

Fonction cellulaire de la HNRNP A1B, une isoforme plus longue de *HNRNPA1*, qui est régulée à la hausse dans la SLA/DFT

Par

Mariana Llasera Ballester García

Département de Biochimie et médecine moléculaire, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Biochimie option générale

Octobre 2023

© Mariana Llasera Ballester García, 2023

Université de Montréal

Unité académique : département de biochimie

Ce mémoire intitulé

**Fonction cellulaire de la HNRNP A1B, une isoforme plus longue de *HNRNPA1*, qui est
régulée à la hausse dans la SLA/DFT**

Présenté par

Mariana Llasera Ballester García

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Malik Chaker-Margot

Président

Kessen Patten

Membre du jury

Christine Vande Velde

Directeur

Résumé

Les protéines de liaison à l'ARN (PLA) s'assemblent en complexes cytoplasmiques avec les ARNm pour contrôler la traduction locale des ARNm et le transport axonal. Ces processus sont essentiels au maintien de la survie des neurones et leur déficience est impliquée dans le développement de nombreuses maladies neurodégénératives, telles que la SLA. Il a été montré ultérieurement que la déplétion nucléaire de TDP-43, liée à la SLA, entraîne l'accumulation d'une variante épissée alternativement de la ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène A1 (hnRNP A1). Cette isoforme, appelée hnRNP A1B, possède une région désordonnée (RID) et, dans le contexte neuronal, localise dans les neurites et dans le noyau, alors que la hnRNP A1 localise majoritairement dans le noyau. Ceci appuie l'hypothèse que la hnRNP A1B peut avoir une fonction cytosolique dans les neurones qui n'est pas partagée avec la hnRNP A1. En outre, les hnRNP A1 et hnRNP A1B sont mutées dans de rares cas de SLA familiale, dont certaines mutations sont spécifiques à la hnRNP A1B. Jusqu'à présent, la littérature se concentre sur l'isoforme hnRNP A1 tandis que peu est répertorié sur la fonction de la hnRNP A1B. Ainsi, cette étude vise à déterminer et caractériser la fonction cytosolique de la hnRNP A1B dans les neurones.

Puisque très peu est répertorié sur la hnRNP A1B, il a fallu tout d'abord déterminer des partenaires d'interaction. Ainsi, une immunoprécipitation utilisant un anticorps spécifique à la hnRNP A1B suivi d'une spectrométrie de masse (IP-MS) a été réalisée sur la moelle épinière de souris. Les résultats soulèvent que de nombreux interacteurs de la hnRNP A1B sont associés au trafic intracellulaire dépendant du cytosquelette. Les interactions avec KLC1/KIF5C/Myh9/Dync1H1 ont été validées par des tests d'immunoprécipitation et de colocalisation. Aussi, l'impact de certains mutants hnRNP A1B associés à la SLA ont été étudiés au niveau des interactions avec les protéines motrices. Des expériences visant à évaluer comment la hnRNP A1B peut être transportée, ainsi que réguler le transport, sont en cours.

Les résultats confirment que la hnRNP A1B peut avoir une fonction cytosolique dans les neurones pour le transport axonal/dendritique de l'ARNm. Des études futures exploreront cette nouvelle fonction dans le contexte de la SLA.

Mots-clés : Ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire (hnRNP), Ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire (hnRNP A1B), Sclérose latérale amyotrophique (SLA), protéines motrices, Protéomique, Transport d'ARN

Abstract

RNA-binding proteins (RBPs) assemble into cytoplasmic complexes with mRNAs to control mRNA local translation and axonal transport. These processes are essential for maintaining neuronal survival and their impairment is implicated in the development of many neurodegenerative diseases, such as ALS. We have discovered that TDP-43 depletion, linked to ALS, drives the accumulation of an alternatively spliced variant of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1). This isoform, termed hnRNP A1B, has an elongated prion-like domain (PrLD) and is present in neuronal processes, while hnRNP A1 is not. This finding supports a hypothesis that hnRNP A1B may have a cytosolic function in neurons that is not shared with hnRNP A1. In addition, hnRNP A1 and hnRNP A1B are mutated in rare cases of familial ALS with some mutations specific to hnRNP A1B. To date, the literature has mostly focused on the hnRNPA1 isoform and little is known about hnRNP A1B function. Thus, this study aims to identify and characterize the cytosolic function of hnRNP A1B in neurons.

Since very little is known about hnRNP A1B, it was first necessary to identify interaction partners of the protein. Thus, immunoprecipitation using an antibody specific to hnRNP A1B followed by mass spectrometry (IP-MS) was performed on mouse spinal cord. Our results show that many hnRNP A1B interactors are associated with cytoskeletal dependent intracellular trafficking. We then proceed to validate the interactions with the motor proteins KLC1/KIF5C/Myh9, by immunoprecipitation and proximity ligation assays. In addition, some hnRNP A1B ALS mutants were studied in the context of this interactions. Experiments to evaluate how hnRNP A1B may be transported, as well as regulate transport are currently underway.

Our findings support that hnRNP A1B may have a cytosolic function in neurons in mRNA axonal/dendritic transport. Future study will explore this novel function in the ALS context.

Keywords : Heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP), Heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP A1B), Amyotrophique lateral sclerosis (ALS), Proteomic, RNA transport

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des figures	8
Liste des tableaux	9
Liste des sigles et abréviations	10
Remerciements	14
Introduction	16
1.1 La sclérose latérale amyotrophique (SLA)	16
1.1.1 Définition et incidence.....	16
1.1.2 Les types de SLA et leurs symptômes.....	17
1.1.3 Une diversité de gènes impliquée dans la SLA.....	18
1.1.3.1 Cadre de lecture ouvert 72 du chromosome 9 (C9ORF72).....	20
1.1.3.2 La protéine de liaison à l'ARN fusion dans le sarcome (FUS).....	21
1.1.4 Un point commun : la protéinopathie de la protéine 43 de liaison à l'ADN (TDP-43 ou TARDBP) de la réponse à la transactivation (TAR).....	22
1.1.4.1 La déplétion nucléaire de TDP-43 et son agrégation dans les neurites.	22
1.1.4.1.1 Perturbation du métabolisme de l'ARN (34-36) :.....	23
1.1.4.1.2 Dysfonctionnement du contrôle de la qualité des protéines (32, 37-39) :.....	24
1.1.4.1.3 Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydatif (40-42) :.....	24
1.1.4.1.4 Neuroinflammation:.....	24
1.1.4.1.5 Mutations.....	25
1.1.5 Les traitements et biomarqueurs disponibles.....	25
1.1.5.1 Les traitements disponibles/essais cliniques.	25
1.1.5.1.1 Riluzole (45, 49, 50) :.....	25
1.1.5.1.2 Edaravone (46, 51) :.....	26
1.1.5.1.3 Le phénylbutyrate de sodium/taurursodiol (AMX0035)(47, 52, 53) :.....	26
1.1.5.1.4 Autres traitements.....	26
1.1.5.2 Les biomarqueurs	28
1.2 Le transport neuronal de l'ARNm	29
1.2.1 Définition.....	29
1.2.2 Les dilemmes du transport des ARNm, plusieurs questions sans réponse.....	31
1.2.2.1 <i>L'interaction ARN-PLA</i>	31
1.2.2.2 <i>L'interaction PLA-protéines motrices</i>	31
1.2.2.3 <i>Les complexes mRNP sont-ils dynamiques ? implication de la SPLN et des domaines intrinsèquement désordonnés.</i>	32
1.2.3 Le transport des ARNm dans les maladies neurodégénératives.....	33
1.2.3.1 <i>Mutations, agrégation et mauvaise localisation des protéines de liaison à l'ARN (PLA)</i>	34
1.2.3.2 <i>Mutations dans la Machinerie de Transport et les composants du cytosquelette</i>	34
1.3 HNRNPA1	36
1.3.1 La famille hnRNPA/B.....	36
1.3.1.1 <i>hnRNP A2/B1</i>	36
1.3.1.2 <i>hnRNP A0</i>	37
1.3.1.3 <i>hnRNPA3</i>	38
1.3.1.4 <i>Le dilemme de la famille hnRNPA/B : la compréhension des distinctions entre les divers membres et leurs isoformes.</i>	38

1.3.2	HNRNPA1, un gène de la famille hnRNP A/B	40
1.3.2.1	L'épissage alternatif de <i>HNRNPA1</i>	40
1.3.2.2	La structure protéique de <i>HNRNPA1</i>	40
	Le domaine N-terminal : un domaine <i>ordonné</i> :	41
	Le domaine C-terminal : un domaine <i>désordonné</i>	41
1.3.2.3	Les fonctions de la hnRNP A1 et les effets des modifications post-traductionnelles :	43
1.3.2.3.1	Régulation de la Transcription :	43
1.3.2.3.2	Régulation de l'épissage des pré-ARNm :	43
1.3.2.3.3	Transport et traduction des ARNm :	45
1.3.2.3.4	La séparation de phase liquide-liquide de HNRNPA1 (SPLL) :	46
1.3.3	<i>HNRNPA1</i> : deux isoformes avec des différences	48
1.3.3.1.1	Le dilemme de HNRNPA1 : est-ce qu'il y a des différences importantes entre les deux isoformes ? 48	
1.3.3.2	<i>HNRNPA1</i> dans une évolution de saut d'exon.....	48
1.3.3.3	L'expression physiologique et distribution subcellulaire des deux isoformes	49
1.3.3.4	Structures secondaires des protéines intrinsèquement désordonnées (PID), une explication possible des différences.....	51
1.3.4	<i>HNRNPA1</i> dans la SLA	53
2	<i>Hypothèse/objectifs et contributions</i>	55
3	<i>Matériels et méthodes</i>	56
3.1	Anticorps maison spécificités	56
3.2	Identification des partenaires d'interaction de la hnRNP A1B.....	56
3.3	Information plasmides et construction	57
3.4	Culture Cellulaire et transfection	58
3.5	Lysat et immunoprécipitation	58
3.6	Immuno-buvardage.....	59
3.7	Immunofluorescence et <i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA)	59
3.8	Image, analyse et statistiques	60
3.9	Liste des transcrits.....	60
3.10	Immunoprécipitation à l'ARN	61
4	<i>Résultats</i>	62
4.4	hnRNP A1B interagit et co-localise avec des protéines motrices	62
4.4.1	hnRNP A1B interagit avec des protéines impliquées dans le métabolisme et transport de l'ARN.....	62
4.4.2	Validation des interactions pour la hnRNP A1B et leur localisation	65
4.4.3	Le motif acide-Y est-il une partie du mécanisme d'interaction de la hnRNP A1B et KLC1 ?	69
4.5	hnRNP A1B dans le contexte pathologique de la SLA : impact des mutations sur les interactions avec les protéines motrices	72
4.6	hnRNP A1B : une protéine de liaison à l'ARN.....	75
5	<i>Discussion</i>	78
5.1	HNRNPA1, des protéines des granules mRNP du transport dans les neurones.....	78
5.1.1	la hnRNP A1B une PLA des granules mRNP dans les axones.....	79
5.1.2	la hnRNP A1B dans le transport dendritique : hnRNP A1B, hnRNP U et Puralpha, un travail d'équipe ?	81
5.1.3	la hnRNP A1B, une possibilité d'adaptateur entre les granules mRNP et les protéines motrices.....	82

5.2	Les ARNm liés par la hnRNP A1B dans les granules mRNP, une réponse à divers stimuli.	87
5.3	L'implication de la hnRNP A1B dans la SLA	90
5.4	Les hnRNP comme biomarqueur.....	94
5.5	Limites de l'étude	95
6	<i>Conclusion et perspectives</i>	96
	<i>Annexes</i>	97
	<i>Bibliographie</i>	98

Liste des figures

Figure 1. Les caractéristiques motrices de la SLA.....	18
Figure 2. Gènes associés à la SLA depuis 1994 à nos jours.....	19
Figure 3. Schémas des voies cellulaires dans la pathologie induite par TDP-43.	23
Figure 4. Schémas du transport neuronal des ARNm.	29
Figure 5. Les événements liés au transport/traduction locale de l'ARNm qui peuvent participer dans les maladies neurodégénératives.	33
Figure 6. Les isoformes codantes de HNRNPA1.....	42
Figure 7. Les multiples fonctions cellulaires de hnRNP A1.....	47
Figure 8. Mutations de la hnRNP A1B dans la SLA.....	54
Figure 9. hnRNP A1B lie des partenaires d'interaction n'ayant jamais été répertoriées pour hnRNP A1 auparavant.....	63
Figure 10. Les partenaires d'interaction de hnRNP A1B sont impliqués dans le métabolisme de l'ARN, le transport dépendant du cytosquelette et dans l'inflammation.	64
Figure 11. hnRNP A1B interagit avec des protéines de la machinerie du transport dans un contexte indépendant à l'ARN.....	67
Figure 12. hnRNP A1B co-localise en proximité avec les protéines motrices dans les neurites.....	68
Figure 13. Identification du motif Y-acide dans HNRNPA1.....	69
Figure 14. Le motif Y-acide est non fonctionnel dans HNRNPA1.....	71
Figure 15. Expression des mutants SLA de la hnRNP A1B dans des cellules HEK293FT.....	73
Figure 16. Les mutants SLA de la hnRNP A1B ont potentiellement un impact au niveau des interactions avec les protéines motrices.....	74
Figure 17. La hnRNP A1B peut interagir avec des ARNm spécifiques au compartiment axonal.....	77
Figure 18. Modèle potentiel des granules de la hnRNP A1B impliqués dans le transport des granules mRNP.....	86
Figure 19. Analyse in-silico de HNRNPA1 : prédiction des motifs Morfs.....	86
Figure 20. Neurones SH-SY5Y différenciés dans des chambres microfluidiques.....	91
Figure 21. Modèle de régulation de la hnRNP A1B et son implication dans la SLA.....	92

Liste des tableaux

Tableau 1	. Les gènes associés à la SLA et leur voies cellulaires.....	20
Tableau 2	. Traitements visant autres voies cellulaires.....	27
Tableau 3	. Les divers hnRNPs de la famille hnRNP A/B	39
Tableau 4	. Site de phosphorylation prédit par NetPhos3.1 (146) dans l'exon 7B de la hnRNP A1B..	53

Liste des sigles et abréviations

ABL : Protéine tyrosine kinase Abl

ADN : Acide déoxyribonucléique

ANXA11 : *Annexin A11*

ARN : Acide ribonucléique

ARNh : ARN nucléaires hétérogènes

ARNm : ARN messenger

C9ORF72 : *Chromosome 9 open reading frame 72*

CLIP-Seq : Immunoprécipitation de réticulation UV suivi de séquençage (Cross-linking immunoprecipitation-sequencing)

DCTN1 : *Dynactin subunit 1*

DFT : Démence fronto-temporale

DYNC1H1 : *Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1*

EC : Élément conservé

ERA : Éléments riches en AU

ERA2 : Élément de réponse A2 de 21 nucléotides

ERA211 : Élément de réponse A2 de 11 nucléotides

ESE : Élément silencieux d'épissage exoniques

ESI : Élément silencieux d'épissage intronique

FMRP : Protéine de retard mental du X fragile

FUS : *Fused in sarcoma/translocated in liposarcoma (FUS/TLS)*

G3BP1 : *Ras GTPase-activating protein-binding protein 1*

G4C2 : Expansion de répétitions hexanucléotidiques GGGGCC

GS : Granules de stress

hnRNP : Ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)

hnRNP A1 : Ribonucléoprotéine hétérogène A1 nucléaire

hnRNP A1B : Ribonucléoprotéine hétérogène A1B nucléaire

IF : Immunofluorescence

IP : Immunoprécipitation

KIF5 : *Kinesin-1*

Klc1 : *Kinesin lighth chain 1*

LCD : Domaine de faible complexité (*Low complexity domain*)

LCR : Liquide céphalo-rachidien
M9 : Séquence médiate du transport nucléocytoplasmique
MA : Maladie d'Alzheimer
mGluR5 : Récepteur métabotropiques du glutamate 5
miARN : microARN
MNK : *Mitogen-activated serine/threonine protein kinase*
MoRF : Région de reconnaissance moléculaire (*Molecular recognition features*)
MP : Maladie de Parkinson
MPT : Modification post-traductionnelle
mRNP : Assemblages macromoléculaires de ribonucléoprotéines et d'ARN
MT : Microtubule
Nf : Neurofilament
OAS : Antisense Oligonucleotides
PDR : Protéines dipeptidiques répétées
PID : Protéine intrinsèquement désordonnée
PK : Protéine kinase
PLA : Protéine de liaison à l'ARN
PRMT : Protéines arginine méthyltransférases
RE : Réticulum endoplasmique
RGG : Domaine de répétition Arg-Gly-Gly
RID : Région intrinsèquement désordonnée
RIP : Immunoprécipitation de l'ARN
ROS : Espèce réactive à l'oxygène
RRM : Motifs de reconnaissance de l'ARN (*RNA recognition motif*)
SEIR : Site d'entrée interne du ribosome
SLA : Sclérose latérale amyotrophique (*Amyotrophic lateral sclerosis; ALS*)
SLN : Signal de localisation nucléaire
SMA : Amyotrophie spinale
SMN : Motoneurone de survie
SNC : Système nerveux central
SPLL: Séparation de phase liquide-liquide
SSB : Cassures simple brin (*single-strand break*)
Tau : Protéine associée à la tubuline (Tubulin associated unit)

TDP-43 : *TAR DNA-binding protein 43* (gène *TARDBP*)

TNPO1/2 : *Transportin-1/2*

TRAF6 : *TNF receptor-associated factor 6*

TUBA4A : *Tubulin alpha 4a*

UBQLN2 : *Ubiquiline 2*

UP1 : Domaines RRM1 et RRM2 de HNRNPA1

UTR : Région non traduite (*untranslated region*)

VE : Vésicules extracellulaires

WB : *Western-Blott*

Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous? Telle est bien la beauté et la noblesse de la science : désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles.

