permet son déplacement bidirectionnel. Nous avons aussi comme suggestion d'isoler et analyser le contenu des autophagosomes. Nous pensons y retrouver moins de p62 et de contenu total en présence du variant qu'en présence de la protéine sauvage. De plus, nous croyons possible de retrouver davantage de précurseurs de Kv1.2 en présence de E102Q. Ensuite, l'étude de la formation des autolysosomes avec une construction de LC3B contenant un tandem de fluorescence mCherry-GFP peut permettre d'évaluer le taux de fusion en présence de S1R en comparaison avec la présence du variant. Le tandem mCherry-GFP permet d'observer par imagerie fluorescente le passage des autophagosomes aux autolysosomes par l'acidification détectée à la suite de la fusion (Kim *et al.*, 2020). Nous estimons que le variant peut causer l'accumulation d'autophagosomes non fusionnés due à un défaut dans les fonctions autophagiques de S1R.

Finalement, nous avons déterminé que la présence du variant cause la diminution de l'expression du canal potassique voltage-dépendant Kv1.2 à la surface membranaire suivant l'exposition à un agoniste. Les résultats sous-tendent que Kv1.2 interagit davantage avec E102Q qu'avec S1R. Nous en spéculons que le variant retient le canal au niveau cytoplasmique et empêche S1R de jouer son rôle dans sa maturation et le transport à la membrane plasmique. Nous suggérons d'étudier la

localisation de ces interactions avec des essais d'immunoprécipitation à partir d'extraits de fractionnements séparant le cytoplasme de la membrane plasmique. Nous croyons que cela peut permettre de déterminer si les interactions ont bien lieu au niveau cytoplasmique et de valider nos hypothèses. De plus, l'étude des rôles des canaux Kv1.2 dans l'excitabilité neuronale peut permettre de valider comment le variant E102Q les affecte par son interaction avec le canal potassique. Des essais d'électrophysiologie peut le permettre en utilisant des tranches de cerveaux de modèles murins, soit des souris WT ou des souris transgéniques S1R-E102Q. L'étude de l'excitabilité intrinsèque en mesurant les paramètres et patron de décharge des PAs peut permettre de confirmer que le variant provoque une hyperexcitabilité en diminuant leur latence de décharge tout en augmentant leur fréquence. Les tranches peuvent ensuite être récupérées pour extraire les protéines totales et mesurer la quantité de Kv1.2 en comparaison par immunobuvardage. Nos résultats montrent que le variant semble diminuer la stabilité de Kv1.2 et que son expression est moindre en sa présence. Nous pensons alors que les niveaux de Kv1.2 sont moindre chez les souris S1R-E102Q et que cela peut avoir des effets sur l'excitabilité intrinsèque.

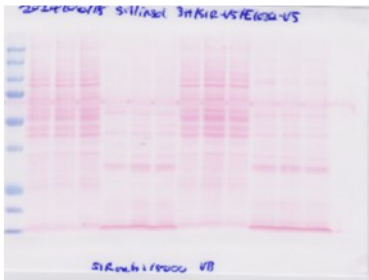
Nos expériences nous ont permis de considérer les lignées de cellules SH-SY5Y stables et la lignée HEK293T comme des modèles pour observer les effets du variant E102Q de S1R impliqué dans la SLA. Le variant E102Q étant associé à la jSLA, qui présente une progression beaucoup plus lente et moins agressive des symptômes relativement aux autres formes de la maladie, la détection de phénotypes distingués est un atout. L'utilisation de lignées cellulaires est favorable à la détection de nos protéines d'intérêt et elle permet d'avoir un meilleur contrôle sur les conditions expérimentales. L'étude des cellules SH-SY5Y et des cellules HEK293T en lien avec la jSLA est alors favorable avant de passer à des modèles *in vivo*. Cependant, la recherche sur des cellules peut être limitante et les conditions imposées peuvent mener à des variations dans les processus étudiés. Pour des expériences futures, il peut être intéressant de répliquer nos expériences dans des cultures primaires de neurones de rat afin de voir si les mêmes résultats en ressortent. De plus, la translation des expériences sur des tissus cérébraux murins peut ajouter de la profondeur dans les résultats. Pour cela, la création de modèles murins en injectant un virus adéno-associé (AAV) afin d'exprimer la mutation E102Q dans les régions ciblées du système nerveux est pertinente. Cela permettra de valider les résultats provenant des recherches *in vitro* et de caractériser les mécanismes pathologiques à l'origine des symptômes de la jSLA sous des conditions physiologiques.

En conclusion, les recherches sur S1R et son variant E102Q dans ce mémoire permettent une meilleure compréhension des caractéristiques de S1R qui sont affectées par la mutation liée à la SLA. Les perturbations des mécanismes étudiés pourraient informer sur les fonctions biologiques de S1R qui sont en jeu pour les personnes touchées par la maladie. L'étude permet surtout de cibler et rassembler des fonctions qui peuvent être des facteurs dans l'expression de Kv1.2 et son rôle dans l'hyperexcitabilité. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour les futures études des mécanismes cellulaires et moléculaires reliés à ces processus. Il est connu que S1R possède plusieurs fonctions autres que le transport nucléocytoplasmique, l'autophagie et l'activité neuronale, il peut ainsi être approprié de les étudier en complémentarité et d'approfondir ainsi les connaissances fondamentales en atout. Il serait tout aussi intéressant de voir comment ces fonctions ou d'autres sont impliquées dans d'autres aspects de la pathologie.

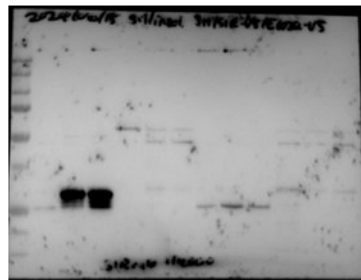
ANNEXE A

IMAGES BRUTES

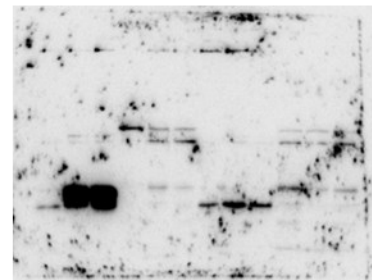
A



Coloration Ponceau S

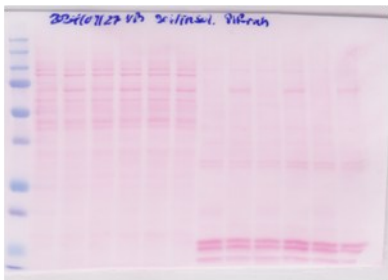


Marqueur + S1R
chimiluminescence

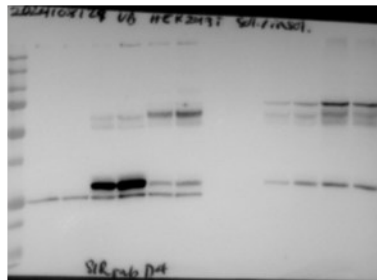


S1R
chimiluminescence

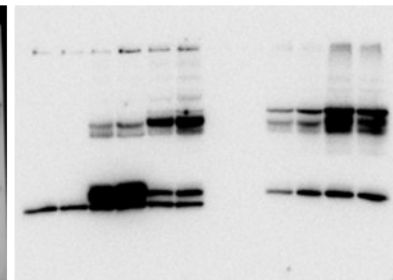
B



Coloration Ponceau S

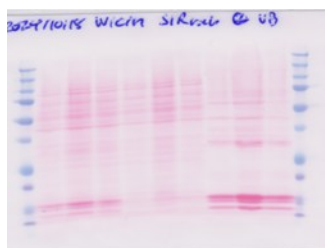


Marqueur + S1R
chimiluminescence

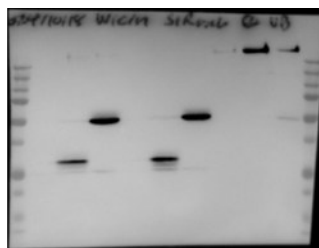


S1R
chimiluminescence

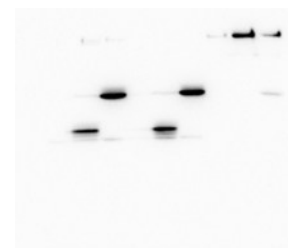
Figure A.1 : Images brutes utilisées pour le montage des panneaux A (A) et C (B) de la figure 3.1.