- Marie Curie

Remerciements

Cette maîtrise fut un projet plein de défis professionnels et personnels ces deux dernières années. J'ai eu l'opportunité pour la première fois de mener un projet qui est devenue une fierté pour moi. Ceci m'a permis de me découvrir et nourrir ma passion pour les sciences. Je n'oublierai jamais la hnRNP A1B et comme sa chanson le dit, « c'était 52 acides aminés qui se sont fait démarquer ».

La réalisation de ce projet n'aurait pas été possible sans l'aide de personnes incroyables qui ont marqué ces deux dernières années, et je tiens à les remercier de tout cœur dans cette section.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon mentor Dre. Vande Velde qui a vu au-delà de mes notes et m'a offert ce projet incroyable de maîtrise. Elle m'a permis de me dépasser et de devenir enfin la scientifique dont j'ai toujours rêvé. C'est une scientifique et une femme incroyable dont les mots ne sont pas suffisants pour la décrire. Merci de tout cœur pour le support scientifique ainsi que personnel. Je peux dire aujourd'hui que grâce à vous, mon rêve de petite fille est devenu une réalité et que je suis une meilleure personne. Merci pour vos conseils et pour tous.

Ensuite, je tiens à remercier les membres de l'équipe du laboratoire, qui aujourd'hui, je peux non-seulement appeler collègues, mais aussi amis.

Premièrement, un merci tout particulier pour Dre Myriam Gagné, ancienne étudiante du laboratoire, qui commença ce magnifique projet sur la hnRNP A1B. Elle fut ma deuxième mentor et c'est grâce à elle que tout ce projet fut acheminé. Merci de m'avoir montré la définition de persévérance et merci pour ton support à travers ce projet. T'es une personne incroyable et sans toi, je ne serai pas la scientifique que je suis aujourd'hui. Ensuite, merci à Dre. Asmita Ghosh pour ta sagesse, les conversations scientifiques autour d'un verre de vin et les fous rires dans le laboratoire. Ça nous a pris par surprise savoir qu'on était voisines, mais ce fut le plus beau cadeau. Merci du fond de mon cœur pour ton support à travers les moments les plus difficiles. Après, je tiens à remercier Dre. Hana Fakim pour les anecdotes, conseille et fou rire tard le soir dans le laboratoire. Merci aussi d'être LA master du clonage et comme on disait toujours, « fake-it till you make it ». Aussi, merci infiniment à Alicia Dubinski pour tout ton support puis d'avoir cru en moi pendant les moments où j'en avais le plus besoin. Je suis certaine, tu finiras ce PhD d'une manière

excellente et j'ai hâte de te voir dans ton prochain chapitre. Tu es la meilleure et merci d'être mon amie.

Merci aussi à Mariam Choughari. Ça ne fait même pas un an que tu es arrivé au labo et j'ai le plaisir de te considérer *my partner in crime*. Ce PhD sera une aventure pour toi à Montréal et j'ai hâte à nos prochaines péripéties. Merci de tout cœur d'être mon amie. Finalement, merci à Sarah pour tes conseils et ton écoute et Jade pour son apport scientifique et support. Sans vous cette maîtrise aurait été bien plus difficiles.

Je suis reconnaissant envers le CRCHUM et les différentes plateformes pour leur soutien. Je tiens à remercier chaleureusement Aurélie de la plateforme d'imagerie pour son soutien précieux avec la microscopie. Merci à tous les collaborateurs qui ont contribué à l'avancement du projet. Merci à mon parrain Dr. Zenklusen pour les conseils et l'encadrement. Merci au jury d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire. Je remercie les organismes qui ont financé le projet ; ALS Canada et ALS Association.

Ramon, mon partenaire, merci du fond de mon cœur pour ton support et amour inconditionnel. Sans toi cette fin de maîtrise n'aurait pas été possible. Merci pour ton talent culinaire et ta folie. « *Contigo la vida es mas sabrosa.* » Je t'aime de tout mon cœur.

Finalement, merci à ma famille, sans vous mon rêve à Montréal n'aurait pas été faisable. Papa, je remercie tellement à la vie de nous avoir donné une chance de plus pour que tu puisses être là et me voir accomplir mes rêves. Merci, ma chère maman, pour m'avoir appris tout ce que je sais jusqu'à aujourd'hui. T'es la personne la plus forte et celle que j'admire le plus. Ma sœur, merci de m'avoir accompagné ces dernières années à Montréal, hâte de te retrouver.

Merci à toutes les personnes incroyables qui font partie de ma vie et ont contribué à cet accomplissement puis, faire de moi la personne que je suis aujourd'hui.

Introduction

1.1 La sclérose latérale amyotrophique (SLA)

1.1.1 Définition et incidence

La maladie neurodégénérative SLA se caractérise principalement par une dégénérescence des neurones moteurs, menant à une perte de motricité progressive jusqu'à la paralysie (1). Jean-Martin Charcot, un médecin-neurologue, fut le premier à caractériser et identifier cette maladie qui est connue aussi aujourd'hui sous le nom maladie de Charcot (2). Les patients décèdent principalement dus à une défaillance respiratoire dans les 3-5 ans qui suivent le diagnostic. Au Canada, approximativement 3000 personnes vivent actuellement avec la SLA. De plus, en moyenne par an, 1000 Canadiens sont diagnostiqués, ainsi que décédés par cette maladie terminale (3). En Europe et aux États-Unis, en moyenne, 2 personnes sur 100,000 vivent avec la maladie. C'est donc considéré une maladie rare, mais avec une fatalité rapide.

D'une autre part, dans la pathologie, environ 90% des cas de SLA sont sporadiques, et 10% sont familiaux, c'est-à-dire que dans la majorité des cas la cause est méconnue (4). On nomme sporadique les cas de patients dont leur histoire familiale ne présente aucune trace de SLA. De plus, de nombreux facteurs de risque peuvent être impliqués dans la forme sporadique, incluant des facteurs environnementaux et alimentaires (ex. : cigarette) (5). Cependant, les facteurs de risque sont difficilement étudiés et répertoriés (6). En ce qui concerne la SLA familiale, celle-ci est causée par une/des mutation(s) génétique(s) qui est généralement transmise selon un mode autosomique dominant mendélien (4). D'ailleurs, plusieurs mutations retrouvées dans le type familial sont retrouvées aussi dans le type sporadique (4). En effet, aujourd'hui dans la littérature, une multitude de protéines mutées ont été répertoriées dans la maladie de la SLA, notamment des mutations dans des protéines liant l'ADN et l'ARN (TARDBP, hnRNP A1, FUS, etc.) (7).

Finalement, la maladie touche généralement les personnes âgées d'environ 60 ans, tandis que le début de la maladie dans les cas familiaux peut débuter jusqu'à une décennie avant (3). Néanmoins, il est complexe de différencier le début de la pathologie vs le début des symptômes cliniques. En effet, au début de la dégénérescence, l'ensemble des neurones moteurs peut compenser la perte de fonction des premiers neurones qui décèdent. Ainsi, ceci montre l'importance du diagnostic précoce qui n'est malheureusement pas possible actuellement.

1.1.2 Les types de SLA et leurs symptômes

La SLA est considérée une maladie complexe dont l'une des problématiques principales est l'hétérogénéité dans les symptômes cliniques (forme bulbaire *vs* forme spinale) ce qui rend le diagnostic complexe (4). En effet, les sous-ensembles cliniques de SLA sont classifiés selon l'atteinte du type de groupes de neurones moteurs et des différentes régions du corps affectées. Par exemple, dans les différents groupes de neurones moteurs, il existe trois possibilités dans la SLA. Tout d'abord, les patients peuvent avoir une atteinte prédominante au niveau des neurones moteurs supérieurs ou au niveau des neurones moteurs inférieurs ou une combinaison des deux (Figure 1). Néanmoins, lors de la progression de la maladie, les deux types de neurones moteurs finissent par être affectés (8). Ainsi, elle est présentée sous deux formes principales, la forme spinale retrouvée dans 70% des cas de SLA et la forme bulbaire, retrouvée dans 30 % des cas (9).

Premièrement, la forme spinale débute par une sensation de faiblesse d'une partie d'un membre, accompagnée de fasciculations (8). Quant à la forme bulbaire, celle-ci débute par l'atteinte des muscles de la bouche qui se traduit par un problème d'articulation ou de prononciation de certains mots. Le patient présente aussi des problèmes moteurs au niveau de la langue, ce qui rend difficile leur alimentation et abouti à une espérance de vie plus courte (8). Même si la forme spinale est plus présente, lors de la progression de la maladie, la forme spinale développe une progression de type bulbaire. De plus, les deux formes atteignent les neurones moteurs supérieurs et inférieurs (9).

Néanmoins, un point important à soulever est que cette maladie ne se manifeste pas seulement au niveau moteur chez les patients. Au cours des dernières années, il a été constaté qu'elle chevauche cliniquement, pathologiquement et génétiquement avec plusieurs autres troubles dégénératifs. L'un de ces troubles est la démence fronto-temporale (DFT) parce que dans certains cas de SLA la perte de neurones moteurs peut s'accompagner d'une perte de neurones corticaux dans le cortex frontal et temporal (10). Cela se traduit chez les patients par une altération au niveau du jugement et les capacités exécutives, entraînant souvent des troubles du comportement. Environ 20 % des patients atteints de SLA remplissent les critères cliniques d'un diagnostic de DFT, mais jusqu'à 50 % des patients présentent des troubles cognitifs (10).

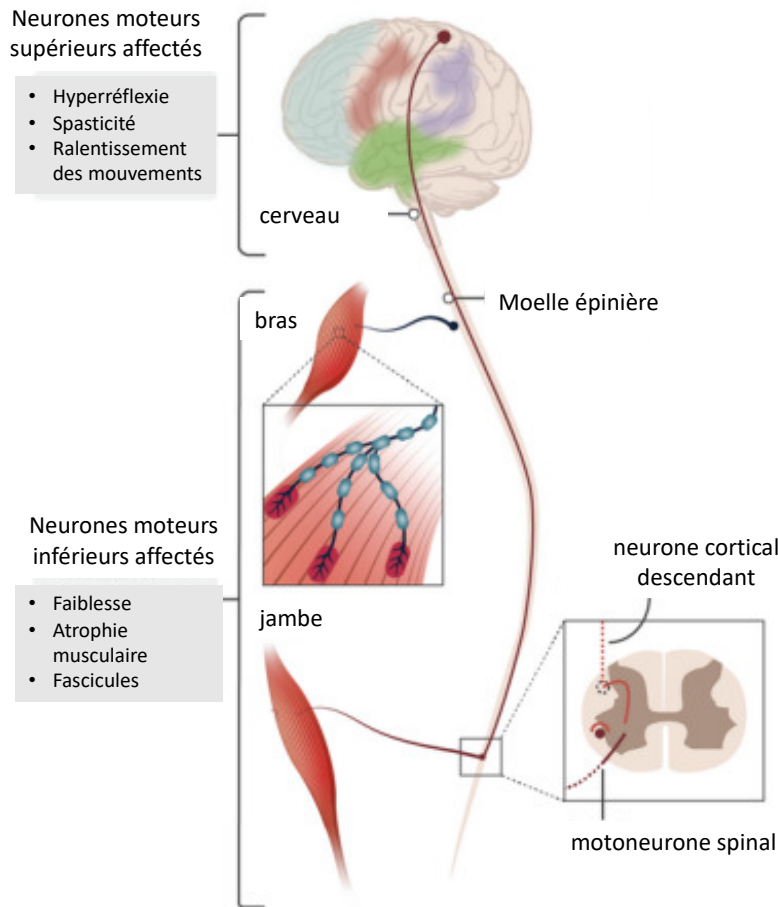


Figure 1. Les caractéristiques motrices de la SLA.
(Modifié de Masrori, P., & Van Damme, P. (2020). (11))

1.1.3 Une diversité de gènes impliquée dans la SLA

La complexité de la maladie de la SLA provient notamment du manque d'homogénéité dans les phénotypes de SLA. Ceci engendre une compréhension incomplète des mécanismes moléculaires conduisant à la maladie. Aujourd'hui, grâce aux avancées technologiques dans le domaine du séquençage, une multitude de gènes ont pu être associés à la maladie de la SLA depuis sa première description par Charcot (7). Ainsi, une diversité de gènes (Figure 2) avec des mutations ont été répertoriés dans le contexte pathologique, ce qui au fur et à mesure aide à élucider la SLA (6).

Tout d'abord, le premier gène qui fut associé à la SLA est la superoxyde dismutase (SOD1) en 1993 (12). Cette identification a permis de souligner que, cette enzyme anti-oxydante, existe sous-différentes formes mutées dans la maladie. De nos jours, environ 170 mutations ont été associées avec un lien de causalité avec la SLA. En effet, celles-ci causent un gain de propriété toxique et/ou

perte de fonction de la protéine, modifiant ainsi sa fonction protectrice contre les espèces réactives de l'oxygène, et donc, le maintien de l'homéostasie cellulaire.

D'ailleurs, cette première association génétique a permis l'ouverture à la recherche de l'implication d'autres gènes dans la pathologie. En effet, depuis cette découverte, environ une quarantaine de gènes mutés ont été associés à la maladie, expliquant ainsi, certains cas familiaux (25-35%) et aussi sporadiques (5-10%) (7). Ces gènes à risque peuvent être associés à différentes voies biologiques clés (Tableau 1) comme, la neuroinflammation, transport axonal, réparation à l'ADN, métabolisme de l'ARN, etc. De plus, il y a quatre gènes modifiés qui prédominent dans les cas familiaux de la SLA : *C9orf72*, *SOD1*, *FUS* et *TARDBP*. Une revue de littérature sur la génétique de la SLA, publiée en 2019 (13), discute l'importance de ses gènes dans la pathologie :

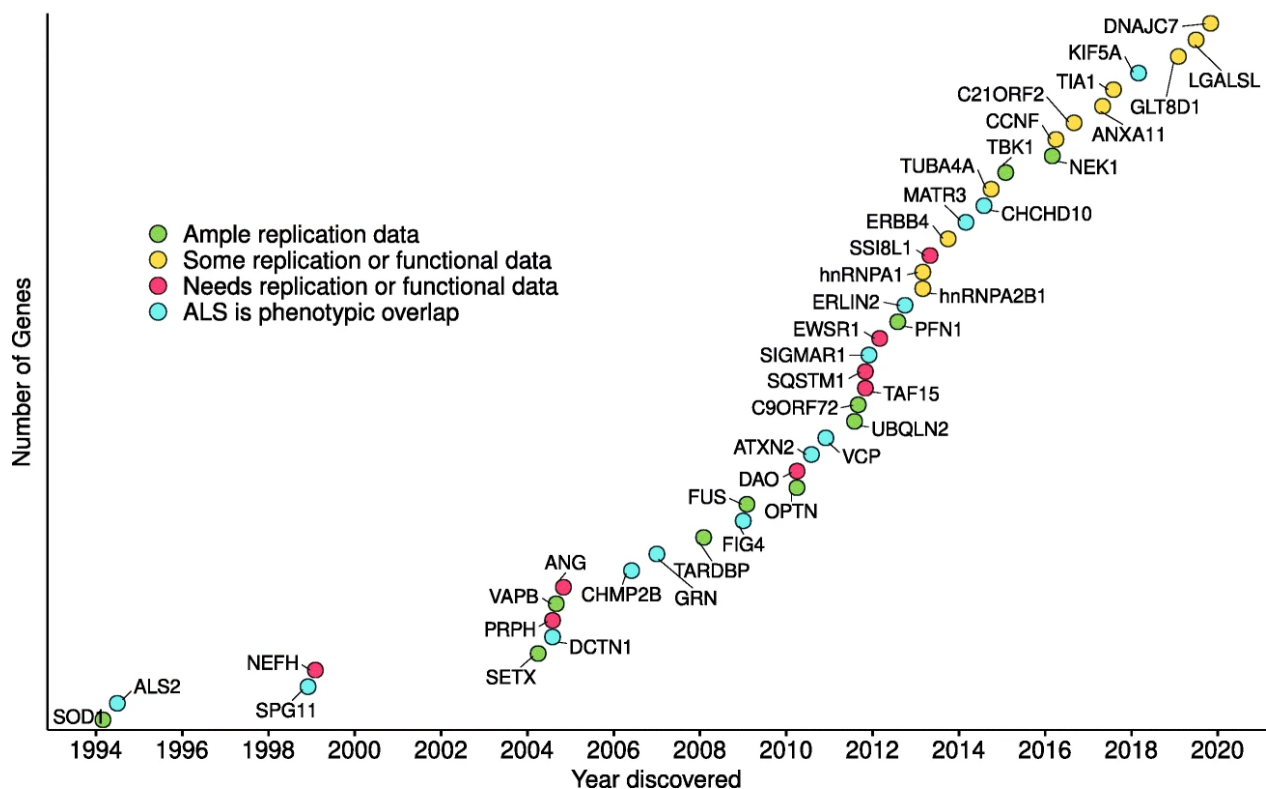


Figure 2. Gènes associés à la SLA depuis 1994 à nos jours
(Modifié de Gregory, J.M., Fagegaltier, D., Phatnani, H. et al.2020 (7))

Tableau 1. Les gènes associés à la SLA et leurs voies cellulaires
(Inspiré de Mead, R.J., Shan, N., Reiser, H.J. et al. 2023 (14))

Voie cellulaire	Gènes mutés dans la SLA
Neuroinflammation	<i>TBK1, OPTN, C9orf72, UBQLN2</i>
Fonctionnement des mitochondries	<i>CHCHD10, VCP, TBK1, SOD1</i>
Transport nucléocytoplasmique	<i>FUS, TARDBP, C9orf72</i>
Transport vésiculaire	<i>SPG11, VABP, ALSN2, FIG4, CAV1, OPTN, NEK1</i>
L'homéostasie des protéines, Stress du réticulum endoplasmique	<i>TIA1, DNAJC7, C9orf72, SQSTM1, CCNF, TARDBP, CHMP2B, VCP, UBQLN2, OPTN, SOD1, SIGMARI, FUS, VABP</i>
Réparation à l'ADN	<i>FUS, C21orf2</i>
Métabolisme de l'ARN	<i>HNRNPA1, TARDBP, UBQLN2, ATXN2, FUS, SEXT, ANG, MAT3, C9orf72</i>
Axonopathie	<i>ALS2, ANXA11, SIGMARI, FIG4, VAPB, TUB4A, SQSTM1, PRN1, CCNF, SPG11, KIF5A, KANK1, C21orf2, OPTN</i>

1.1.3.1 Cadre de lecture ouvert 72 du chromosome 9 (C9ORF72)

Le gène *C9ORF72*, code pour une protéine, de fonction inconnue, qui semble cytoplasmique et potentiellement localisée dans les synapses des neurites (15, 16). De plus, les transcrits sont exprimés dans la plupart des tissus, et notamment dans toutes les régions du cerveau et la moelle épinière chez l'humain (17). En effet, le gène, dans certains cas de SLA, possède une mutation massive d'expansion de répétitions hexanucléotidiques GGGGCC (G4C2) dans l'intron 1 (17). En effet, dans des conditions non pathologiques, cette expansion peut aller jusqu'à environ 30 répétitions. Cependant, chez les patients atteints de cette pathologie, plus de 70 répétitions sont retrouvées dans le gène (17).

Jusqu'à aujourd'hui, il n'y a pas de compréhension globale sur la raison pour laquelle ces répétitions causent/favorisent la maladie, mais il y a quelques hypothèses importantes à discuter. Tout d'abord, une étude (18) a montré que ces répétitions peuvent être transcrites et interagir avec

des protéines de liaison à l'ARN, rendant ainsi, moins disponible la machinerie de traitement de l'ARN. Globalement, les transcrits (G4C2) plus longs forment potentiellement des *foci* d'ARN neurotoxique dans les cellules.

Ensuite, au niveau protéique, une étude (19) a montré l'importance de la traduction, des transcrits avec les répétitions, en cinq protéines dipeptidiques répétées (PDR) différentes appelées "polyGA", "polyGP", "polyGR", "polyPA" et "polyPR". En effet, il est connu dans la littérature que ces protéines sont retrouvées sous forme d'agrégats dans les motoneurones. Néanmoins, il y a encore un manque de compréhension dans le mécanisme d'action de ces protéines sur la progression de la maladie.

1.1.3.2 La protéine de liaison à l'ARN fusion dans le sarcome (FUS)

Un autre gène répertorié dans la littérature de la pathologie de la SLA est le gène *FUS*, qui code pour la protéine de liaison à l'ARN fusion dans le sarcome. Celui-ci possède diverses fonctions dans le métabolisme de l'ARN, la réparation à l'ADN, transports des ARNm, etc. (20) Dans le contexte non pathologique, la protéine est localisée principalement dans le noyau des neurones et cellules gliales.

Néanmoins, dans le contexte pathologique de la SLA, *FUS* peut porter des mutations dans sa séquence de localisation nucléaire (21, 22). En effet, ces mutations, engendre une délocalisation et accumulation de la protéine dans le cytoplasme des neurones. Il y a donc, soit une perte de fonction nucléaire ou un gain de fonction cytoplasmique, mais les mécanismes spécifiques contribuant à la pathologie ne sont pas globalement caractérisés.

Entre autres, concernant la contribution de *FUS* à la pathologie, une étude (23) a montré que *FUS* muté pouvait incorporer les granules de stress dans le cytoplasme (Organite dépourvu de membrane qui favorise la survie de la cellule sous condition de stress). En effet, cette incorporation modifie la réponse des granules de stress et contribue donc au dysfonctionnement des motoneurones. Il est connu dans la littérature que la modification de la réponse des granules de stress participe à la pathogenèse de la SLA (24).

D'une autre part, au niveau de ses fonctions dans le métabolisme de l'ARN, une étude (25) a montré que les mutations de la SLA diminuent la liaison à la chromatine de *FUS* et peuvent donc potentiellement entraîner une perte de fonction de *FUS* nucléaire. En effet, *FUS* joue un rôle dans la régulation de la transcription en se liant à la chromatine active.

Finalement, au niveau de sa fonction dans la réparation à l'ADN, une étude (26) a montré que FUS participe à la réparation des cassures simples brins (SSB) dans le génome grâce au recrutement de XRCC1/ADN Ligase III α (LigIII). Les mutations SLA dans FUS induisent donc, une accumulation de lésions oxydatives de l'ADN ainsi qu'un déficit de réparation de l'ADN.

1.1.4 Un point commun : la protéinopathie de la protéine 43 de liaison à l'ADN (TDP-43 ou TARDBP) de la réponse à la transactivation (TAR)

1.1.4.1 La déplétion nucléaire de TDP-43 et son agrégation dans les neurites.

Un fait irréfutable de la maladie est que celle-ci implique une armée de protéines et gènes. Elle présente une hétérogénéité entre les patients, ce qui rend difficile d'imaginer la possibilité de trouver un point commun entre toute cette divergence. Néanmoins, il est connu dans les maladies neurodégénératives qu'il y a souvent des caractéristiques histopathologiques en commun dues à l'accumulation d'inclusions/agrégats protéiques (27). Par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, un signe distinctif de cette maladie dans le cerveau est l'accumulation de plaques amyloïdes (agrégat de β -amyloïde, A β) et d'enchevêtrement neurofibrillaire (agrégat de tau hyperphosphorylée) (28). En effet, le signe distinctif de la SLA est la déplétion nucléaire de la protéine 43 de liaison à l'ADN de la réponse à la transactivation (TDP-43), accompagnée d'une ubiquitination et une hyperphosphorylation qui entraîne le dépôt de la protéine dans des corps d'inclusion (29). Cette mauvaise localisation est observée dans 97 % des cas de la SLA et 45 % des cas de DFT (30).

Tout d'abord, TDP-43 est un acteur majeur du métabolisme de l'ARN. Cette protéine, qui se lie à l'ADN et à l'ARN, joue un rôle crucial dans la régulation du traitement de l'ARN, notamment la transcription, l'épissage et la traduction (31). Elle est localisée dans le noyau des cellules, où elle contribue à maintenir l'homéostasie de l'ARN et le bon fonctionnement cellulaire. Cependant, dans la SLA, la TDP-43 est mal localisée et forme des agrégats dans le cytoplasme des neurones affectés (32). Une fois de plus, la littérature considère que TDP-43 contribue à la pathologie soit par une perte de fonction nucléaire ou un gain de fonction toxique dans le cytoplasme. En outre, les dernières années, cette protéine fut amplement étudiée, ce qui permit de comprendre davantage l'impact des agrégats dans la pathologie (1, 7).

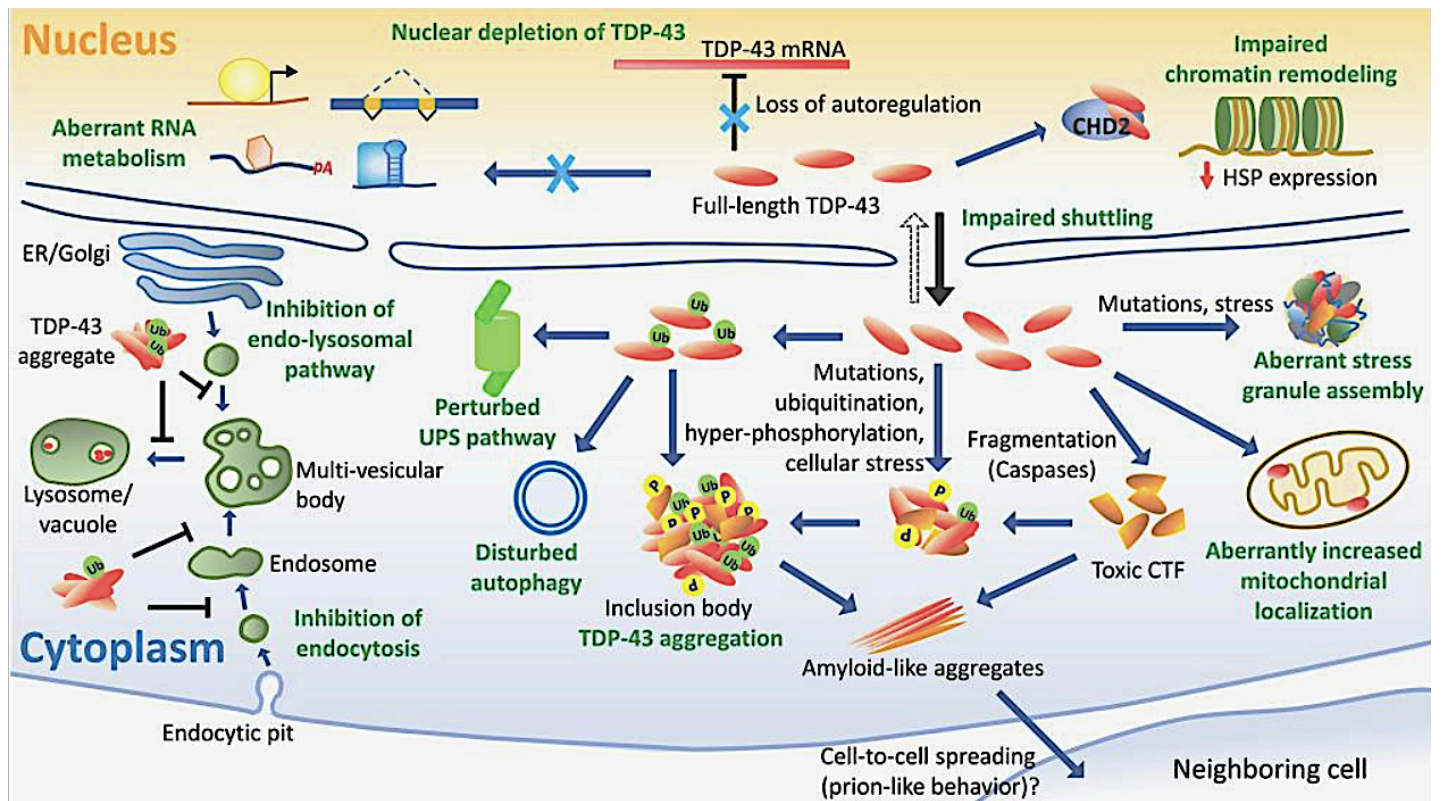


Figure 3. Schémas des voies cellulaires dans la pathologie induite par TDP-43.
 (Leibiger, C., Deisel, J., Aufschnaiter, A., Ambros, S., Tereshchenko, M., Verheijen, B. M., Büttner, S., & Braun, R. J. (2018). (33))

1.1.4.1.1 Perturbation du métabolisme de l'ARN (34-36) :

En premier lieu, TDP-43 est connue pour son implication dans la régulation du traitement de l'ARN. Cependant, dans la SLA, les agrégats de TDP-43 rendent indisponibles les molécules de TDP-43 fonctionnelles et d'autres protéines de liaison à l'ARN. Cette séquestration entraîne la perte de la fonction nucléaire de TDP-43, ce qui affecte ainsi le métabolisme de l'ARN. En effet, une mauvaise régulation de l'épissage alternatif et une altération du transport de l'ARN peuvent entraîner la production d'espèces d'ARN aberrantes et la mauvaise localisation de molécules d'ARN essentielles dans le neurone. Cela peut contribuer donc à la dégénérescence des neurones.

1.1.4.1.2 Dysfonctionnement du contrôle de la qualité des protéines (32, 37-39) :

Ensuite, les agrégats de TDP-43 peuvent également interférer avec la machinerie cellulaire responsable du contrôle de la qualité des protéines, y compris le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie. Ces agrégats peuvent séquestrer d'autres protéines et les empêcher de remplir leurs fonctions normales. En outre, l'accumulation de protéines mal repliées ou agrégées peut échapper les voies de dégradation des protéines, entraînant l'accumulation d'agrégats de protéines toxiques. Cette altération des mécanismes de contrôle de la qualité des protéines contribue au stress et au dysfonctionnement des neurones.

Il existe diverses études décrivant comment TDP-43 contribue à ce dysfonctionnement. Par exemple, une étude (39) a montré que la déplétion nucléaire de TDP-43 induit une translocation nucléaire du facteur de transcription EB (FTEB), le régulateur principal de la biogenèse lysosomale et de l'autophagie. Ceci augmente la biogenèse autophagosomale et lysosomale. Aussi, la perte de TDP-43 inhibe la fusion des autophagosomes avec les lysosomes par la régulation à la baisse de la dynactine 1, ce qui a conduit à l'accumulation de vésicules autophagiques immatures.

1.1.4.1.3 Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydatif (40-42) :

De plus, l'accumulation de TDP-43 peut altérer la fonction mitochondriale, entraînant une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et un stress oxydatif. L'accumulation de ROS peut endommager les protéines, les lipides et l'ADN, entraînant un dysfonctionnement cellulaire et la dégénérescence des neurones.

En effet, une étude a montré (42) que la TDP-43 s'accumule dans les mitochondries des neurones chez les sujets atteints de SLA ou DFT. Ensuite, TDP-43 se lie aux transcrits codant pour les sous-unités ND3 et ND6 du complexe respiratoire I, altèrent leur expression et provoquent spécifiquement le désassemblage de ce complexe.

1.1.4.1.4 Neuroinflammation:

Puis, les agrégats de TDP-43 sont également connus pour déclencher une réponse inflammatoire dans le système nerveux (43). La présence d'agrégats anormaux peut activer les cellules gliales, entraînant la libération de cytokines pro-inflammatoires et d'autres molécules qui favorisent la neuroinflammation. La neuroinflammation chronique peut contribuer aux lésions neuronales et à la progression de la maladie. En effet, il existe une diversité de mécanismes répertoriés dans la littérature (43) décrivant l'implication de TDP-43 dans la neuroinflammation de la pathologie de la SLA.

1.1.4.1.5 Mutations

Finalement, de nombreuses mutations dans le gène TARDBP ont été identifiées comme étant associées à la SLA et la DFT (44). Ces mutations favorisent, entre autres, la déplétion nucléaire et l'agrégation dans le cytoplasme de la protéine TDP-43 (29). Cependant, jusqu'à aujourd'hui, il existe des lacunes au niveau de mécanismes pathologiques spécifiques associés aux mutants TDP-43.

1.1.5 Les traitements et biomarqueurs disponibles

1.1.5.1 Les traitements disponibles/essais cliniques.

La pathogenèse de la SLA, comme discuté précédemment, implique une interaction complexe de différents facteurs et de voies cellulaires (14). Notamment, il peut y avoir la présence du stress oxydatif, des perturbations des fonctions mitochondriales et protéiques, des altérations du métabolisme de l'ARN, des perturbations du transport axonal et des processus neuroinflammatoires... Donc, quelles sont les thérapies disponibles pour la maladie ?

Actuellement, trois composés pharmaceutiques sont autorisés et leur disponibilité varient selon les pays. Il s'agit du Riluzole, un inhibiteur du processus glutamatergiques (45), l'antioxydant Edaravone (46) et le phénylbutyrate de sodium/taurursodiol (AMX0035) (47). Ces médicaments agissent en ralentissant la progression de la maladie se traduisant par une prolongation de l'autonomie du patient et une augmentation modeste de la survie, généralement de plusieurs mois (47, 48).

1.1.5.1.1 Riluzole (45, 49, 50) :

Le Riluzole, approuvé en 2000, fut la première option thérapeutique accessible aux personnes diagnostiquées avec la SLA. Son objectif thérapeutique vise d'atténuer les effets toxiques, spécifiquement liés à l'activité excessive du glutamate. Les effets bénéfiques associés au riluzole proviennent de plusieurs mécanismes. Par exemple, il fonctionne comme un bloqueur des canaux sodiques dans les neurones présynaptiques, ce qui entraîne une réduction de la libération de glutamate dans la fente synaptique. En outre, il favorise la recapture du glutamate en activant les canaux du transporteur astrocytaire d'acides aminés excitateurs 2 (EAAT2).