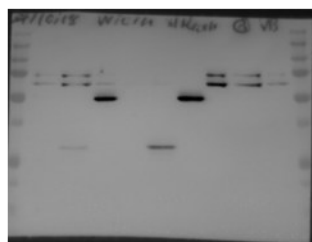
Coloration Ponceau S



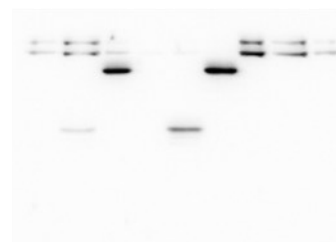
Marqueur + S1R
chimiluminescence



S1R
chimiluminescence



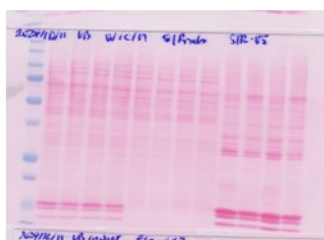
Marqueur + Lamin A/C
chimiluminescence



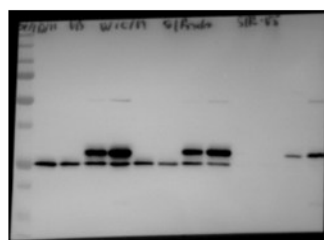
Lamin A/C
chimiluminescence

Figure A.2 : Images brutes utilisées pour le montage du panneau A de la figure 3.2.

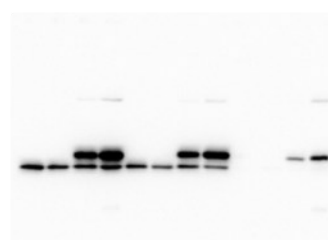
A



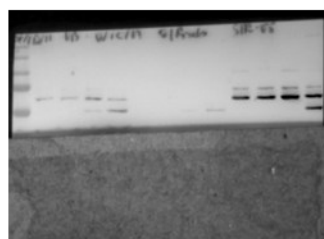
Coloration Ponceau S



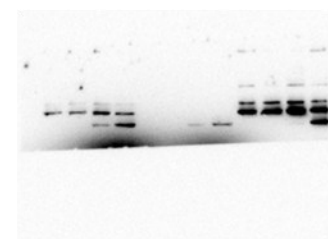
Marqueur + S1R
chimiluminescence



S1R
chimiluminescence

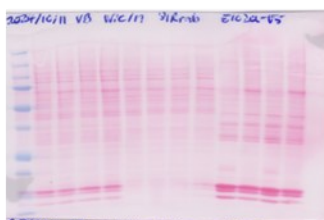


Marqueur + Lamin A/C
chimiluminescence

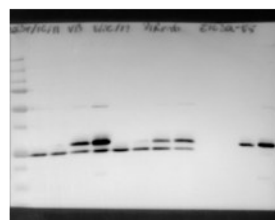


Lamin A/C
chimiluminescence

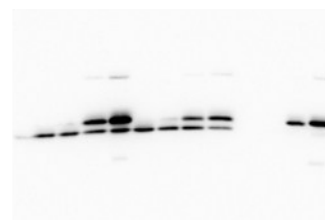
B



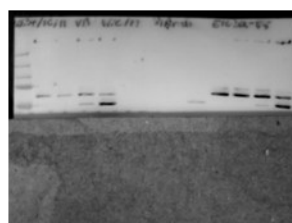
Coloration Ponceau S



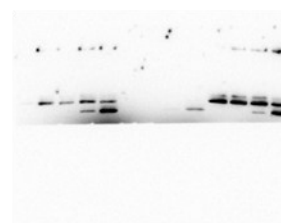
Marqueur + S1R
chimiluminescence



S1R
chimiluminescence

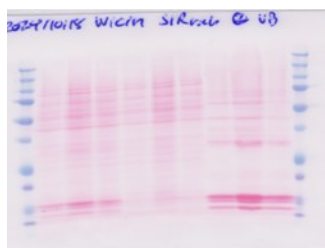


Marqueur + Lamin A/C
chimiluminescence

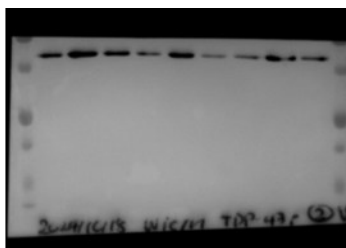


Lamin A/C
chimiluminescence

Figure A.3 : Images brutes utilisées pour le montage des panneaux D (A) et E (B) de la figure 3.2.



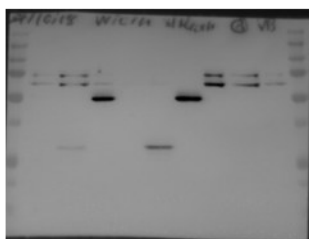
Coloration Ponceau S



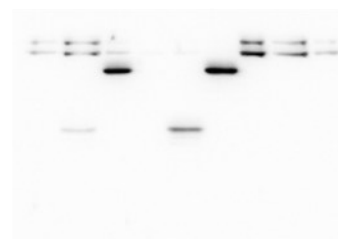
Marqueur + TDP43
chimiluminescence



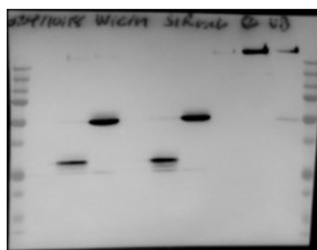
TDP43
chimiluminescence



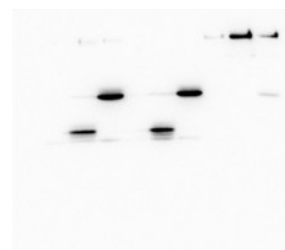
Marqueur + Lamin A/C
chimiluminescence



Lamin A/C
chimiluminescence



Marqueur + S1R
chimiluminescence



S1R
chimiluminescence

Figure A.4 : Images brutes utilisées pour le montage du panneau A de la figure 3.3.