1.1.5.1.2 Edaravone (46, 51) :

Après l'approbation initiale du Riluzole, l'introduction de nouveaux traitements contre la SLA a été retardé jusqu'en 2017, lorsque l'Edaravone a été approuvé par la FDA. Son objectif thérapeutique est de diminuer le stress oxydatif et de freiner la réponse neuroinflammatoire par la capture des radicaux libres.

1.1.5.1.3 Le phénylbutyrate de sodium/taurursodiol (AMX0035)(47, 52, 53) :

Plus récemment, un composé de deux médicaments (Phénylbutyrates de sodium et Taurursodiol), a été introduit sous la forme d'une association à dose fixe. Ce produit pharmaceutique a reçu l'approbation de la FDA et son utilisation est également autorisée au Canada en 2022. Puis, ces deux médicaments avaient déjà été approuvés auparavant individuellement pour des applications médicales.

En effet, Le phénylbutyrate de sodium est connu pour le traitement de troubles du cycle de l'urée (54), tandis que le taurursodiol est connu pour son traitement des troubles hépatiques et intestinales(55). Néanmoins, concernant la SLA, ces deux composés ont été identifiés comme des agents inhibiteurs de l'apoptose neuronale. Effectivement, leur action combinée vise à atténuer la mort des cellules neuronales et réduire le stress oxydatif en visant le stress dans le réticulum endoplasmique (RE) et le dysfonctionnement mitochondrial.

1.1.5.1.4 Autres traitements

Néanmoins, les médicaments actuels approuvés ont principalement comme cible l'atténuation du stress oxydatif et la toxicité. Par conséquent, l'exploration d'autres voies impliquées dans la maladie pourrait être favorable pour la découverte de nouveaux agents thérapeutiques capables d'améliorer l'efficacité du traitement de la SLA. En effet, aujourd'hui, plusieurs traitements en essais cliniques visent de cibler diverses voies dérégulées (Tableau 2).

De plus, les oligonucléotides antisens (OAS) sont aussi des traitements prometteurs pour la SLA. En effet, les OAS sont des oligonucléotides synthétiques qui peuvent se lier à des molécules d'ARNm spécifiques, entraînant leur dégradation et ainsi être un potentiel en tant que stratégie de traitement pour les maladies causées par des mutations monogéniques. Leur application peut donc être prometteuse pour les personnes atteintes de SLA qui ont des mutations génétiques spécifiques. Aujourd'hui, le seul OAS qui a été approuvé par la FDA est Tofersen ayant comme cible le gène

SOD1. Néanmoins, il existe autres molécules en essais cliniques telles que ION363 (*FUS*) et BI1B105 (*Atxn2*) (14).

En résumé, il reste un trajet à parcourir pour parvenir à une prise en charge complète de la maladie. Les traitements actuellement disponibles constituent un point de départ prometteur, mais ne font que ralentir la progression de la maladie. Par conséquent, il est essentiel d'augmenter l'efficacité des traitements existants et d'envisager de nouvelles possibilités thérapeutiques. Un facteur important visant à accomplir cet objectif est la découverte de biomarqueurs permettant, ainsi, le diagnostic précoce de la maladie.

Tableau 2. Traitements visant autres voies cellulaires
(Inspiré de Mead, R.J., Shan, N., Reiser, H.J. et al. 2023 (14))

Voie cellulaire ciblé	Traitements en essai clinique/préclinique
Neuroinflammation	Zilucplan Inhibiteur de C5 AldesleukinerIL-2 AcM IgG4 C1q AcM anti-ligand CD40 Bloqueur du CSF1R (BLZ-945) Pegcetacoplan Régulateur C3 Inhibiteur de RIPK1 (DNL-788) Masitinib Ibudilast
Fonctionnement des mitochondries	TUDCA tout seul
Transport nucléocytoplasmique	Inhibiteur de l'exportine-1 (BIIB-100)
L'homéostasie des protéines,	Trametinib Inhibiteur MAPK Activateur eIF2B (DNL-343) Bosutinib promoteur de l'autophagie Inhibiteur de l'Ataxine2

1.1.5.2 Les biomarqueurs

Dans le domaine de la recherche sur la SLA, il existe une demande importante d'identifier des biomarqueurs. Ceux-ci ont plusieurs fonctions essentielles, telles que le suivi de l'évolution de la maladie, l'établissement d'un pronostic et l'identification de cibles thérapeutiques potentielles. Plusieurs études ont été menées sur les biomarqueurs, mais seul un nombre limité ont fait surface jusqu'à présent. Le biomarqueur le plus prometteur est les neurofilaments (Nf) (56).

Tout d'abord, cette protéine est l'un des biomarqueurs sanguins le plus étudié. En effet, Les Nf sont des protéines principalement présentes dans les axones myélinisés. En cas de lésions neuronales ou axonales, les niveaux de Nf dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et dans le sang augmentent de façon significative (57, 58). Aussi, les études en cours visent à élucider les Nf comme moyen de surveillance des effets pharmacodynamiques des traitements et d'établissement d'une classification pronostique. D'ailleurs, des niveaux élevés de Nf ont des implications pronostiques négatives (59). Cependant, il est important de souligner que les niveaux de Nf ont tendance à rester relativement stables après l'apparition de la maladie, ce qui pose un problème quant à son utilisation comme marqueur pronostic du développement de la maladie (58, 60).

En outre, le dilemme des biomarqueurs dans les maladies neurodégénératives est que celles-ci se chevauchent cliniquement et pathologiquement à un certain degré entre elles. C'est ainsi, que depuis les dernières années, les études visent à identifier un panel de molécules pour le diagnostic et suivi. Un exemple de ceci est la considération des niveaux élevés de Nf et miRNA-181. Effectivement, une étude (61) suggère que les deux molécules, régulées à la hausse dans la SLA, corréleront avec un risque plus élevé de décès et progression de la maladie.

1.2 Le transport neuronal de l'ARNm

1.2.1 Définition

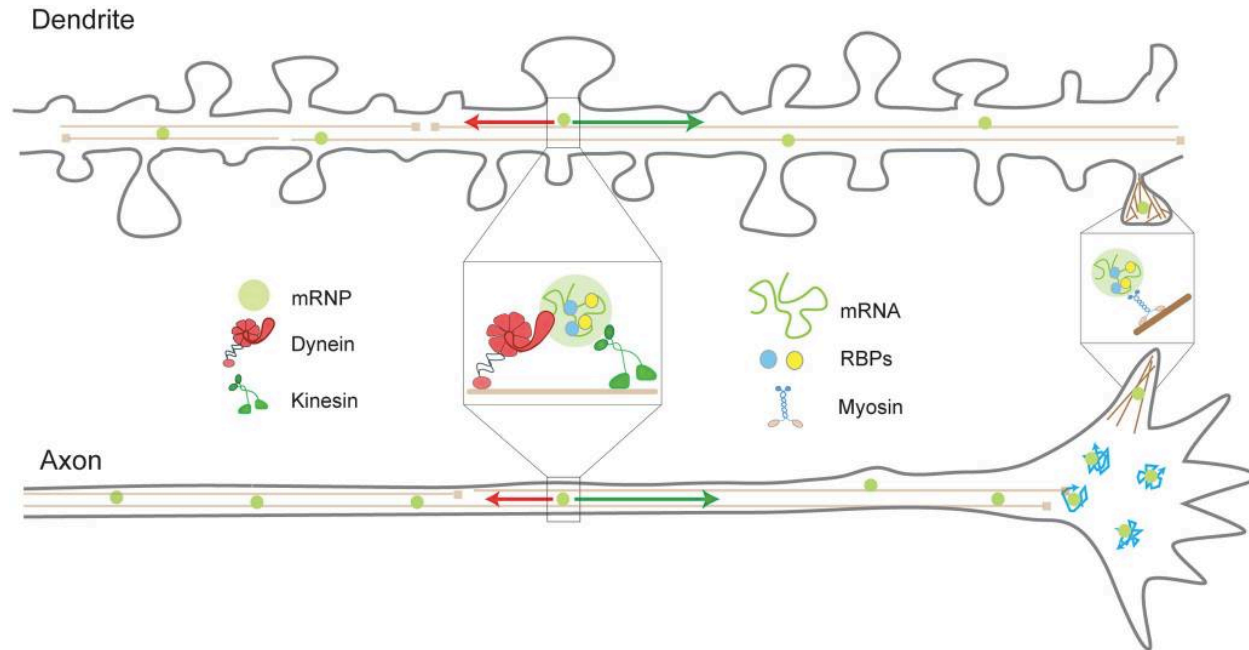


Figure 4. Schémas du transport neuronal des ARNm.

(Das, S., Singer, R. H., & Yoon, Y. J. (2019) (62). Numéro de licence pour utilisation d'image 5636060680872 RightsLink)

Le transport de l'ARNm neuronal est un processus cellulaire dans lequel les molécules d'ARN messager (ARNm) sont transportées à l'intérieur des neurones vers des compartiments subcellulaires spécifiques, tels que les dendrites et les axones (63). Ce processus est d'ailleurs essentiel pour la régulation spatiale et temporelle de la synthèse protéique dans les neurones (64). En effet, il permet le fonctionnement de processus indispensables à la survie neuronale, tels que la plasticité synaptique (65), le développement neuronal (66) et les réponses adaptatives aux stimuli (67). Toutefois, comment un neurone peut-il distribuer plus d'un millier d'ARNm différents dans leur compartiment subcellulaire respectif ? En effet, le transport de l'ARNm dans les neurones est orchestré par une machinerie moléculaire complexe (68).

Premièrement, au niveau des ARNm, des éléments de localisation, ou "zipcodes", dans leur région 3' non traduite (3'UTR) sont reconnus par des protéines de liaison à l'ARN (PLA) (69, 70). Ceci permet l'assemblage macromoléculaire de ribonucléoprotéines (mRNP) connu sous le nom, granules mRNP (Figure 4) (68). Les deux principaux types de granules d'ARN impliqués dans le transport de l'ARNm neuronal sont les granules de stress, formés en réponse au stress cellulaire, et les granules de transport, qui contiennent des ARNm destinés à des compartiments subcellulaires spécifiques (71). En effet, ces granules jouent un rôle crucial dans la régulation de la localisation et de la stabilité des ARNm. Une fois assemblés, ces complexes ARN-protéines peuvent interagir avec la machinerie du transport. Un exemple bien caractérisé est le granule mRNP de la β -actine (70), qui s'associe à la protéine 1 de liaison au zipcode (ZBP1/IGF2BP1) pour un transport et une localisation optimale.

Deuxièmement, une fois les granules mRNP assemblés, ils sont transportés le long du cytosquelette neuronal, grâce aux protéines motrices composées de la superfamille de la kinésine, de la dynéine et de la myosine (62, 72). En effet, les neurones ont divers compartiments qui ont des compositions du cytosquelette, des arrangements, des comportements de transport et des besoins différents. Dans les axones et les dendrites (composition cytosquelette majoritairement de microtubules, MT), le mécanisme prédominant du transport antérograde (vers les synapses) est assuré par les kinésines, en particulier le moteur KIF5 (67, 72). Ce transport est essentiel pour le déplacement de l'ARNm fraîchement synthétisé et diverses protéines, y compris les neurotransmetteurs, les précurseurs et les enzymes (73). D'autre part, les dynéines cytoplasmiques, qui sont des moteurs dirigés vers l'extrémité chargée négative, sont responsables du transport rétrograde, déplaçant les cargaisons vers le corps cellulaire dans les axones et les dendrites (62). Ce transport est essentiel pour le transport de métabolites cytotoxiques produits à l'extrémité de l'axon, ainsi que de protéines et d'organites anciens ou altérés destinés à être dégradés et recyclés, le tout se déplaçant vers le corps cellulaire du neurone (73). En revanche, les compartiments fonctionnels tels que les épines dendritiques et les terminaux présynaptiques possèdent faiblement de MT. En effet, ces compartiments possèdent plutôt des filaments d'actine et ce sont donc les myosines qui prennent en charge le transport bidirectionnel des granules mRNP grâce à leur interaction avec l'actine (Figure 4) (74).

Globalement, le transport bidirectionnel garantit que l'ARNm soit transporté vers des compartiments subcellulaires précis à l'intérieur du neurone.

1.2.2 Les dilemmes du transport des ARNm, plusieurs questions sans réponse

Jusqu'à aujourd'hui, les études visent de comprendre l'association entre les ARNm, les protéines de liaison à l'ARN (PLA) et les moteurs moléculaires. Cependant, les granules de transport présentent une complexité et une diversité importante, ce qui rend difficile leur caractérisation et compréhension. Une étude (62) faisant une vue d'ensemble du transport parle de certaines origines de cette problématique :

1.2.2.1 L'interaction ARN-PLA

La grande variété de PLA, capable de reconnaître l'ARN, complique l'établissement de règles bien définies régissant les interactions ARN-protéines (75). Une des hypothèses expliquant cela est l'hypothèse du "granule d'ARN" (76). En effet, celle-ci explique que les ARNm possèdent des séquences spécifiques qui sont reconnues par un ensemble distinct de PLA dans le noyau, et que la composition des granules mRNP évolue de manière dynamique au cours de leur trajet vers leur destination. De plus, il est important de souligner qu'une PLA peut se lier simultanément à plusieurs transcrits, ce qui complexifie davantage la caractérisation. Par exemple, la protéine de retard mental du X fragile (FMRP) et Staufen sont connues pour interagir simultanément avec plusieurs cibles d'ARNm (77, 78). Cette liaison simultanée est due au fait qu'une PLA possède divers domaines de liaison à l'ARN et ceux-ci sont indépendants. De plus, ceci peut influencer la stabilité, la localisation et la traduction de l'ARNm.

En résumé, chaque ARNm peut potentiellement engager un sous-ensemble spécifique de PLA, chacun avec des affinités variables, et où chaque PLA est partagée entre plusieurs transcrits. Cette interaction appuie donc la nature complexe du transport et de la régulation de l'ARNm dans les neurones.

1.2.2.2 L'interaction PLA-protéines motrices

Aujourd'hui, le mécanisme précis par lequel les PLA interagissent avec les protéines motrices n'est pas encore totalement élucidé. La littérature débat entre deux possibilités, soit les PLA peuvent interagir directement avec les protéines motrices ou soit indirectement par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice (62). Par exemple, une étude a montré une association directe entre la FMRP et la kinésine, suggérant que les transcrits liés à la FMRP ont la capacité d'être transportés (79). Par ailleurs, concernant la dynéine, des études ont montré que la dynactine (activateur de la dynéine) agit comme intermédiaire de liaison avec d'autres protéines (80).

1.2.2.3 Les complexes mRNP sont-ils dynamiques ? implication de la SPLL et des domaines intrinsèquement désordonnés.

Les granules mRNP sont formés par un phénomène connu sous le nom de séparation de phase liquide-liquide (SPLL). En effet, ce processus conduit à la formation de condensats présentant des propriétés de type liquide et ne possédant pas de membrane isolante du cytoplasme (81). Cette séparation de phase est initiée par l'établissement d'un réseau d'interaction dans les granules mRNP, tels que les interactions des régions riches en domaines intrinsèquement désordonnés de faible complexité (RID) des protéines associées aux granules de mRNP (82, 83). D'une autre part, due à l'absence d'une membrane, ces granules peuvent avoir un échange moléculaire avec le milieu environnant (81). Cette séparation de phase est sensible aux concentrations ioniques locales, et aux modifications post-traductionnelles (MPT) des composants des granules (84). Par conséquent, les granules de RNP ont la capacité de se remodeler, de se dissoudre et de se réassembler rapidement, ce qui montre un processus dynamique qui peut être notamment important lors de la réponse à des signaux externes.

Ces résultats soulignent donc l'importance de la régulation des granules mRNP pour la détermination de la localisation précise de l'ARNm pour l'expression des gènes neuronaux.

1.2.3 Le transport des ARNm dans les maladies neurodégénératives

Des défauts dans le traitement de l'ARN tels que la traduction, l'épissage et le transport ont été identifiés dans plusieurs troubles neurodégénératifs tels que la SLA, la démence fronto-temporale (DFT) la maladie de Huntington et la maladie d'Alzheimer (85). En effet, ces maladies présentent des caractéristiques pathologiques communes, notamment la mauvaise localisation et l'agrégation de protéines spécifiques dans les neurones (86). Aujourd'hui, diverses études ont permis d'élucider, à première vue, le lien du transport de l'ARNm dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives, révélant des mécanismes moléculaires complexes (Figure 5) qui constituent des cibles thérapeutiques potentielles.