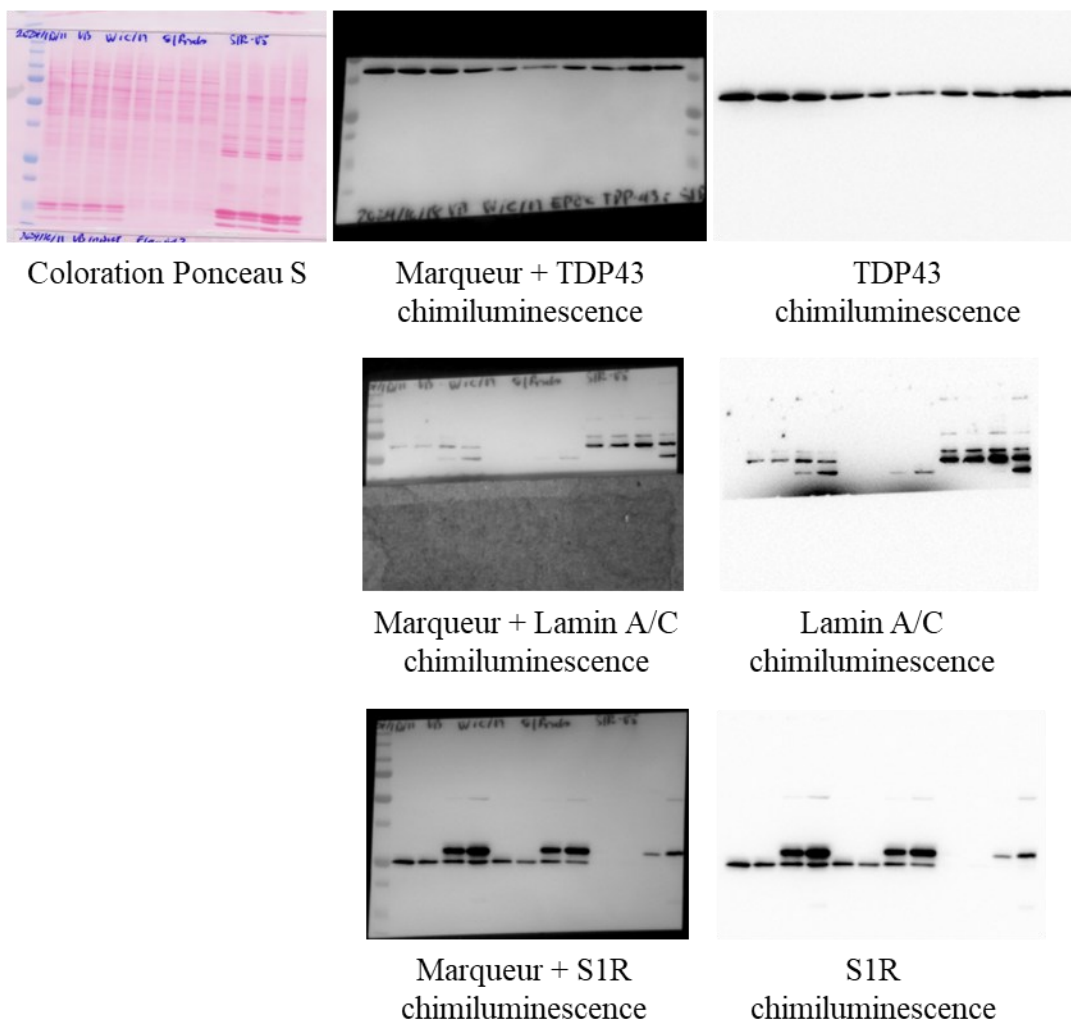


Figure A.5 : Images brutes utilisées pour le montage des panneaux C de la figure 3.3.

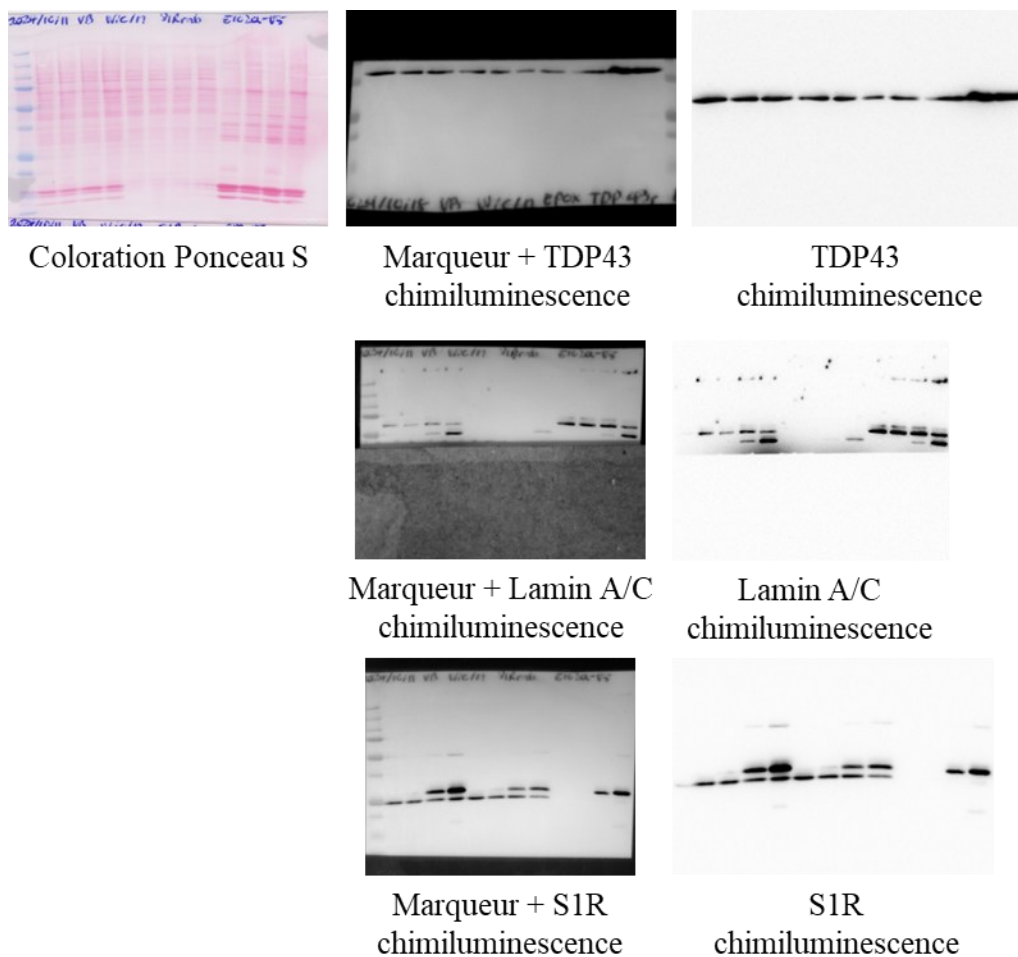
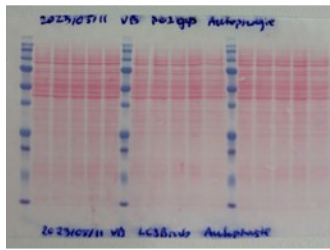
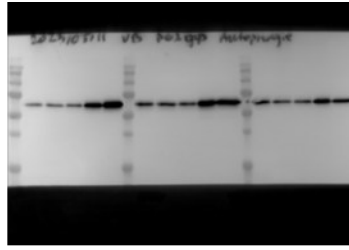


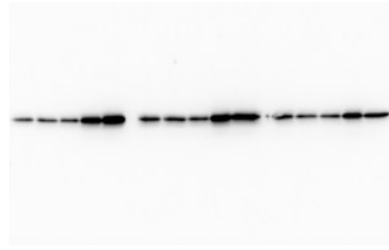
Figure A.6 : Images brutes utilisées pour le montage des panneaux D de la figure 3.3.



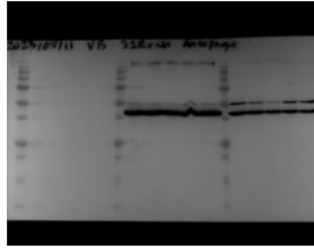
Coloration Ponceau S



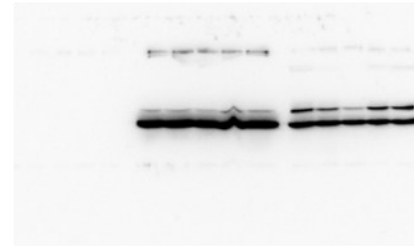
Marqueur + p62
chimiluminescence



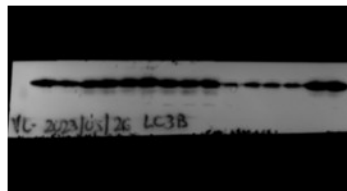
p62
chimiluminescence



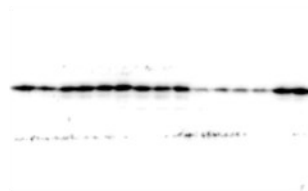
Marqueur + S1R
chimiluminescence



S1R
chimiluminescence

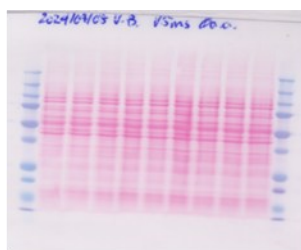


Marqueur + LC3B
chimiluminescence

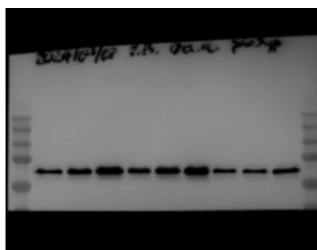


LC3B
chimiluminescence

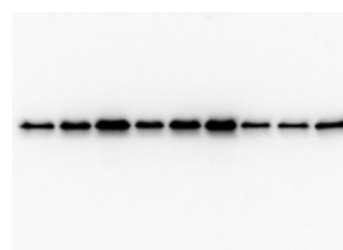
Figure A.7 : Images brutes utilisées pour le montage du panneau A de la figure 3.4.



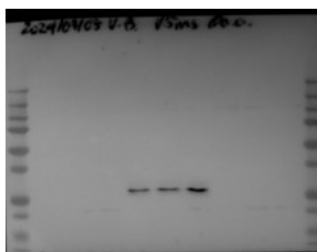
Coloration Ponceau S



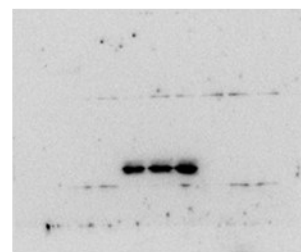
Marqueur + p62
chimiluminescence



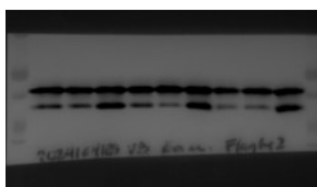
p62
chimiluminescence



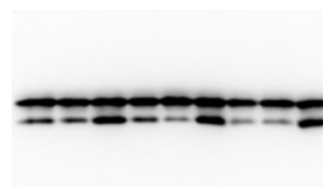
Marqueur + V5
chimiluminescence



V5
chimiluminescence

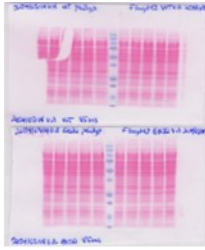


Marqueur + LC3B
chimiluminescence

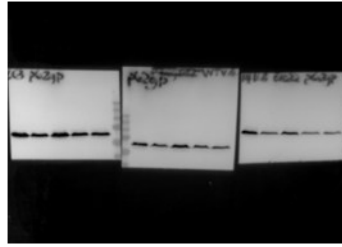


LC3B
chimiluminescence

Figure A.8 : Images brutes utilisées pour le montage du panneau A de la figure 3.5.



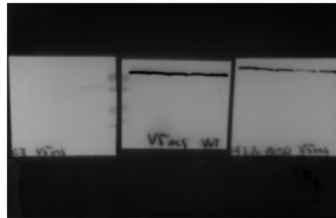
Coloration Ponceau S



Marqueur + p62
chimiluminescence



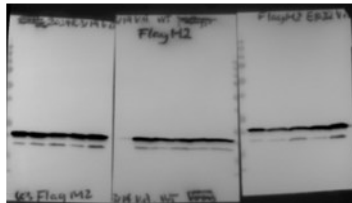
p62
chimiluminescence



Marqueur + V5
chimiluminescence



V5
chimiluminescence

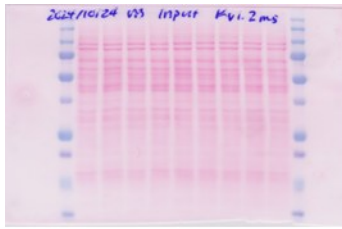


Marqueur + LC3B
chimiluminescence

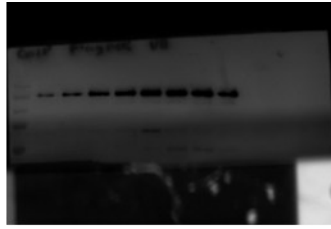


LC3B
chimiluminescence

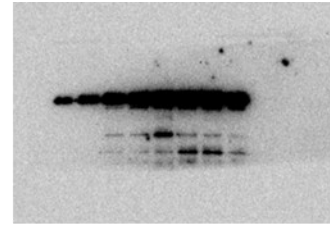
Figure A.9 : Images brutes utilisées pour le montage du panneau D de la figure 3.5.



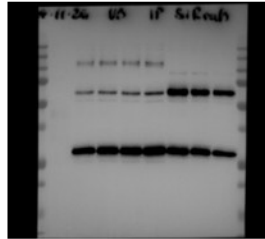
Coloration Ponceau S



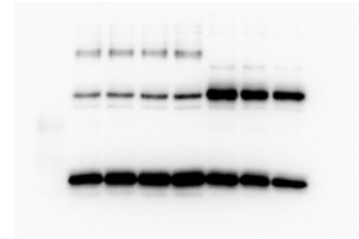
Marqueur + IP Kv1.2
chimiluminescence



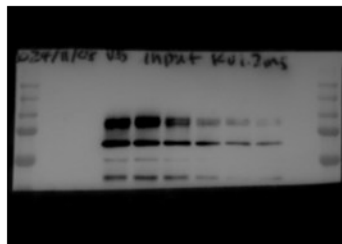
IP Kv1.2
chimiluminescence



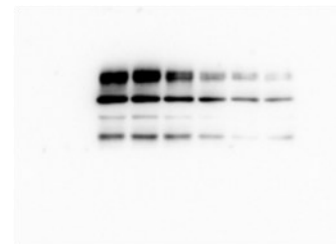
Marqueur + IP S1R
chimiluminescence



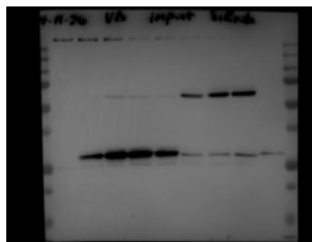
IP S1R
chimiluminescence



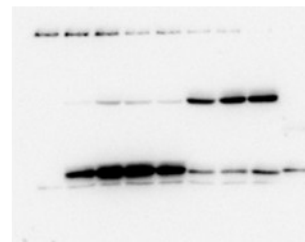
Marqueur + Kv1.2
chimiluminescence



Kv1.2
chimiluminescence



Marqueur + S1R
chimiluminescence



S1R
chimiluminescence

Figure A.10 : Images brutes utilisées pour le montage du panneau A de la figure 3.7.