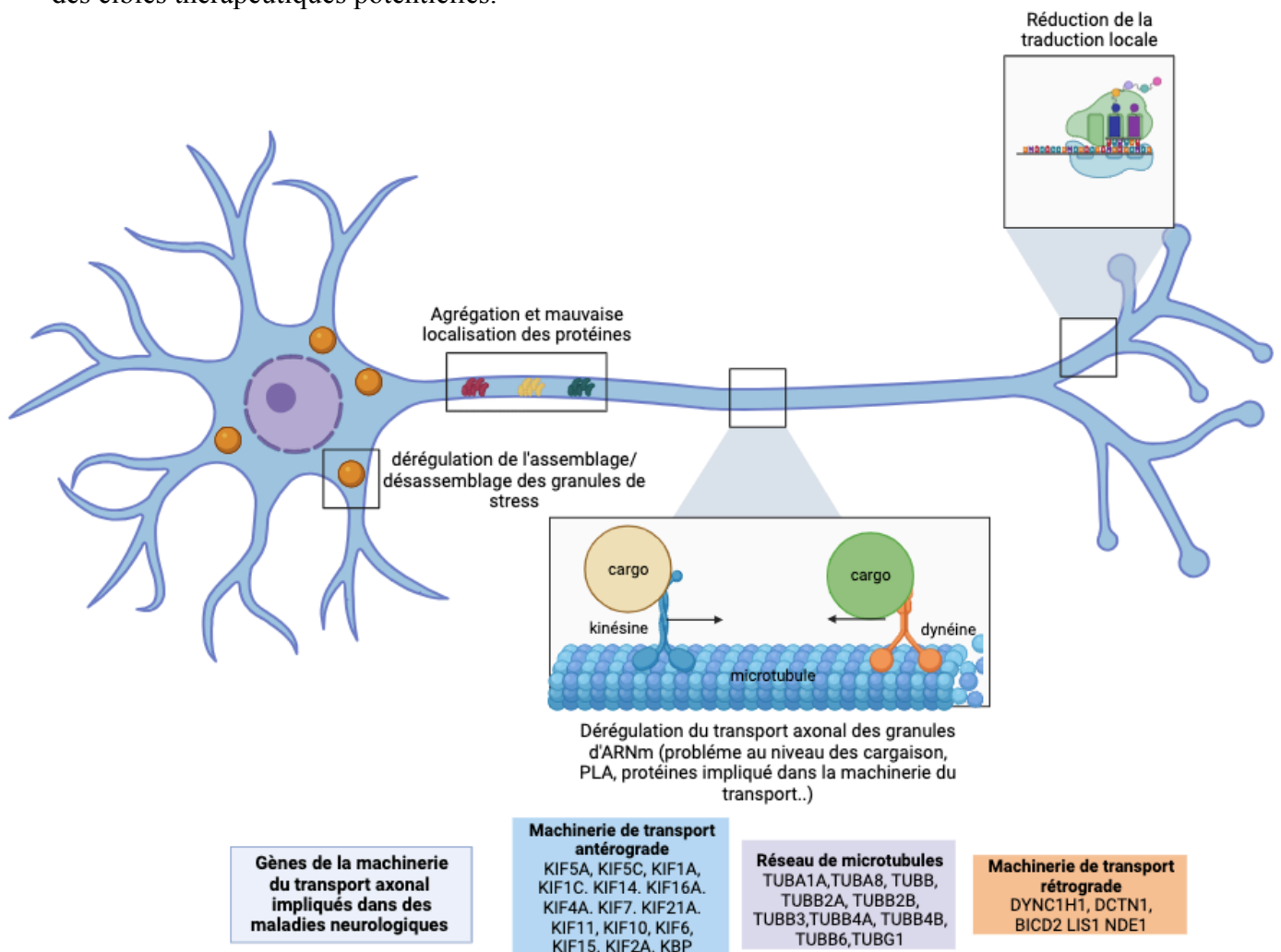


Figure 5. Les événements liés au transport/traduction locale de l'ARNm qui peuvent participer dans les maladies neurodégénératives.

(Figure conçue avec BioRender et inspiré de Sleight, J.N., Rossor, A.M., Fellows, A.D. *et al.* 2019 (87))

1.2.3.1 Mutations, agrégation et mauvaise localisation des protéines de liaison à l'ARN (PLA)

Tout d'abord, il existe un lien entre la dérégulation du transport de l'ARNm et des problèmes associés aux protéines de liaison à l'ARN (PLA) (86). En effet, dans le cas de la sclérose latérale amyotrophique (SLA)/Démence Frontotemporale (DFT), on observe des mutations et une mauvaise localisation des protéines de liaison à l'ARN, telles que TDP-43 et FUS. Dans des conditions basales, ces protéines se trouvent principalement dans le noyau cellulaire, mais dans certaines formes sporadiques et familiales de SLA, elles forment des agrégats anormaux dans le cytoplasme. De plus, il est connu que ces protéines sont impliquées dans une interaction dynamique entre le noyau et le cytoplasme, ce qui régule le transport et la traduction de l'ARNm (88).

Effectivement, les mutations et leurs déplétions nucléaires peuvent perturber le processus du transport des ARNm, bien que les mécanismes précis restent encore à comprendre. Entre autres, une étude (89) suggère que les granules d'ARNm contenant la TDP-43 mutants sont instables, ce qui entraîne une réduction du transport axonale antérograde. D'une autre part, une étude (90) a montré que FUS lie l'ARNm de Fos-B à l'intérieur des axones et que la surexpression de Fos-B par FUS SLA mutants est associée à une ramification axonale anormale. En effet, certaines mutations (ex : H517D) de la FUS, dans le contexte pathologique, se situent au niveau du signal de localisation nucléaire (SLN), ce qui aboutit à une augmentation de sa localisation cytoplasmique. En outre, plusieurs études suggèrent que la FUS et la TDP-43 régulent le transport et la traduction locale des protéines ribosomales dans les axones (91-93). En effet, une surexpression de la TDP-43 cytoplasmique ou FUS mutants présentent une diminution de la traduction globale des protéines dans les neurones, y compris les axones, ce qui suggère un mécanisme potentiel dans leur contribution dans la pathogenèse de la SLA/DFT.

En résumé, des dérégulations de PLA (Figure 5) peuvent potentiellement avoir des impacts au niveau du dynamisme des granules, des modifications au niveau de la traduction/transport de certains ARNm et des impacts au niveau de la morphologie axonale.

1.2.3.2 Mutations dans la Machinerie de Transport et les composants du cytosquelette

Le processus de transport des cargaisons le long des axones repose sur trois éléments fondamentaux : le réseau de microtubules, un moteur de kinésine ou le complexe rétrograde cytoplasmique dynéine-dynactine, et diverses protéines adaptatrices (72). Le transport axonal rétrograde nécessite de la dynéine cytoplasmique pour transporter un cargo, tandis qu'il existe plus

de 40 kinésines différentes pouvant participer au transport antérograde. En effet, plusieurs mutations affectant les gènes responsables du transport axonal ont été associées à diverses maladies du cerveau (Figure 5). Cela suggère un lien entre les déficits de transport axonal et les maladies neuronales (94).

Tout d'abord, au niveau de la machinerie du transport antérograde, plusieurs études ont montré que des mutations dans les kinésines sont impliquées dans diverses maladies neurodégénératives telles que la SLA (94). Un exemple de celles-ci sont les mutations retrouvées dans la chaîne lourde KIF5A, notamment dans sa région N-terminal et C-terminal. En effet, les mutations principalement situées dans le domaine moteur N-terminal influence l'activité de l'ATP et donc la fonction « moteur » de la kinésine (95). À l'inverse, les mutations associées à la SLA sont principalement situées dans le domaine C-terminal de la queue de liaison à la cargaison. Donc, les deux types de mutations agissent de façon différente, mais aboutissent tous les deux à un dysfonctionnement du transport antérograde dirigé par KIF5A (96).

D'une autre part, des mutations identifiées dans les gènes DCTN1 et DYNC1H1 (Figure 5) sont liées à une perturbation du transport axonal médié par la dynéine dans le contexte des maladies neurodégénératives (94). En effet, des mutations dans le gène DCTN1, qui code pour la dynactine, ont été associées à des maladies telles que la SLA, la maladie de Parkinson (MP), la maladie d'Alzheimer (MA) et la démence frontotemporale (DFT). Cependant, ces mutations ne possèdent pas un lien de causalité avec l'apparition des pathologies neurodégénératives, mais pourraient avoir un impact sur la prédisposition à la maladie chez les patients (97).

Puis, au niveau du cytosquelette, il existe plusieurs gènes qui ont été associés avec des maladies neurodégénératives (Figure 5) (98). Par exemple, dans la SLA, il y a une désorganisation des microtubules qui peut être attribuée à de multiples mutations ainsi qu'à des variantes rares de l'alpha-tubuline 4a, qui est codée par le gène TUBA4A. Ces variantes ont été identifiées comme ayant un lien de causalité possible de la SLA. En effet, des études soulèvent que celles-ci entraînent une déstabilisation du réseau de microtubules et perturbe sa capacité de polymérisation (99).

En résumé, les variations génétiques peuvent contribuer au dysfonctionnement des moteurs moléculaires et à la perturbation du cytosquelette dans les maladies neurodégénératives, ce qui pourrait potentiellement altérer le transport de l'ARNm au sein des neurones.

1.3 *HNRNPA1*

1.3.1 La famille hnRNPA/B

Les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP) ont été initialement identifiées comme des protéines associées aux ARN nucléaires hétérogènes (ARNh), d'où leur nomenclature (100). En effet, ces ARNm ont été identifiés comme des pré-ARNm et des ARNm épissés dans le noyau. Au niveau de leur fonction, elles jouent des rôles essentiels dans les processus du métabolisme de l'ARN, la stabilisation des ARNm pendant le transport cellulaire et exercent un contrôle sur leur traduction (101, 102). De nos jours, plus de vingt-cinq protéines hnRNP ont été identifiées avec des affinités variables pour les ARNh, dont certaines sont connues sous d'autres noms tels que FUS (*fused-in-sarcoma* ; hnRNP P2) (102).

Parmi les hnRNPs, on retrouve la sous-famille des protéines hnRNP A/B, composée de A1, A2/B1, A0 et A3 (Tableau 3). Ces protéines ont des rôles distincts dans le métabolisme cellulaire de l'ARN, mais sont regroupées dues à leur importante identité de séquences d'acides aminés (102). En effet, elles partagent une grande identité au niveau de leur domaine N-terminaux, mais leurs domaines C-terminaux diffèrent, ce qui conduit à des fonctions uniques dans l'homéostasie cellulaire (102, 103). Sur le plan structurel, les protéines hnRNP A/B se composent de deux motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM) en N-terminal et d'un domaine riche en glycine en C-terminal, souvent appelés, en raison de sa nature structurelle, domaine de faible complexité (LCD). Le LCD riche en glycine comprend une région à motif RGG (arginine-glycine-glycine), une séquence de localisation nucléaire M9 et une région intrinsèquement désordonnée (RID) (103). Cependant, quelle est leur importance dans le métabolisme de l'ARN ? Plusieurs vues d'ensemble (101, 102, 104, 105) dans la littérature décrivent en détail les fonctions connues de chaque protéine, en soulignant les différences importantes entre elles :

1.3.1.1 *hnRNP A2/B1*

Premièrement, les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes A2/B1, nommé hnRNPA2/B1, appartiennent à la famille des hnRNPs et sont exprimées dans divers tissus. Le gène *HNRNPA2/B1* peut être alternativement épissé en quatre isoformes distinctes nommées : hnRNP B1 (comprenant tous les exons), hnRNP A2 (excluant l'exon 2), hnRNP B1b (excluant l'exon 9) et hnRNP A2b (excluant les exons 2 et 9) (106) (Tableau 3). Dans les cellules humaines, les

hnRNPA2/B1 sont les isoformes prédominantes, mais la hnRNPA2b est exprimée en faibles quantités dans les cellules HeLa et SH-SY5Y (107).

De part et d'autre, au niveau de leurs fonctions, ces protéines de liaison à l'ARN (PLA) ont la capacité de lier l'ARN et des motifs d'ADN spécifiques. Ces diverses fonctions incluent la régulation de la transcription, le traitement de l'épissage, le transport de l'ARN, la stabilité et le contrôle de la traduction des ARN (102). En effet, la hnRNPA2/B1 utilise divers mécanismes pour achever ses fonctions cellulaires. Par exemple, au niveau du transport de l'ARN, il a été décrit que la hnRNP A2 participe au transport des ARNm qui possèdent l'élément de réponse A2 (ERA2) de 21 nucléotides ou son dérivé de 11 nucléotides (ERA211) (108). Ce processus complexe de transport de l'ARN par la hnRNPA2, impliquerait potentiellement un système complexe comprenant jusqu'à 35 composants moléculaires différents (109).

Finalement, des perturbations au niveau de l'expression et des mutations des hnRNP A2/B1 ont été associées au développement de nombreuses pathologies, dont divers types de cancers, des troubles neurodégénératifs et des maladies auto-immunes (105).

1.3.1.2 hnRNP A0

Ensuite, la hnRNP A0 semble être un ajout évolutif relativement récent à la famille des hnRNP A/B. Elle est codée dans un seul exon et serait issue d'une erreur de transcription inverse, suivie de son intégration dans le chromosome, ressemblant à un ARNm de type hnRNP A2 (110). Premièrement, au niveau de ses fonctions cellulaires, la hnRNP A0, comme d'autres hnRNPs, joue un rôle dans l'épissage alternatif. En effet, la hnRNP A0 a été identifiée avec d'autres hnRNPs (y compris d'autres protéines A/B) comme influenceur de l'épissage alternatif des protéines avec des régions intrinsèquement désordonnées (RID) (111). Les hnRNP A/B possèdent des RID, et l'épissage alternatif de A1 et A2/B1 régule l'expansion de leur région. Cette autorégulation est un thème commun aux protéines hnRNP (111).

Ensuite, la hnRNP A0 possède aussi un rôle dans la progression du cycle cellulaire et de l'apoptose. Par exemple, une étude (112) soulève que suite à un dommage à l'ADN, la MAPKAP kinase 2 (MK2), phosphoryle la protéine à la position sérine 84. Cette phosphorylation permet à la hnRNP A0 de se lier et de stabiliser l'ARNm d'arrêt de croissance et inducteurs de dommages à l'ADN 45 alpha (*Gadd45 α*), ce qui aboutit à un arrêt temporaire à la phase G2/M du cycle cellulaire.

1.3.1.3 *hnRNPA3*

Finalement, la hnRNP A3 est le membre le moins bien caractérisé de la famille des hnRNP A/B. Comme les autres membres de la famille des hnRNP A/B, la séquence d'acides aminés et le profil d'épissage de *HNRNPA3* sont très conservés entre l'homme et les rongeurs (113). En effet, ce gène *HNRNPA3* peut être épissé en quatre isoformes (tableau 3) mais leurs fonctions spécifiques ne sont pas bien comprises et caractérisées.

Cependant, étant donné sa similarité de séquence avec d'autres hnRNP de la famille, la hnRNP A3 devrait contribuer au métabolisme de l'ARN et à la régulation des gènes d'une manière similaire à celle des membres de sa famille. Bien que ces fonctions spécifiques ne soient pas bien répertoriées, des associations fonctionnelles ont été soulevées dans la régulation de la progression du cycle cellulaire et la régulation de la réponse aux stimuli immunitaires inné. Néanmoins, des études mécanistiques sont nécessaires pour caractériser davantage cette hnRNP (102).

1.3.1.4 *Le dilemme de la famille hnRNPA/B : la compréhension des distinctions entre les divers membres et leurs isoformes.*

Les protéines de la famille hnRNP A/B, remplissent des fonctions distinctes malgré leur homologie de séquences significatives, une architecture et des structures de domaines hautement conservées. Aussi, les protéines hnRNP A/B, à l'exception de la protéine A0, présentent diverses isoformes étroitement régulées et conservées au cours de l'évolution (102).

Tout d'abord, cela suggère que les différentes isoformes de ces protéines possèdent aussi des fonctions spécifiques distinctes. Par exemple, des études ont montré que la hnRNP A2 et la hnRNP B1 présentent des différences subtiles dans leur préférence pour les motifs de l'ARN (114) ce qui laisse entendre des fonctions distinctes potentielles. Cependant, la littérature se centre principalement sur l'isoforme prédominante hnRNP A2 exprimée dans la plupart des tissus. De plus, un autre couple d'isoformes, dont la distinction est peu élucidée dans la littérature, est la hnRNP A1 et la hnRNP A1B. Ce couple d'isoforme sera discuté dans la prochaine section. Mais, pourquoi leurs distinctions semblent être peu élucidées ?

En effet, jusqu'à aujourd'hui, il existe un manque de compréhension sur comment les domaines désordonnés participent aux interactions, les tendances à l'agrégation et les activités de liaison à l'ARN. Il existe donc un besoin nécessaire d'informations structurales, mais cela est

particulièrement difficile dû au manque de compréhension et caractérisation de leurs régions intrinsèquement désordonnées (RID) (115).