RÉFÉRENCES

- Abel O, Powell JF, Andersen PM et Al-Chalabi A (2012) ALSoD: A user-friendly online bioinformatics tool for amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Human mutation* 33: 1345-1351.
- Abraham MJ, Fleming KL, Raymond S, Wong AYC et Bergeron R (2019) The sigma-1 receptor behaves as an atypical auxiliary subunit to modulate the functional characteristics of Kv1.2 channels expressed in HEK293 cells. *Physiological reports* 7: e14147.
- Abramyan AM, Yano H, Xu M, Liu L, Naing S, Fant AD et Shi L (2020) The Glu102 mutation disrupts higher-order oligomerization of the sigma 1 receptor. *Computational and structural biotechnology journal* 18: 199-206.
- Aishwarya R, Abdullah CS, Morshed M, Remex NS et Bhuiyan MS (2021) Sigmar1's Molecular, Cellular, and Biological Functions in Regulating Cellular Pathophysiology. *Frontiers in physiology* 12: 705575.
- Al-Chalabi A et Hardiman O (2013) The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nature reviews. Neurology* 9: 617-628.
- Al-Saif A, Al-Mohanna F et Bohlega S (2011) A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 70: 913-919.
- Alexander SP, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, McGrath JC, Catterall WA, Spedding M, Peters JA, Harmar AJ, et al. (2013) The Concise Guide to Pharmacology 2013/14: Overview. *British journal of pharmacology* 170: 1449-1458.
- Aller MI, Veale EL, Linden AM, Sandu C, Schwaninger M, Evans LJ, Korpi ER, Mathie A, Wisden W et Brickley SG (2005) Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 11455-11467.
- Amato AA et Russell JA (2008) *Neuromuscular disorders*. McGraw-Hill Medical, New York.
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, et al. (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and biophysical research communications* 351: 602-611.
- Aydar E, Palmer CP, Klyachko VA et Jackson MB (2002) The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron* 34: 399-410.
- Balasuriya D, D'Sa L, Talker R, Dupuis E, Maurin F, Martin P, Borgese F, Soriani O et Edwardson JM (2014) A direct interaction between the sigma-1 receptor and the hERG voltage-gated K⁺ channel revealed by atomic force microscopy and homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF(R)). *Journal of biological chemistry* 289: 32353-32363.

- Balasuriya D, Stewart AP, Crottes D, Borgese F, Soriani O et Edwardson JM (2012) The sigma-1 receptor binds to the Nav1.5 voltage-gated Na⁺ channel with 4-fold symmetry. *The Journal of biological chemistry* 287: 37021-37029.
- Berg TO, Fengsrud M, Stromhaug PE, Berg T et Seglen PO (1998) Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *The Journal of biological chemistry* 273: 21883-21892.
- Birsa N, Bentham MP et Fratta P (2020) Cytoplasmic functions of TDP-43 and FUS and their role in ALS. *Seminars in cell & developmental biology* 99: 193-201.
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H et Johansen T (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of cell biology* 171: 603-614.
- Bjorkoy G, Lamark T, Pankiv S, Overvatn A, Brech A et Johansen T (2009) Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods in enzymology* 452: 181-197.
- Capera J, Serrano-Novillo C, Navarro-Perez M, Cassinelli S et Felipe A (2019) The Potassium Channel Odyssey: Mechanisms of Traffic and Membrane Arrangement. *International journal of molecular sciences* 20:
- Carmen-Orozco RP, Tsao W, Ye Y, Sinha IR, Chang K, Trinh VT, Chung W, Bowden K, Troncoso JC, Blackshaw S, et al. (2024) Elevated nuclear TDP-43 induces constitutive exon skipping. *Molecular neurodegeneration* 19: 45.
- Catterall WA (1984) The molecular basis of neuronal excitability. *Science* 223: 653-661.
- Chen I et Lui F (2025) Neuroanatomy, Neuron Action Potential. Dans *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Chen Y, Hajipour AR, Sievert MK, Arbabian M et Ruoho AE (2007) Characterization of the cocaine binding site on the sigma-1 receptor. *Biochemistry* 46: 3532-3542.
- Chio A, Calvo A, Moglia C, Mazzini L, Mora G et group Ps (2011) Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 82: 740-746.
- Chiti F et Dobson CM (2017) Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annual review of biochemistry* 86: 27-68.
- Christ MG, Huesmann H, Nagel H, Kern A et Behl C (2019) Sigma-1 Receptor Activation Induces Autophagy and Increases Proteostasis Capacity In Vitro and In Vivo. *Cells* 8:

- Chu UB et Ruoho AE (2016) Biochemical Pharmacology of the Sigma-1 Receptor. *Molecular pharmacology* 89: 142-153.
- Collier JJ, Guissart C, Olahova M, Sasorith S, Piron-Prunier F, Suomi F, Zhang D, Martinez-Lopez N, Leboucq N, Bahr A, et al. (2021) Developmental Consequences of Defective ATG7-Mediated Autophagy in Humans. *The New England journal of medicine* 384: 2406-2417.
- Crottes D, Martial S, Rapetti-Mauss R, Pisani DF, Lorient C, Pellissier B, Martin P, Chevet E, Borgese F et Soriani O (2011) Sig1R protein regulates hERG channel expression through a post-translational mechanism in leukemic cells. *The Journal of biological chemistry* 286: 27947-27958.
- Cuervo AM (2004a) Autophagy: in sickness and in health. *Trends in cell biology* 14: 70-77.
- Cuervo AM (2004b) Autophagy: many paths to the same end. *Molecular and cellular biochemistry* 263: 55-72.
- Cutler NS, Heitman J et Cardenas ME (1999) TOR kinase homologs function in a signal transduction pathway that is conserved from yeast to mammals. *Molecular and cellular endocrinology* 155: 135-142.
- De Lorenzo F, Luningschror P, Nam J, Beckett L, Pilotto F, Galli E, Lindholm P, Rudt von Collenberg C, Mungwa ST, Jablonka S, et al. (2023) CDFN rescues motor neurons in models of amyotrophic lateral sclerosis by targeting endoplasmic reticulum stress. *Brain* 146: 3783-3799.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, et al. (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72: 245-256.
- Delint-Ramirez I, Garcia-Oscos F, Segev A et Kourrich S (2020) Cocaine engages a non-canonical, dopamine-independent, mechanism that controls neuronal excitability in the nucleus accumbens. *Molecular psychiatry* 25: 680-691.
- Dennis PB, Fumagalli S et Thomas G (1999) Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Current opinion in genetics & development* 9: 49-54.
- Deutsch C (2002) Potassium channel ontogeny. *Annual review of physiology* 64: 19-46.
- Dreser A, Vollrath JT, Sechi A, Johann S, Roos A, Yamoah A, Katona I, Bohlega S, Wiemuth D, Tian Y, et al. (2017) The ALS-linked E102Q mutation in Sigma receptor-1 leads to ER stress-mediated defects in protein homeostasis and dysregulation of RNA-binding proteins. *Cell death and differentiation* 24: 1655-1671.

- Dunn WA, Jr. (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *Journal of cell biology* 110: 1923-1933.
- Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT et Moscat J (2008) The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer cell* 13: 343-354.
- Dussossoy D, Carayon P, Belugou S, Ferat D, Bord A, Goubet C, Roque C, Vidal H, Combes T, Loison G, et al. (1999) Colocalization of sterol isomerase and sigma(1) receptor at endoplasmic reticulum and nuclear envelope level. *European journal of biochemistry* 263: 377-386.
- Eskelinen EL (2005) Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* 1: 1-10.
- Fontanilla D, Johannessen M, Hajipour AR, Cozzi NV, Jackson MB et Ruoho AE (2009) The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. *Science (New York, N.Y.)* 323: 934-937.
- Freeman SA, Desmazieres A, Fricker D, Lubetzki C et Sol-Foulon N (2016) Mechanisms of sodium channel clustering and its influence on axonal impulse conduction. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73: 723-735.
- Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T et Yoshimori T (2008) The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell* 19: 2092-2100.
- Glick D, Barth S et Macleod KF (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology* 221: 3-12.
- Gonzalez C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzun I, Rojas P, Naranjo D et Latorre R (2012) K(+) channels: function-structural overview. *Comprehensive Physiology* 2: 2087-2149.
- Goswami A, Dikshit P, Mishra A, Mulherkar S, Nukina N et Jana NR (2006) Oxidative stress promotes mutant huntingtin aggregation and mutant huntingtin-dependent cell death by mimicking proteasomal malfunction. *Biochemical and biophysical research communications* 342: 184-190.
- Gregianin E, Pallafacchina G, Zanin S, Crippa V, Rusmini P, Poletti A, Fang M, Li Z, Diano L, Petrucci A, et al. (2016) Loss-of-function mutations in the SIGMAR1 gene cause distal hereditary motor neuropathy by impairing ER-mitochondria tethering and Ca²⁺ signalling. *Human molecular genetics* 25: 3741-3753.
- Gromek KA, Suchy FP, Meddaugh HR, Wrobel RL, LaPointe LM, Chu UB, Primm JG, Ruoho AE, Senes A et Fox BG (2014) The oligomeric states of the purified sigma-1 receptor are stabilized by ligands. *The Journal of biological chemistry* 289: 20333-20344.
- Guertin DA et Sabatini DM (2005) An expanding role for mTOR in cancer. *Trends in molecular medicine* 11: 353-361.

- Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus HG, Striessnig J, Kempner E et Glossmann H (1996) Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 8072-8077.
- Hardie DG (2011) AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & development* 25: 1895-1908.
- Hasan MM, Goto S, Sekiya R, Hayashi T, Li TS et Kawabata T (2025) Sustained induction of autophagy enhances survival during prolonged starvation in newt cells. *Life science alliance* 8:
- Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T et Yamamoto A (2009) A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature cell biology* 11: 1433-1437.
- Hayashi T, Maurice T et Su TP (2000) Ca(2+) signaling via sigma(1)-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca(2+) concentration. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 293: 788-798.
- Hayashi T et Su TP (2003) Sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306: 718-725.
- Hayashi T et Su TP (2004) Sigma-1 receptor ligands: potential in the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS drugs* 18: 269-284.
- Hayashi T et Su TP (2007) Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell* 131: 596-610.
- He C et Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics* 43: 67-93.
- He L, Zhang J, Zhao J, Ma N, Kim SW, Qiao S et Ma X (2018) Autophagy: The Last Defense against Cellular Nutritional Stress. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* 9: 493-504.
- Huang WP, Ellis BCS, Hodgson RE, Sanchez Avila A, Kumar V, Rayment J, Moll T et Shelkovernikova TA (2024) Stress-induced TDP-43 nuclear condensation causes splicing loss of function and STMN2 depletion. *Cell reports* 43: 114421.
- Huang X, Zhang J, Yao J, Mi N et Yang A (2025) Phase separation of p62: roles and regulations in autophagy. *Trends in cell biology*
- Itakura E et Mizushima N (2013) Syntaxin 17: the autophagosomal SNARE. *Autophagy* 9: 917-919.

- Ivanov A, Pawlikowski J, Manoharan I, van Tuyn J, Nelson DM, Rai TS, Shah PP, Hewitt G, Korolchuk VI, Passos JF, et al. (2013) Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *The Journal of cell biology* 202: 129-143.
- Jana NR, Tanaka M, Wang G et Nukina N (2000) Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Human molecular genetics* 9: 2009-2018.
- Jana NR, Zemskov EA, Wang G et Nukina N (2001) Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Human molecular genetics* 10: 1049-1059.
- Jares-Erijman EA et Jovin TM (2003) FRET imaging. *Nature biotechnology* 21: 1387-1395.
- Jeng W, Lee S, Sung N, Lee J et Tsai FT (2015) Molecular chaperones: guardians of the proteome in normal and disease states. *F1000Research* 4:
- Jensen CS, Rasmussen HB et Misonou H (2011) Neuronal trafficking of voltage-gated potassium channels. *Molecular and cellular neurosciences* 48: 288-297.
- Jewell JL, Russell RC et Guan KL (2013) Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14: 133-139.
- Jung KH, Sun J, Hsiung CH, Lance Lian X, Liu Y et Zhang X (2023) Nuclear bodies protect phase separated proteins from degradation in stressed proteome. *bioRxiv : the preprint server for biology*
- Juste YR et Cuervo AM (2019) Analysis of Chaperone-Mediated Autophagy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1880: 703-727.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y et Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal* 19: 5720-5728.
- Kelekar A (2005) Autophagy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1066: 259-271.
- Kim J et Klionsky DJ (2000) Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annual review of biochemistry* 69: 303-342.
- Kim K et Guck J (2020) The Relative Densities of Cytoplasm and Nuclear Compartments Are Robust against Strong Perturbation. *Biophysical journal* 119: 1946-1957.
- Kim S, Choi S et Kang D (2020) Quantitative and qualitative analysis of autophagy flux using imaging. *BMB reports* 53: 241-247.

- Kinoshita M, Matsuoka Y, Suzuki T, Mirrieles J et Yang J (2012) Sigma-1 receptor alters the kinetics of Kv1.3 voltage gated potassium channels but not the sensitivity to receptor ligands. *Brain research* 1452: 1-9.
- Kirkegaard K, Taylor MP et Jackson WT (2004) Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nature reviews. Microbiology* 2: 301-314.
- Klionsky DJ (2023) This is a public service announcement-BioRender has issued a recall of their autophagy template. *Autophagy* 19: 3031-3032.
- Klouz A, Sapena R, Liu J, Maurice T, Tillement JP, Papadopoulos V et Morin D (2002) Evidence for sigma-1-like receptors in isolated rat liver mitochondrial membranes. *British journal of pharmacology* 135: 1607-1615.
- Knupp J, Chen YJ, Wang E, Arvan P et Tsai B (2024) Sigma-1 receptor recruits LC3 mRNA to ER-associated omegasomes to promote localized LC3 translation enabling functional autophagy. *Cell reports* 43: 114619.
- Kong M, Chen Z, Lin Z, Yin P et Zhao Q (2024) SIGMAR1 targets AMPK/ULK1 pathway to inhibit SH-SY5Y cell apoptosis by regulating endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Functional & integrative genomics* 24: 134.
- Kopitz J, Kisen GO, Gordon PB, Bohley P et Seglen PO (1990) Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. *The Journal of cell biology* 111: 941-953.
- Kourrich S (2017) Sigma-1 Receptor and Neuronal Excitability. *Handbook of experimental pharmacology* 244: 109-130.
- Kourrich S, Hayashi T, Chuang JY, Tsai SY, Su TP et Bonci A (2013) Dynamic interaction between sigma-1 receptor and Kv1.2 shapes neuronal and behavioral responses to cocaine. *Cell* 152: 236-247.
- Kourrich S, Su TP, Fujimoto M et Bonci A (2012) The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. *Trends in neurosciences* 35: 762-771.
- Kuang Q, Purhonen P et Hebert H (2015) Structure of potassium channels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72: 3677-3693.
- Kuijpers M, Kochlamazashvili G, Stumpf A, Puchkov D, Swaminathan A, Lucht MT, Krause E, Maritzen T, Schmitz D et Haucke V (2022) Neuronal Autophagy Regulates Presynaptic Neurotransmission by Controlling the Axonal Endoplasmic Reticulum. *Neuron* 110: 734.
- Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, et al. (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)* 323: 1205-1208.

- Lachance V, Belanger SM, Hay C, Le Corvec V, Banouvong V, Lapalme M, Tarmoun K, Beaucaire G, Lussier MP et Kourrich S (2023) Overview of Sigma-1R Subcellular Specific Biological Functions and Role in Neuroprotection. *International journal of molecular sciences* 24:
- Lagier-Tourenne C, Polymenidou M et Cleveland DW (2010) TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Human molecular genetics* 19: R46-64.
- Lang R, Hodgson RE et Shelkovernikova TA (2024) TDP-43 in nuclear condensates: where, how, and why. *Biochemical Society transactions* 52: 1809-1825.
- Lee PT, Lievens JC, Wang SM, Chuang JY, Khalil B, Wu HE, Chang WC, Maurice T et Su TP (2020) Sigma-1 receptor chaperones rescue nucleocytoplasmic transport deficit seen in cellular and Drosophila ALS/FTD models. *Nature communications* 11: 5580.
- Lehky T et Grunseich C (2021) Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Review. *Genes (Basel)* 12:
- Liu ZJ, Lin HX, Liu GL, Tao QQ, Ni W, Xiao BG et Wu ZY (2017) The investigation of genetic and clinical features in Chinese patients with juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical genetics* 92: 267-273.
- Mann SS et Hammarback JA (1994) Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *The Journal of biological chemistry* 269: 11492-11497.
- Mavlyutov TA, Epstein ML, Liu P, Verbny YI, Ziskind-Conhaim L et Ruoho AE (2012) Development of the sigma-1 receptor in C-terminals of motoneurons and colocalization with the N,N'-dimethyltryptamine forming enzyme, indole-N-methyl transferase. *Neuroscience* 206: 60-68.
- Mavlyutov TA, Epstein ML, Verbny YI, Huerta MS, Zaitoun I, Ziskind-Conhaim L et Ruoho AE (2013) Lack of sigma-1 receptor exacerbates ALS progression in mice. *Neuroscience* 240: 129-134.
- Mavlyutov TA, Guo LW, Epstein ML et Ruoho AE (2015) Role of the Sigma-1 receptor in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Journal of pharmacological sciences* 127: 10-16.
- Mavlyutov T, Chen X, Guo L et Yang J (2018) APEX2- tagging of Sigma 1-receptor indicates subcellular protein topology with cytosolic N-terminus and ER luminal C-terminus. *Protein & cell* 9: 733-737.
- McCord JM et Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry* 244: 6049-6055.
- Meriney SD, Fanselow EE et ScienceDirect (2019) *Synaptic transmission*. Academic Press, London ; Cambridge, MA.

- Miki Y, Mori F, Kon T, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H et Wakabayashi K (2014) Accumulation of the sigma-1 receptor is common to neuronal nuclear inclusions in various neurodegenerative diseases. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 34: 148-158.
- Miki Y, Tanji K, Mori F et Wakabayashi K (2015) Sigma-1 receptor is involved in degradation of intranuclear inclusions in a cellular model of Huntington's disease. *Neurobiology of disease* 74: 25-31.
- Mishra AK, Mavlyutov T, Singh DR, Biener G, Yang J, Oliver JA, Ruoho A et Raicu V (2015) The sigma-1 receptors are present in monomeric and oligomeric forms in living cells in the presence and absence of ligands. *The Biochemical journal* 466: 263-271.
- Mitchener JS, Shelburne JD, Bradford WD et Hawkins HK (1976) Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells. *The American journal of pathology* 83: 485-492.
- Mizushima N (2005) The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell death and differentiation, 12 Suppl 2*: 1535-1541.
- Mizushima N (2007) Autophagy: process and function. *Genes & development* 21: 2861-2873.
- Mizushima N, Ohsumi Y et Yoshimori T (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell structure and function* 27: 421-429.
- Morales-Lazaro SL, Gonzalez-Ramirez R et Rosenbaum T (2019) Molecular Interplay Between the Sigma-1 Receptor, Steroids, and Ion Channels. *Frontiers in pharmacology* 10: 419.
- Mori T, Hayashi T, Hayashi E et Su TP (2013) Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival. *PLoS One* 8: e76941.
- Munguia-Galaviz FJ, Miranda-Diaz AG, Cardenas-Sosa MA et Echavarria R (2023) Sigma-1 Receptor Signaling: Inf Search of New Therapeutic Alternatives for Cardiovascular and Renal Diseases. *International journal of molecular sciences* 24:
- Nabbi A et Riabowol K (2015) Rapid Isolation of Nuclei from Cells In Vitro. *Cold Spring Harbor protocols* 2015: 769-772.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, et al. (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)* 314: 130-133.
- Olsen RW et Sieghart W (2009) GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56: 141-148.

- Ortega-Roldan JL, Ossa F et Schnell JR (2013) Characterization of the human sigma-1 receptor chaperone domain structure and binding immunoglobulin protein (BiP) interactions. *The Journal of biological chemistry* 288: 21448-21457.
- Ossa F, Schnell JR et Ortega-Roldan JL (2017) A Review of the Human Sigma-1 Receptor Structure. *Advances in experimental medicine and biology* 964: 15-29.
- Pan L, Pasternak DA, Xu J, Xu M, Lu Z, Pasternak GW et Pan YX (2017) Isolation and characterization of alternatively spliced variants of the mouse sigma1 receptor gene, Sigmar1. *PLoS One* 12: e0174694.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G et Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of biological chemistry* 282: 24131-24145.
- Pankiv S, Lamark T, Bruun JA, Overvatn A, Bjorkoy G et Johansen T (2010) Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *The Journal of biological chemistry* 285: 5941-5953.
- Pfeifer U (1978) Inhibition by insulin of the formation of autophagic vacuoles in rat liver. A morphometric approach to the kinetics of intracellular degradation by autophagy. *The Journal of cell biology* 78: 152-167.
- Picher-Martel V, Brunet F, Dupre N et Chrestian N (2020) The Occurrence of FUS Mutations in Pediatric Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Case Report and Review of the Literature. *Journal of child neurology* 35: 556-562.
- Prasad PD, Li HW, Fei YJ, Ganapathy ME, Fujita T, Plumley LH, Yang-Feng TL, Leibach FH et Ganapathy V (1998) Exon-intron structure, analysis of promoter region, and chromosomal localization of the human type 1 sigma receptor gene. *Journal of neurochemistry* 70: 443-451.
- Pratt KG et Aizenman CD (2007) Homeostatic regulation of intrinsic excitability and synaptic transmission in a developing visual circuit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 8268-8277.
- Prause J, Goswami A, Katona I, Roos A, Schnizler M, Bushuven E, Dreier A, Buchkremer S, Johann S, Beyer C, et al. (2013) Altered localization, abnormal modification and loss of function of Sigma receptor-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Human molecular genetics* 22: 1581-1600.
- Ptak-Kaczor M, Banach M, Stapor K, Fabian P, Konieczny L et Roterman I (2021) Solubility and Aggregation of Selected Proteins Interpreted on the Basis of Hydrophobicity Distribution. *International journal of molecular sciences* 22:

- Punnonen EL, Autio S, Marjomaki VS et Reunanen H (1992) Autophagy, cathepsin L transport, and acidification in cultured rat fibroblasts. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 40: 1579-1587.
- Qin X, Li C, He H, Pan Z, Lai C, Qin X, Li C, He H, Pan Z et Lai C (2023-05-23) Python-Based Circuit Design for Fundamental Building Blocks of Spiking Neural Network. *Electronics* 2023, Vol 12, Page 2351 12:
- Rabinowitz JD et White E (2010) Autophagy and metabolism. *Science (New York, N.Y.)* 330: 1344-1348.
- Ramachandran S, Lu H, Prabhu U et Ruoho AE (2007) Purification and characterization of the guinea pig sigma-1 receptor functionally expressed in Escherichia coli. *Protein expression and purification* 51: 283-292.
- Rello-Varona S, Lissa D, Shen S, Niso-Santano M, Senovilla L, Marino G, Vitale I, Jemaa M, Harper F, Pierron G, et al. (2012) Autophagic removal of micronuclei. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 11: 170-176.
- Renton AE, Chio A et Traynor BJ (2014) State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature neuroscience* 17: 17-23.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, et al. (2011) A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72: 257-268.
- Robbins CA et Tempel BL (2012) Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models. *Epilepsia* 53 Suppl 1: 134-141.
- Rodriguez-Munoz M, Cortes-Montero E, Garzon-Nino J et Sanchez-Blazquez P (2020) The ALS-related sigma1R E102Q Mutant Eludes Ligand Control and Exhibits Anomalous Response to Calcium. *International journal of molecular sciences* 21:
- Rosen DA, Seki SM, Fernandez-Castaneda A, Beiter RM, Eccles JD, Woodfolk JA et Gaultier A (2019) Modulation of the sigma-1 receptor-IRE1 pathway is beneficial in preclinical models of inflammation and sepsis. *Science translational medicine* 11:
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62.
- Ross CA et Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine* 10 Suppl: S10-17.
- Ross CA et Poirier MA (2005) Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nature reviews. Molecular cell biology* 6: 891-898.