Tableau 3. Les divers hnRNPs de la famille hnRNP A/B
(Thibault, P. A., Ganesan, A., Kalyanamoorthy, S., Clarke, J. W. E., Salapa, H. E., & Levin, M. C. (2021). (102))

Protéine	Gène (Ensembl ID)	Isoformes (En ordre décroissant d'abondance)	N° (aa)
hnRNP A0	<i>HNRNPA0</i> (ENSG00000177733)	n/a	305
hnRNP A1	<i>HNRNPA1</i> (ENSG00000135486)	hnRNP A1 hnRNP A1-B	320 372
hnRNP A2/B1	<i>HNRNPA2B1</i> (ENSG00000122566)	hnRNP A2 hnRNP B1 hnRNP A2b hnRNP B1b hnRNP A2*	341 353 301 313 253
hnRNP A3	<i>HNRNPA3</i> (ENSG00000170144)	hnRNP A3 var 1 hnRNP A3 var 2 hnRNP A3 var 3 hnRNP A3 var 4	378 356 331 309

1.3.2 HNRNPA1, un gène de la famille hnRNP A/B

1.3.2.1 L'épissage alternatif de *HNRNPA1*

Le gène *HNRNPA1* peut être alternativement épissé en deux isoformes nommées la hnRNP A1 (320 aa, 34 kDa) et la hnRNP A1B (372 aa, 38 kDa) (116). La seule différence entre les deux isoformes est l'élongation de la région intrinsèquement désordonnée (RID) de la hnRNP A1B (inclusion de l'exon 7B, Figure 6) (102). Ces protéines font partie de la famille ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène A/B (hnRNP A/B) qui est reconnue pour son rôle dans l'épissage alternatif de diverses protéines avec des régions RID. De plus, cette famille est distinguée par l'autorégulation de leurs épissages respectifs. Effectivement, les deux isoformes de *HNRNPA1* possèdent un RID, et la hnRNP A1 est reconnue comme participante de son épissage alternatif (111).

Tout d'abord, il existe deux types de mécanismes de l'épissage alternatif de *HNRNPA1*, les mécanismes favorisant l'exclusion puis l'inclusion de l'exon 7B. D'abord, l'exclusion est principalement modulée grâce aux éléments conservés EC1a, EC4, des séquences introniques de chaque côté de l'exon 7B. En effet, la hnRNP A1, peut lier ces sites et converger les sites d'épissages distaux 5' et 3' pour former une boucle (Figure 6), et donc exclure l'exon 7B (116, 117). Ainsi, l'implication de la hnRNP A1 est un mécanisme d'autorégulation pour l'épissage *HNRNPA1*. De plus, le site EC6 favorise l'exclusion en formant une boucle avec le site d'épissage proximal 5' (Figure 6) (118). D'autre part, du point de vue de la favorisation de l'inclusion, celle-ci est favorisée par la séquence CE9, qui abolit l'utilisation du site d'épissage 3' de l'exon 8 (Figure 6) (117). C'est ainsi que ces éléments régulateurs influencent l'épissage de l'exon 7B.

1.3.2.2 La structure protéique de *HNRNPA1*

Puisque la hnRNP A1 et la hnRNP A1B font partie de la famille hnRNP A/B, celles-ci possèdent un domaine N-terminal très ordonné (structure tridimensionnelle bien définie) puis un domaine C-terminal désordonné (possibilité de structure secondaire). De plus, ses protéines possèdent divers domaines fonctionnels (Figure 6) (102) :

Le domaine N-terminal : un domaine ordonné :

La partie N-terminale de la hnRNP A1, possède les domaines d'interaction avec l'ARN (RRM1 et RRM2), connu aussi sous le nom de protéine de déroulement 1 (UP1), et est la partie la plus structurée de la protéine avec deux domaines globulaires (119). Les motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM) ont une longueur d'environ 90 acides aminés et jouent un rôle crucial dans la liaison aux molécules d'ARN et d'ARN messager (ARNm) générales et spécifiques (120).

Bien que les deux RRM présentent un degré élevé d'homologie (environ 35% identiques et 60% similaires), et adoptent des structures tridimensionnelles presque identiques, ils ne sont pas redondants d'un point de vue fonctionnel. En effet, ils fonctionnent comme des domaines indépendants capables de se lier à différentes cibles d'ARN et d'ARNm (121). Au niveau de chaque RRM, deux sous-motifs conservés nommés RNP1 et RNP2 jouent un rôle crucial pour la liaison à l'ARN. Les responsables de ceci sont les résidus phénylalanine conservés F17A/F57A/F59A (RRM1) et F108A/F147A/F150A (RRM2) (Figure 6) (122). Puis, du point de vue de la liaison à l'ARN, la HnRNP A1, préfère se lier aux éléments riches en AU (ERA) ou aux motifs UAGGGA(U), principalement situés dans les régions 3' non traduites (3'-UTR) des transcrits d'ARNm (123).

Le domaine C-terminal : un domaine désordonné

La partie C-terminal, avec une structure plus désordonnée, possède divers éléments fonctionnels participant à la liaison de l'ARN, à la localisation cellulaire et aux interactions protéine-protéine (104). Cette partie se compose notamment d'un motif de liaison à l'ARN (RGG-box), une région riche en glycine connue aussi sous le nom région intrinsèquement désordonnée (RID) et une séquence de ciblage nucléaire (M9) (Figure 6) (104).

Tout d'abord, la séquence M9 est importante, car elle permet le transport bidirectionnel de *HNRNPA1* du noyau vers le cytoplasme. Les stœchiométries, c'est-à-dire, ce qui contrôle les niveaux nucléocytoplasmiques, ne sont pas tout à fait compris, mais le mécanisme d'import est bien décrit dans la littérature (124). En effet, des études antérieures suggèrent qu'il y aurait 2 motifs essentiels pour le transport de cette protéine, le motif N-terminal SNFGPMK et le motif C-terminal PY (M9) (124). En effet, l'import nucléaire de hnRNPA1 est médié par la transportine (125). Lorsque des mutations sont présentes dans ces motifs, il y a une inhibition de l'import nucléaire et une diminution de l'interaction avec la transportine-1 ou 2 (TNPO1/TNPO2) (124).

Ensuite, il a été démontré que le domaine RGG de la hnRNP A1 influence la spécificité et la force de liaison de l'ARN, la liaison et le dépliage de l'ADN G-quadruplex, ainsi que la médiation des interactions protéine-protéine (126, 127).

Aussi, le RID permet des interactions protéine-protéine, favorise la séparation de phase liquide-liquide (SPLL) et la fibrillation auto-associative/hétéro-associative de hnRNP A1 (104). Cette séparation permet la formation d'organelles sans membrane dans les cellules eucaryotes jouant un rôle important dans la santé et dans le contexte pathologique (128).

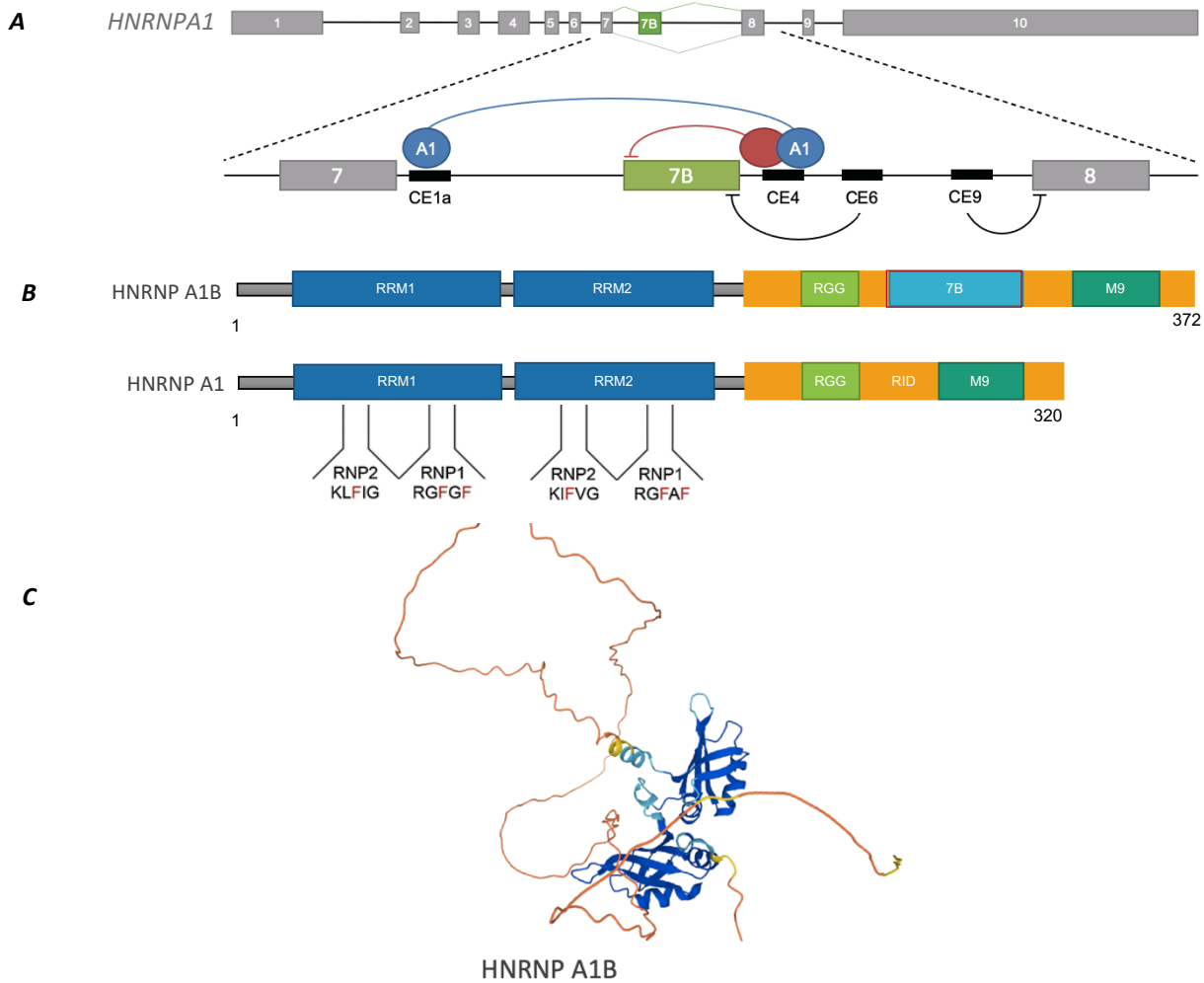


Figure 6. Les isoformes codantes de *HNRNPA1*

(Figure modifiée de Gagné M., thèse doctorat, 2022, permission annexe (129))

A) Le schéma du gène *HNRNPA1* et le modèle d'épissage de l'exon 7B **B)** Les domaines protéiques des différentes isoformes; RRM1/2: domaine de reconnaissance de l'ARN (UP1), RGG : domaine de répétition Arg-Gly-Gly, RID : région intrinsèquement désordonnée enrichie en glycine, M9 : séquence transport nucléocytoplasmique, 7B : exon concerné dans l'épissage alternatif. **C)** Prédiction par AlphaFold Monomer v2.0. de la structure complète de hnRNP A1B humaine (AF-P09651-F1), dernière mise à jour le 1^{er} novembre 2022 (130)

1.3.2.3 Les fonctions de la hnRNP A1 et les effets des modifications post-traductionnelles :

La hnRNP A1 est un acteur important dans le métabolisme de l'ARN. En effet, étant une protéine de liaison à l'ARN, elle présente une grande diversité fonctionnelle, notamment joue un rôle dans la transcription de l'ARN, l'épissage des pré-ARNm, le transport/ protection de l'ARNm par la séparation de phase (SPLL), et la traduction des ARNm. Au-delà de son implication dans les processus liés à l'ARNm, la hnRNP A1 participe également au traitement des microARN, et à la biogenèse des télomères (Figure 7) (131). Aussi, celle-ci est présente, mais exprimée différemment dans de nombreux types cellulaires dont sa fonction moléculaire peut varier en raison de modifications post-traductionnelles (MPT). Notamment, elle peut subir la phosphorylation, sumoylation, ubiquitination, PARylation, acétylation, méthylation et O-GlcNAcylation/N-GlcNAcylation, qui affectent toutes la localisation et la fonction de la hnRNP A1 (131). Pour effectuer ses fonctions, la hnRNP A1 utilise divers mécanismes et MPT, plusieurs vues d'ensemble (103, 104, 123, 131, 132) décrivent en détail ces mécanismes, mais voici quelques exemples importants à discuter :

1.3.2.3.1 Régulation de la Transcription :

La hnRNP A1 est connue pour réguler la transcription des gènes (Figure 7) par des mécanismes qui peuvent être divisés en deux catégories, répression et activation du promoteur (133, 134). D'une part, il a été démontré que la répression du promoteur peut être causée par l'interaction protéine-protéine entre le domaine intrinsèquement désordonné de la hnRNP A1 et le facteur de transcription (135). D'autre part, d'autres études soulèvent que la hnRNP A1 contrôle l'activation du promoteur en se liant aux structures G-quadruplex au sein des promoteurs de gènes. Cet effet est basé sur la reconnaissance et liaison des structures G-quadruplex de l'ARN par le domaine RGG de la hnRNP A1. En effet, cette interaction permet par la suite aux RRM de stabiliser la forme dépliée de l'ADN en interagissant avec l'ADN simple brin (136).

1.3.2.3.2 Régulation de l'épissage des pré-ARNm :

Outre, son impact sur la transcription, la hnRNP A1 joue également un rôle essentiel dans l'épissage de l'ARN (Figure 7). Cette protéine est un composant essentiel du spliceosome et contribue aux processus d'épissage régulier et alternatif de l'ARN. Le mécanisme régissant cette fonction est la liaison de la hnRNP A1 aux éléments silencieux d'épissage exoniques (ESE) ou

introniques (ESI) au sein du pré-ARNm. Cette liaison, empêche la reconnaissance de l'exon ou favorise l'exclusion de l'exon dans l'ARNm (137).

Des exemples illustrant ce mécanisme sont l'épissage de l'ARN tau (138) et du motoneurone de survie (SMN) qui sont essentiels à l'homéostasie et survie des neurones.

Tout d'abord, dans l'épissage de tau, la hnRNP A1 participe à l'exclusion de l'exon 10 qui donne lieu à une protéine comportant trois répétitions de liaison aux microtubules (3R-Tau). Ceci est essentiel dans le cerveau pour conserver un rapport équilibré entre 4R-Tau (quatre répétitions de liaison aux microtubules) et 3R-Tau. Néanmoins, dans les tauopathies et la maladie d'Alzheimer, ce rapport est dérégulé par un excès de 4R-Tau par rapport à 3R-Tau (139). Donc la hnRNP A1 pourrait être potentiellement impliquée dans cette dérégulation, mais aucune étude jusqu'à aujourd'hui discute cette possibilité. Ensuite, dans l'épissage de SMN, la hnRNP A1 favorise l'exclusion de l'exon 7 du pré-ARN en se liant à l'exon 8, maintenant ainsi l'état fonctionnel de la protéine. En effet, l'inclusion de l'exon 7 est associée à la pathologie de l'amyotrophie spinale (SMA) (140).

Cependant, il existe un facteur à prendre en considération dans la régulation de l'épissage par la hnRNP A1. En effet, les modifications post-traductionnelles (MPT) en réponse à divers stimuli, telles que l'ubiquitination (141), interfèrent généralement avec l'activité de liaison à l'ARN de la hnRNP A1 et favorisent sa localisation cytosolique, ce qui conduit à l'épissage alternatif des ARNm. Par exemple, la hnRNP A1 peut être ubiquitinée par le facteur 6 associé au récepteur du TNF (TRAF6) dans sa région RRM1, ce qui entraîne une diminution de la liaison à l'ARN et donc l'épissage alternatif de divers gènes. Le mécanisme derrière cette modification est le déclenchement de la réponse inflammatoire causée par la détection de molécules associées à des pathogènes comme les lipopolysaccharides bactériens (141).

Donc, l'épissage régulé par la hnRNP A1 est très important pour le maintien de l'homéostasie dans les neurones, mais aussi pour la réponse suite à l'exposition à divers stimuli.

1.3.2.3.3 *Transport et traduction des ARNm :*

Aussi, la hnRNP A1 joue plusieurs rôles dans la régulation de la traduction de l'ARNm. Il agit notamment comme un activateur en *trans* du site d'entrée interne du ribosome (SEIR) et se lie aux séquences SEIR de divers ARNm cellulaires, y compris ceux codant pour l'apoptose, les régulateurs du cycle cellulaire et des oncogènes (142, 143). Cela permet d'initier une traduction indépendante de la coiffe (dépendante de l'IRES), ce qui est essentiel en cas de stress cellulaire, de progression du cycle cellulaire ou prolifération cellulaire. Le mécanisme derrière cette fonction complexe n'est pas tout à fait compris.

Tout d'abord, des études (143, 144) décrivent que la liaison de la hnRNP A1 aux séquences SEIR, induit des modifications post-traductionnelles sur la protéine qui par la suite facilite le transport des ARNm vers le cytoplasme. Ensuite, des MPT ultérieures dans la hnRNP A1 entraînent la libération de la séquence SEIR, et rendent donc l'ARNm disponible pour la traduction indépendante de la coiffe. Par exemple, une étude soulève que la liaison de la hnRNP A1 à une séquence SEIR favorise sa phosphorylation par des kinases telles que S6K2 dans le noyau, ce qui permet le transport vers le cytoplasme (144).

En outre, il existe d'autres MPT qui sont reconnues pour influencer le mécanisme de régulation de la traduction mené par la hnRNP A1 (145). En effet, les protéines arginine méthyltransférases telles que PRMT3 et PRMT1 peuvent réguler la traduction dépendante à la SEIR par la hnRNP A1 grâce à la méthylation de l'arginine, en augmentant ou en diminuant son activité de liaison à l'ARN. Par exemple, PRMT3 est connu pour la méthylation de l'Arg31, réduisant la liaison de la hnRNP A1 à l'ARNm cellulaire du membre 2 de la sous-famille G de la cassette de liaison à l'ATP (G2CLA) et augmentant l'abondance de cette protéine (146). Par ailleurs, PRMT1 est connue pour diminuer la traduction dépendante à la SEIR (147).

Finalement, la hnRNP A1 influence également la traduction en se liant aux régions 3' non traduites des ARNm (3'-RNT) contenant des éléments riches en AU (ERA), supprimant la traduction. Un exemple détaillé est la régulation de l'expression de la cytokine inflammatoire TNF α (148). En effet, lorsque les lymphocytes T sont inactifs, la hnRNP A1 lie des ERA dans le 3'-RNT, inhibant la traduction de la cytokine. Cependant, quand les lymphocytes T sont activés, il y a aussi activation de la MAP kinase d'intégration du signal 1 (MNK1) qui phosphoryle la hnRNP A1. Cette modification diminue la liaison de la hnRNP A1 à l'ARNm et donc augmente la traduction de la

cytokine TNF α . Cette régulation est importante, car cette cytokine est un acteur majeur dans la régulation de l'inflammation.

En résumé, bien que les acteurs clés puissent changer en fonction des stimuli, il existe deux mécanismes majeurs responsables de la régulation de la traduction de l'ARNm. De plus, ceux-ci sont influencés par les MPT qui, encore une fois, diminuent la liaison à l'ARNm et favorisent sa localisation cytosolique.

1.3.2.3.4 La séparation de phase liquide-liquide de HNRNPA1 (SPLL) :

Le domaine C-terminal de la hnRNP A1, comme mentionné précédemment, se compose principalement de régions intrinsèquement désordonnées (RID) et du domaine RGG. Ces éléments jouent un rôle essentiel dans les interactions protéine-protéine, protéine-ARN et la séparation de phase liquide-liquide (SPLL) (83). La séparation de phase se produit lorsque les RID désordonnés interagissent électrostatiquement pour former des gouttelettes en forme de granules, appelées "organelles sans membrane", telles que les granules de stress et les granules d'ARNm. Ces entités dynamiques sont régies par des interactions multivalentes, transitoires et diverses (81).

En ce qui concerne les granules de stress (GS), ils se forment dans le cytoplasme en réponse à des facteurs de stress environnementaux. Ils sont principalement composés d'ARNm, de protéines de liaison à l'ARN (PLA) et de complexes de traduction bloqués (149). Les GS sont devenus des sujets de recherche populaires en raison de leur implication présumée dans la neurodégénérescence de diverses pathologies, bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore complètement compris (24).

De plus, la hnRNP A1 a été identifiée comme un composant des granules de stress, contribuant à leur assemblage grâce à ses fonctions de liaison à l'ARN et à son domaine C-terminal désordonné (150). En effet, le domaine C-terminal, indépendamment des autres domaines, a la capacité de subir une séparation de phase de manière autonome, pouvant attirer et incorporer d'autres protéines contenant des régions intrinsèquement désordonnées (RID). Ce phénomène de séparation de phase est potentiellement causé par des interactions entre résidus aromatiques et électrostatiques. Notamment, le domaine RGG est riche en résidus aromatiques, suggérant son importance potentielle dans ce processus. De plus, l'ARN lié par le domaine de reconnaissance à l'ARN (UP1) contribue à la séparation en phase, suggérant un mécanisme par lequel la liaison de l'ARN peut réguler ce processus en favorisant l'assemblage de grands complexes qui ne peuvent pas se former

par des interactions protéine-protéine seules. Cependant, l'implication de la hnRNP A1 dans les granules de stress, telle que l'identification des ARNm lié par la hnRNP A1 dans ces organelles, n'est pas élucidée.

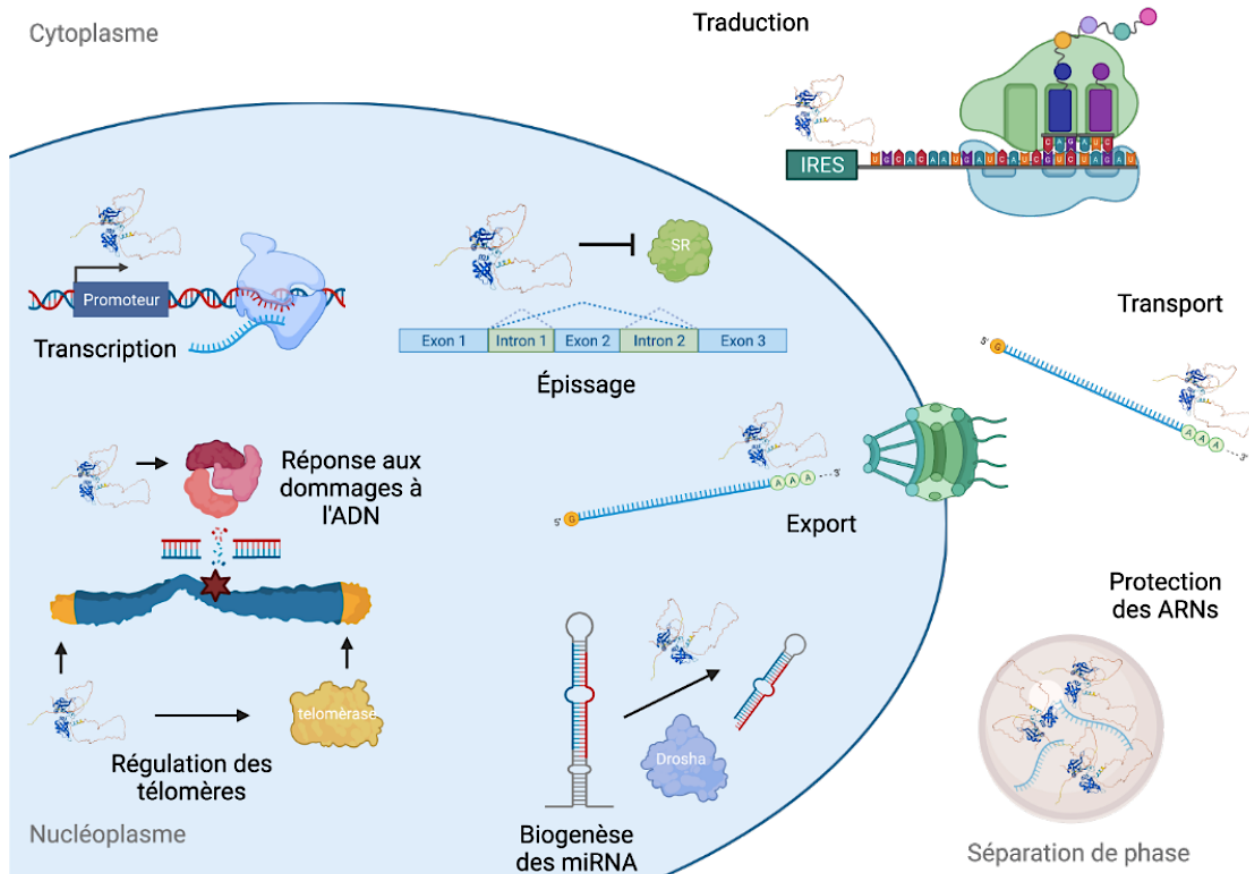


Figure 7. Les multiples fonctions cellulaires de hnRNP A1

(Gagné M., thèse doctorat, université de Montréal, biochimie, 2022, permission annexe (129))

La hnRNP A1 joue un rôle dans la transcription de l'ARN, l'épissage des pré-ARNm, le transport/protection de l'ARNm par la séparation de phase (SPLL), et la traduction des ARNm. Au-delà de son implication dans les processus liés à l'ARNm, la hnRNP A1 participe également au traitement des microARN, et à la biogenèse des télomères.

1.3.3 *HNRNPA1* : deux isoformes avec des différences

1.3.3.1.1 *Le dilemme de HNRNPA1* : est-ce qu'il y a des différences importantes entre les deux isoformes ?

La hnRNP A1 comme décrit plus haut est un acteur majeur dans le métabolisme de l'ARN, mais est-ce que l'isoforme hnRNP A1B partage aussi ce rôle ? En effet, comme discuter dans la section dilemme des hnRNPs, la littérature fait difficilement une distinction concrète entre les divers hnRNPs et leurs isoformes respectives. La majorité des études sur *HNRNPA1* se concentre majoritairement sur l'isoforme hnRNP A1, étant l'isoforme la plus exprimée (132), alors que très peu est répertorié sur l'isoforme hnRNP A1B.

Premièrement concernant les études réalisées sur la hnRNP A1, celles-ci utilisent des anticorps spécifiques aux deux isoformes. Comme discuter, la seule différence entre les deux est l'élongation de la région désordonnée de la hnRNP A1B. En effet, ces anticorps sont spécifiques à des séquences partagées entre les deux isoformes et ne sont donc pas optimaux pour faire une distinction concrète. Jusqu'à aujourd'hui, il n'y a aucune validation sur le fait que les fonctions soient d'une part spécifique à la hnRNP A1, spécifique à la hnRNP A1B ou partager entre les deux.

En outre, la distinction est difficilement étudiée, à cause du manque de compréhension derrière les mécanismes de fonction des RID. En effet, la participation de ces régions dans des interactions est un concept très récent, dû à l'ancienne hypothèse dont la structure tertiaire définissait la fonction d'une protéine (115, 151, 152). Étonnamment, une étude à montrer, dans le contexte de *HNRNPA1*, que l'isoforme hnRNP A1B a une plus forte affinité pour l'ADN simple brin (153). Donc, l'élongation du RID serait potentiellement responsable de cette modification de fonctionnalité. Mais est-ce qu'il y a d'autre différence entre les deux isoformes *HNRNPA1* ? Des fonctions non partagées ? Comment le RID peut potentiellement expliquer ses différences ?

1.3.3.2 *HNRNPA1* dans une évolution de saut d'exon

Selon une étude (111), l'évolution du saut d'exon dans les hnRNP a élargi la capacité de régulation des mammifères. Cela voudrait dire que la hnRNP A1B (+exon 7b) était potentiellement la première isoforme de la protéine et que dû à l'évènement évolutif de saut d'exon, la hnRNP A1 serait survenue. Effectivement, hnRNP A1B est une protéine avec un domaine RID enrichi en motifs GY, qui permet leur séparation de phase. Ainsi, cet évènement aurait permis de diminuer la longueur du RID et, diminuer par la suite, la formation de complexe protéique d'ordre supérieur

qui peuvent subir une séparation de phase et potentiellement former des agrégats dans le cas d'un assemblage aberrant.

Il y a notamment une étude *in vitro*, réalisée auparavant dans notre laboratoire, se centrant sur les effets de l'inclusion de l'exon 7B dans la hnRNP A1B (154), qui appuie cette hypothèse. En premier lieu, ils ont voulu observer si cette élongation du domaine RID favorisait la fibrillation de la protéine. En effet, l'algorithme de prédiction ZipperDB qui prédit des segments de formation de fibrilles, leur a permis de remarquer qu'il y aurait potentiellement deux peptides générés par l'inclusion de l'exon 7B avec un potentiel de fibrillation. Par la suite, ils ont expérimentalement testé leur prédiction par la méthode d'incorporation de la thioflavine T, et ont ainsi trouvé que ces peptides dérivés de l'élongation du RID dans la hnRNP A1B se caractérisent par une disposition plus élevée à la fibrillation.

Aussi, dans cette étude précédente du laboratoire, ils ont voulu déterminer si cette plus grande disposition à la fibrillation observée *in vitro* est liée à la formation d'agrégats cytoplasmiques *in vivo*, comparable à la mutation D262/314V retrouvée dans *hnRNPA1* dans la maladie SLA. La mutation D262V est selon la position dans la hnRNP A1 et la D314V selon la hnRNP A1B. Ainsi, pour étudier la fibrillation, ils ont utilisé la méthode d'immunofluorescence où ils ont quantifié le niveau d'agrégation entre les conditions hnRNP A1B, hnRNP A1B^{D314V}, hnRNP A1 et hnRNP-A1^{D262V}. Les résultats obtenus ont montré que l'élongation du RID de la hnRNP A1B favorise l'agrégation de la protéine et que les mutations favorisent davantage l'agrégation.

Donc, ses résultats suggèrent que la hnRNP A1B aurait potentiellement plus d'effets d'agrégation dans le contexte pathologique de la SLA. En effet, dans la littérature (155, 156) sur les protéines de liaison à l'ADN et l'ARN, il a été répertorié que les mutations de la SLA dans les domaines RID des protéines augmentent l'agrégation, et donc est souvent observée dans la pathologie (155).

1.3.3.3 L'expression physiologique et distribution subcellulaire des deux isoformes

Une étude récente (157), réalisée dans notre laboratoire, a montré que l'isoforme hnRNP A1B se trouve sous forme de dimère résistant au SDS dans le système nerveux central (SNC) chez la souris. En effet, cela est très intéressant, car chez les neurones de calamar, un orthologue de hnRNP A/B serait aussi sous forme de dimère résistant au SDS (158). Dans l'étude, ils ont comparé la séquence de la protéine du calamar avec celle de la hnRNP A1B humain. Il est intéressant de noter que selon leur résultat de comparaison, la protéine du calamar serait plus similaire à la

séquence de l'isoforme hnRNP A1B que celle de la hnRNP A1. De plus, le point le plus important à soulever est que si l'on compare la séquence de la protéine avec seulement la séquence de l'exon 7B, l'identité de conservation augmente (157). Cela veut dire que l'inclusion de cette extension du RID est conservée et renforce le concept d'évolution d'épissage alternatif de ses protéines chez les mammifères.

Ensuite, notre étude se base sur la caractérisation spatio-temporelle au long du développement et du vieillissement chez les souris (157). Dans celle-ci, les résultats montrent que la hnRNP A1B est sélectivement exprimée dans le SNC, ce qui suggère une fonction importante liée au SNC. De plus, dans le SNC, la protéine est retrouvée sous forme de dimère. Cela est important, car selon d'autres études réalisées dans la protéine de liaison à l'ADN TDP-43, sa forme dimérique dans le cytoplasme lui permettrait d'augmenter son affinité envers l'ADN et son activité d'épissage. Donc, la dimérisation de la hnRNP A1B pourrait potentiellement avoir un autre rôle qui diffère du monomère. Aussi, selon l'étude, le dimer de la hnRNP A1 serait très peu présent dans le SNC, ce qui montre l'importance d'étudier les deux isoformes individuellement.

De plus, on a montré aussi que la hnRNP A1B possède une distribution subcellulaire différente que la hnRNP A1. En effet, la hnRNP A1 est principalement nucléaire, contrairement à la hnRNP A1B qui possède une distribution cytoplasmique et nucléaire. En effet, comme dit précédemment, les deux isoformes possèdent la même séquence M9 qui permet l'import/export nucléaire avec la TNPO1. Le mécanisme qui permet de garder une partie de la hnRNP A1B dans le cytoplasme reste inconnu. Aussi, ces résultats sont appuyés par notre étude (154) où il y a été démontré que la hnRNP A1B est enrichie dans les tissus du SNC et son accumulation dans les neurones moteurs de la SLA est cytoplasmique. De plus, cette distribution est stable à l'âge adulte, mais à des âges plus avancés, celle-ci devient plus hétérogène dans les neurones. Néanmoins, ceci n'est pas spécifique à la hnRNP A1B, car selon des études réalisées sur TDP-43, il y aurait des changements similaires à travers l'âge. Donc, ces résultats suggèrent qu'il y aurait potentiellement un lien entre l'âge et la neurodégénération, car ce phénomène est observé dans des contextes pathologiques (SLA) et dans le vieillissement.

Pour conclure, ces résultats soulèvent des différences entre les deux isoformes au niveau de leur expression physiologique, mais serait-il possible d'avoir des différences à d'autres niveaux ? Et quelles sont les responsables de ses différences ?

1.3.3.4 Structures secondaires des protéines intrinsèquement désordonnées (PID), une explication possible des différences.

Les protéines hnRNPA1 et A1B sont considérées des protéines intrinsèquement désordonnées (PID) par la présence de leur domaine RID. Ce domaine fait en sorte que la partie C-terminal de la protéine n'ait pas de plis tridimensionnels bien structurés (2). Néanmoins, la seule différence entre les deux isoformes est l'élongation du domaine RID (+52 a.a.) par l'inclusion de l'exon 7B dans l'isoforme A1B (20). Donc comment peut-il y avoir de différences de fonctions et/ou structure dans les PID?

Avant l'année 1990 (40), l'importance et les caractéristiques des PID étaient très peu répertoriées dans la littérature. À partir de cette époque, les recherches ont montré que ce type particulier de domaine dans les protéines était très présent dans les protéines eucaryotes (40). Effectivement, les recherches ont permis de réaliser que ces séquences « désordonnées » pouvaient participer à diverses fonctions protéiques. Il y a une étude (41) où une analyse basée sur la littérature de 150 protéines contenant des RID d'au moins 30 résidus de long, a permis de distinguer des fonctions spécifiques à la présence du RID. Celles-ci peuvent être classées dans 4 catégories ; reconnaissance moléculaire, assemblage moléculaire, modification des protéines et chaînes entropiques.