- Roth BL (2019) Molecular pharmacology of metabotropic receptors targeted by neuropsychiatric drugs. *Nature structural & molecular biology* 26: 535-544.
- Rowland LP et Shneider NA (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. *The New England journal of medicine* 344: 1688-1700.
- Russell RC, Yuan HX et Guan KL (2014) Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell research* 24: 42-57.
- Schmidt HR et Kruse AC (2019) The Molecular Function of sigma Receptors: Past, Present, and Future. *Trends in pharmacological sciences* 40: 636-654.
- Schmidt HR, Zheng S, Gurpinar E, Koehl A, Manglik A et Kruse AC (2016) Crystal structure of the human sigma 1 receptor. *Nature* 532: 527-530.
- Schrock JM, Spino CM, Longen CG, Stabler SM, Marino JC, Pasternak GW et Kim FJ (2013) Sequential cytoprotective responses to Sigma1 ligand-induced endoplasmic reticulum stress. *Molecular pharmacology* 84: 751-762.
- Schulz DJ, Baines RA, Hempel CM, Li L, Liss B et Misonou H (2006) Cellular excitability and the regulation of functional neuronal identity: from gene expression to neuromodulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 10362-10367.
- Schulz DJ, Temporal S, Barry DM et Garcia ML (2008) Mechanisms of voltage-gated ion channel regulation: from gene expression to localization. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65: 2215-2231.
- Seth P, Ganapathy ME, Conway SJ, Bridges CD, Smith SB, Casellas P et Ganapathy V (2001) Expression pattern of the type 1 sigma receptor in the brain and identity of critical anionic amino acid residues in the ligand-binding domain of the receptor. *Biochimica et biophysica acta* 1540: 59-67.
- Seth P, Leibach FH et Ganapathy V (1997) Cloning and structural analysis of the cDNA and the gene encoding the murine type 1 sigma receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 241: 535-540.
- Sharma N, Patel C, Shenkman M, Kessel A, Ben-Tal N et Lederkremer GZ (2021) The Sigma-1 receptor is an ER-localized type II membrane protein. *The Journal of biological chemistry* 297: 101299.
- Sherman MY et Goldberg AL (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29: 15-32.
- Sigworth FJ (2001) Potassium channel mechanics. *Neuron* 32: 555-556.
- Smeyers J, Banchi EG et Latouche M (2021) C9ORF72: What It Is, What It Does, and Why It Matters. *Frontiers in cellular neuroscience* 15: 661447.

- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, et al. (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)* 319: 1668-1672.
- Stringer RN et Weiss N (2023) Pathophysiology of ion channels in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular brain* 16: 82.
- Su TP (1982) Evidence for sigma opioid receptor: binding of [3H]SKF-10047 to etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 223: 284-290.
- Su TP, London ED et Jaffe JH (1988) Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems. *Science (New York, N.Y.)* 240: 219-221.
- Su TP, Su TC, Nakamura Y et Tsai SY (2016) The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems. *Trends in pharmacological sciences* 37: 262-278.
- Sudhof TC (2012) Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4: a011353.
- Swinnen B et Robberecht W (2014) The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews. Neurology* 10: 661-670.
- Talbot K (2009) Motor neuron disease: the bare essentials. *Practical neurology* 9: 303-309.
- Talley EM, Lei Q, Sirois JE et Bayliss DA (2000) TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* 25: 399-410.
- Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D et Bayliss DA (2001) Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21: 7491-7505.
- Tanida I (2011) Autophagy basics. *Microbiology and immunology* 55: 1-11.
- Tanida I, Ueno T et Kominami E (2008) LC3 and Autophagy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 445: 77-88.
- Tarmoun K, Lachance V, Le Corvec V, Belanger SM, Beaucaire G et Kourrich S (2024) Comprehensive Analysis of Age- and Sex-Related Expression of the Chaperone Protein Sigma-1R in the Mouse Brain. *Brain sciences* 14:
- Taura J, Kircher DM, Gameiro-Ros I et Slesinger PA (2021) Comparison of K(+) Channel Families. *Handbook of experimental pharmacology* 267: 1-49.
- Tombola F, Pathak MM et Isacoff EY (2006) How does voltage open an ion channel? *Annual review of cell and developmental biology* 22: 23-52.

- Tooze J, Hollinshead M, Ludwig T, Howell K, Hoflack B et Kern H (1990) In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. *The Journal of cell biology* 111: 329-345.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ et Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62: 405-496.
- Tsai SY, Chuang JY, Tsai MS, Wang XF, Xi ZX, Hung JJ, Chang WC, Bonci A et Su TP (2015) Sigma-1 receptor mediates cocaine-induced transcriptional regulation by recruiting chromatin-remodeling factors at the nuclear envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: E6562-6570.
- Tziortzouda P, Van Den Bosch L et Hirth F (2021) Triad of TDP43 control in neurodegeneration: autoregulation, localization and aggregation. *Nature reviews. Neuroscience* 22: 197-208.
- Vacher H, Mohapatra DP et Trimmer JS (2008) Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiological reviews* 88: 1407-1447.
- Vacher H et Trimmer JS (2011) Diverse roles for auxiliary subunits in phosphorylation-dependent regulation of mammalian brain voltage-gated potassium channels. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 462: 631-643.
- Vacher H et Trimmer JS (2012) Trafficking mechanisms underlying neuronal voltage-gated ion channel localization at the axon initial segment. *Epilepsia* 53 Suppl 9: 21-31.
- Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, et al. (2009) Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science (New York, N.Y.)* 323: 1208-1211.
- Vihinen M (2020) Solubility of proteins. *ADMET & DMPK* 8: 391-399.
- Vollrath JT, Sechi A, Dreser A, Katona I, Wiemuth D, Vervoorts J, Dohmen M, Chandrasekar A, Prause J, Brauers E, et al. (2014) Loss of function of the ALS protein SigR1 leads to ER pathology associated with defective autophagy and lipid raft disturbances. *Cell death & disease* 5: e1290.
- Wang DD et Kriegstein AR (2008) GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 5547-5558.
- Wang W, Li L, Lin WL, Dickson DW, Petrucelli L, Zhang T et Wang X (2013) The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Human molecular genetics* 22: 4706-4719.
- Wijesekera LC et Leigh PN (2009) Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet journal of rare diseases* 4: 3.

- Wong AY, Hristova E, Ahlskog N, Tasse LA, Ngsee JK, Chudalayandi P et Bergeron R (2016) Aberrant Subcellular Dynamics of Sigma-1 Receptor Mutants Underlying Neuromuscular Diseases. *Molecular pharmacology* 90: 238-253.
- Wright GSA, Antonyuk SV et Hasnain SS (2019) The biophysics of superoxide dismutase-1 and amyotrophic lateral sclerosis. *Quarterly reviews of biophysics* 52: e12.
- Xu G et Jaffrey SR (2013) Proteomic identification of protein ubiquitination events. *Biotechnology & genetic engineering reviews* 29: 73-109.
- Yang H, Shen H, Li J et Guo LW (2019) SIGMAR1/Sigma-1 receptor ablation impairs autophagosome clearance. *Autophagy* 15: 1539-1557.
- Ye N, Qin W, Tian S, Xu Q, Wold EA, Zhou J et Zhen XC (2020) Small Molecules Selectively Targeting Sigma-1 Receptor for the Treatment of Neurological Diseases. *Journal of medicinal chemistry* 63: 15187-15217.
- Yla-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E et Eskelinen EL (2009) 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 5: 1180-1185.
- Yu FH et Catterall WA (2004) The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004: re15.