Mais, par quel moyen ses séquences désordonnées peuvent participer à des fonctions ?

Tout d'abord, l'un des facteurs les plus importants dans les PID sont les modifications post-traductionnelles (MPT). En effet, ces régions sont fréquemment soumises à des MPT qui augmentent les états fonctionnels dans lesquels une protéine peut exister dans la cellule (40). En effet, l'inclusion de l'exon 7B dans l'isoforme hnRNP A1B induit l'apparition de 15 sites de plus susceptible de subir une MPT (tableau 4). L'impact de ses modifications jusqu'à aujourd'hui n'a jamais été répertorié au niveau de la fonction.

De plus, la particularité de ces séquences est la présence de courts motifs (SLIMs ou MoRFs) peptidiques pouvant adopter des structures secondaires et ainsi permettre l'interaction avec des domaines structurés d'autres protéines (39). Donc c'est grâce à ces particularités que ce type de protéines peuvent interagir, recruter de diverses protéines, et ainsi participer à diverses fonctions protéiques. Les MoRFs sont des petites séquences intrinsèquement désordonnées dans les protéines qui subissent une transition de désordre à ordre lors de la liaison à leurs partenaires. Ils peuvent être classifiés en 3 catégories, α -MoRFs (quand ils forment des hélices alpha), β -MoRFs (lorsqu'ils

forment des feuilletts bêta), MoRFs irréguliers (lorsqu'ils ne forment aucune forme) et les MoRFs complexes (combinaison des catégories précédentes) (159).

Par conséquent, il est important de pouvoir identifier des courts motifs, ainsi que des structures secondaires dans les RID. Depuis l'emphase sur les PID, la bio-informatique est entrée en jeu. En effet, un des problèmes expérimentaux sur la caractérisation des PID est que, sans prédiction, les expériences de validation de motif prendraient un temps énorme (42, 43). Ainsi, des outils bio-informatiques ont été créés pour obtenir des résultats préliminaires in-silico et pouvoir par la suite les tester de façon pratique.

Or, ces outils de prédiction ne sont pas précis. En effet, l'une de problématique des PID est comment prédire de l'ordre dans une séquence désordonnée ? Jusqu'à aujourd'hui, les logiciels de prédiction se basent plus sur la prédiction de site qui pourrait potentiellement être impliqué dans des interactions (ANCHOR, MoRFPred, MoRFchibi) (44, 45). En revanche, les outils bio-informatique sont en constante évolution, et récemment, il y a eu le développement d'un outil spécifique aux PID qui permet de prédire des structures secondaires. Ce logiciel est LS2P, qui permet de prédire des acides aminés qui feraient potentiellement partie d'une suite de trois résidus hélicoïdaux (42). Donc il permet d'avoir de l'information supplémentaire par rapport aux RID et ainsi trouver des séquences qui pourraient potentiellement adopter une structure ordonnée.

Tableau 4. Site de phosphorylation prédit par NetPhos3.1 (160) dans l'exon 7B de la hnRNP A1B

Position	Modification	Responsable
Y253	Phosphorylation	ABL
Y260, S261, S264	Phosphorylation	Inconnu
Y267, Y274	Phosphorylation	Récepteur de l'insuline
S279	Phosphorylation	kinase dépendante des cyclines 2 (Cdc2)
S269, Y281, S284, S286, Y287, S289, Y290	Phosphorylation	Inconnu
S302	Phosphorylation	PKA

1.3.4 HNRNPA1 dans la SLA

Aujourd'hui, une variété de mutations a été associée à différents phénotypes de SLA et de DFT. Elles représentent une incidence faible (< 1% des cas de SLA), avec des mutations communes entre les deux isoformes, et certaines spécifiques à l'exon 7B de la hnRNP A1B.

Premièrement, ces mutations ont divers impacts au niveau de *HNRNPA1*, tel qu'une augmentation de sa localisation cytoplasmique et sa capacité de former des agrégats. D'une part, les études se centrent sur le RID de la protéine hnRNP A1. Effectivement, des études antérieures (161-163) ont montré que les mutations D262N/V et N267S retrouvées dans le RID de cette protéine favorisent l'agrégation. De ce fait, il y a une accélération de la fibrillation, ainsi qu'une dérégulation et accélération des transitions de phase et de polymérisation de la hnRNP A1. Cet événement est causé par une augmentation de sa localisation cytosolique et une diminution de son interaction avec UBQLN2, qui donc diminue sa dégradation. De plus, ces effets peuvent potentiellement influencer la formation et la stabilité des granules de stress (GS), en induisant indirectement une transition de phase d'autres protéines dans les SG contenant des RID (156, 164).

Finalement, un autre aspect intéressant de hnRNP A1 dans le contexte pathologique de la SLA est que certaines mutations dans le M9 peuvent avoir un effet dans la stœchiométrie de l'import/export nucléaire de la protéine (131). Notamment, une étude antérieure (162) suggère que les mutations

P288S/A trouvées chez les patients atteints de SLA entraînent une localisation plutôt cytoplasmique et l'agrégation de hnRNPA1.

Puis, du côté de l'épissage du gène *HNRNPA1*, une autre étude (154) suggère que TDP-43 peut se lier au pré-mRNA de *HNRNPA1* dans le noyau pour moduler son épissage alternatif et favoriser l'isoforme hnRNP A1 (sans exon 7B). Cependant, dans la SLA cette protéine, normalement localisée dans le noyau, se retrouve dans le cytoplasme. Ainsi la déplétion nucléaire dans la pathologie, favorise l'inclusion de l'exon 7B et donc l'isoforme hnRNP A1B.

Il est important à noter que même si les études ne sont pas directement centrées sur l'isoforme hnRNP A1B, tout s'applique aux deux isoformes.

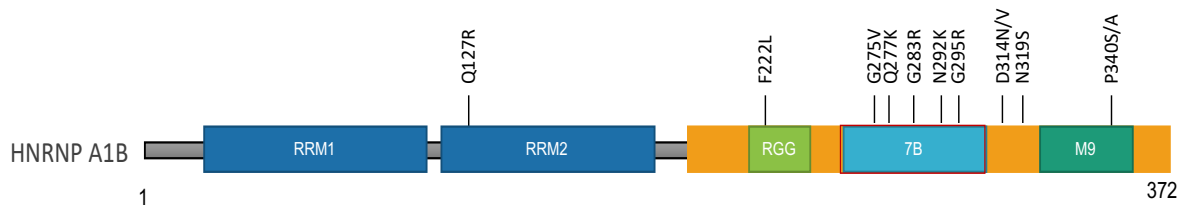


Figure 8. Mutations de la hnRNP A1B dans la SLA.

2 Hypothèse/objectifs et contributions

Ce projet de maîtrise se centre sur l'étude fonctionnelle de hnRNP A1B. L'hypothèse de ce projet est que la hnRNP A1B possède des fonctions non caractérisées dans le cytoplasme des neurones et sont potentiellement impliquées dans la pathogenèse de la SLA. Afin de valider cette hypothèse, quatre objectifs ont été établis. Puisque, la hnRNP A1B est localisée différemment dans le cytoplasme que la hnRNP A1, le premier objectif est de déterminer quelles protéines peuvent interagir dans le cytoplasme avec cette isoforme par la technique d'immunoprécipitation couplée à une spectrométrie de masse (IP-MS). Ensuite, comme deuxième objectif, une validation et caractérisation de ces interactions sera effectuée. Afin de valider les interactions et leurs spécificités, celles-ci seront évaluées par la technique d'immunoprécipitation (IP). Aussi, il sera déterminé si les interactions sont ARN dépendantes, puisque les hnRNPs sont des protéines de liaison à l'ARN. Puis, la localisation des interactions sera évaluée par des essais de proximité (PLA). En troisième objectif, l'impact de certaines mutations SLA de la hnRNP A1B sera évalué au niveau des interactions de *novo*. Pour étudier cela, des mutations liées à la SLA seront introduites dans la séquence de la hnRNP A1B et l'impact sera évalué au niveau des interactions protéiques par IP. Puis, comme dernier objectif, les ARNm qui sont liés dans le cytoplasme par la hnRNP A1B, seront étudiés. En effet, une liste de potentiels ARNm liée par la hnRNP A1B sera effectuée et certains ARNm seront validés par la technique d'IP d'ARN (RIP).

Myriam Gagné, Mariana Llasera, Jade-Emmanuelle Deshaies et Christine Vande Velde ont contribué à la conception de l'étude. Myriam Gagné, Christian Trahan et Marlene Oeffinger ont effectué l'analyse protéomique de l'IP-MS. Myriam Gagné, Asmita Ghosh ont contribué à la culture cellulaire Asmita Ghosh a effectué la validation de la liaison à l'ARNm par la technique RIP.

3 Matériels et méthodes

3.1 Anticorps maison spécificités

Les anticorps polyclonaux spécifique à la hnRNP A1B ont été générés comme précédemment décrit (157). L'anticorps est spécifique au peptide C-YGGSGSYDSYNNGG, correspondant aux acides aminés 281-294 (codés par l'exon 7B).

3.2 Identification des partenaires d'interaction de la hnRNP A1B

Des moelles épinières de souris C57BL/6N âgées de 2 mois ont été préparés en les homogénéisant dans un tampon d'immunoprécipitation (IP) composé de HEPES à un pH de 8,0 (20 mM), NaCl (100 mM), leupeptine (10 µg/ml), pepstatine (10 µg/ml) et chymotrypsine (10 µg/ml). Les lysats ont été ensuite ajustés pour contenir 0,5 % de Triton X-100, incubés pendant 10 minutes sur de la glace, puis pendant 10 minutes à température ambiante. Après cette étape, les lysats ont été centrifugés à 16 000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Les fractions solubles ainsi obtenues ont été collectées et quantifiées en utilisant le dosage des protéines BCA (Pierce).

Pour l'immunoprécipitation, 500 µg de lysats ont été immunoprécipités en utilisant des billes Dynabeads de protéine G (Life Technologies) conjuguées avec un anticorps anti-hnRNP A1B (1), tandis qu'une quantité équivalente d'IgG ChromPure du même isotype (Jackson Laboratories) a été utilisée comme contrôle négatif. Cette procédure a été réalisée dans un tampon IP à 4 °C pendant la nuit. Après l'incubation, les billes liées à l'antigène ont été lavées 10 fois avec le tampon IP, suivi d'un lavage avec une solution d'acétate d'ammonium à 0,1 M, de chlorure de magnésium à 0,1 mM, de Tween-20 à 0,02 %, puis de 3 lavages supplémentaires avec une solution d'acétate d'ammonium à 0,1 M et de chlorure de magnésium à 0,1 mM, suivis d'un dernier lavage avec une solution de Tris-HCl à 20 mM et un pH de 8,0.

Ensuite, les billes liées à l'antigène ont été remises en suspension dans une solution de Tris-HCl à 20 mM et un pH de 8,0, avant d'être soumises à une digestion à la trypsine. Préalablement à l'analyse LC-MS/MS, la trypsine a été décontaminée avec une solution d'acide formique à 50 %. Les peptides résultants ont été analysés en utilisant Mascot Proteome Discoverer version 2.3.0.523, en se référant à la base de données *Mus musculus*, et en employant Scaffold version 4.10.0.

Les partenaires d'interaction considérés comme significatifs ont été sélectionnés sur la base d'un enrichissement au moins deux fois supérieur par rapport au contrôle IgG, sur trois répétitions. Pour comparer les interacteurs de la hnRNP A1B à l'interactome de la hnRNP A1 déjà publié, nous avons croisé notre liste de protéines avec BIOGRID 4.4.205 (165) et GPS-Prot version 3.3.0 (166).

Finalement, afin de caractériser l'interactome de la hnRNP A1B, une analyse bioinformatique a été réalisée en utilisant GeneOntology (espèce *Mus musculus*, test type Fisher's exact avec p-value >0.05) (167) et le réseau STRING (168).

3.3 Information plasmides et construction

Les plasmides suivants ont été obtenus auprès d'Addgene :

Myosin-IIA-GFP (de Matthew Krummel, Addgene #38297) (169), Klc1-myc (de Rosalind Segal, Addgene #166962) (170), myc-KIF5C (de Josef Kittler, Addgene #127618) (171).

Les plasmides Flag-hnRNP A1B et Flag-hnRNP A1 ont été construits par sous-clonage des séquences codantes de pCMV-Myc-hnRNP A1B et pCMV-Myc-hnRNP A1 (154) dans pcDNA3-Flag entre les sites de restriction EcoRI et XhoI.

Les mutations introduites dans Flag-hnRNP A1B/A1 ont été effectuées par mutagenèse rapide II (Agilent) avec les amorces suivantes :

Y124A-hnRNP A1B/A1 (mutation inhibant le motif Y-acide) :

Anti-sens : 5'-CAATCTTCCCATACTGCTCAAAGCATCTCGTAGGTGATGTTCTTCAG-3'
Sens : 5'-CTGAAGAACATCACCTACGAGATGCTTTTGAGCAGTATGGGAAGATTG-3'

Q127R-hnRNP A1B/A1 (mutation SLA RRM2) :

Anti-sens : 5'-TCACTTCAATCTTCCCATACCGCTCAAATAATCTCGTAGG- 3'
Sens: 5'-CCTACGAGATTATTTTGAGCGGTATGGGAAGATTGAAGTGA-3'

G283-hnRNP A1B (mutation exon 7B) :

Anti-sens: 5'-ATAGCTGCCACTCCTGCCATAGCCACTGC-3'
Sens:5'-GCAGTGGCTATGGCAGGAGTGGCAGCTAT-3'

D314V-hnRNP A1B (mutation C-terminal) :

Anti-sens : 5'-GATTGTTGTAATTGCCAAAACATTGTAGCTTCCACCACCT-3'
Sens : 5'-AGGTGGTGAAGCTACAATGTTTTTGGCAATTACAACAATC-3'

P340A-hnRNP A1B (mutation M9) :

Anti-sens : 5'-CCACCACCATAAGCGCCAGAGCTCCTG-3'
Sens : 5'-CAGGAGCTCTGGCGCTTATGGTGGTGG-3'

3.4 Culture Cellulaire et transfection

Les cellules HEK293FT ont été cultivées dans du milieu Eagles modifiés à haute teneur en glycémie de Dulbecco (Dulbecco's High Glucose Modified Eagles Medium, DMEM, Fisher Scientific) supplémenté avec du sérum bovin fœtal 10% et 1% de la glutamine (Sigma).

Les neurones corticaux primaires ont été préparés à partir d'embryons de souris C57BL/6N E18,5, exactement comme publié précédemment (Khalfallah et al., 2018). Les cellules ont été collectées et cultivées pendant 7 jours sur des lamelles de 1,5 H (ThorLabs).

Les cellules SHSY5Y ont été cultivées dans du milieu Eagle modifié à haute teneur en glucose de Dulbecco (DMEM, Fisher Scientific) complété par 10% de FBS et 1% de L-glutamine (Sigma).

Les cellules HEK293FT ont été ajoutées dans une boîte pétrie de 6 cm, les cellules SHSY5Y dans une boîte de pétri de 15cm et transfectées avec différentes combinaisons d'ADNc (800 ng-2 µg au total par plasmide) à l'aide de Lipofectamine LTX avec le réactif Plus (ThermoFisher) selon le protocole du fabricant dans OPTI-MEM (Gibco). Le milieu a été remplacé par un milieu de croissance normal après 3h et les cellules ont été collectées après 24h.

3.5 Lysat et immunoprécipitation

Pour la lyse régulière, les cellules ont été récoltées en utilisant du PBS préalablement refroidi, puis remises en suspension dans du tampon de dosage de radioimmunoprécipitation (RIPA) ainsi que 10 µg/ml de leupeptine (Bioshop), 10 µg/ml de pepstatine (Bioshop), 10 µg/ml de chymotrypsine (Sigma) et 1X d'inhibiteurs de phosphatase (ThermoFisher, 78420).

Pour la lyse d'échantillon pour immunoprécipitation (IP), Les cellules ont été récoltées en utilisant du PBS préalablement refroidi, puis remises en suspension dans un tampon d'IP composé de 50 mM de Tris à pH 7,4, 150 mM de NaCl, 2 mM d'EDTA, 1% de NP-40, ainsi que 10 µg/ml de leupeptine (Bioshop), 10 µg/ml de pepstatine (Bioshop), 10 µg/ml de chymotrypsine (Sigma) et 1X d'inhibiteurs de phosphatase (ThermoFisher, 78420). Les cellules ont ensuite été passées dix fois à travers une aiguille 25G. Les lysats résultants ont été maintenus sur de la glace pendant 20 minutes, puis centrifugés à 16 000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Pour les essais de dépendance de liaison à l'ARN, les lysats ont été traités avec de la ribonucléase A du pancréas bovin (Sigma, R4642) à une concentration finale de 10 µg/ml, et ce traitement a été effectué pendant 30 minutes à 37 °C.

La quantité de protéines dans les lysats a été déterminée à l'aide du dosage BCA (Pierce). Ensuite, des billes de protéine G (ThermoFisher, 10003D) ayant été préalablement couplées à un anticorps anti-Flag de souris (Sigma, F1804, à raison de 5 µg d'anticorps par milligramme de billes), ont été incubées avec 400-500 µg de lysat pendant 45 minutes à température ambiante, en effectuant une rotation. Les billes ont ensuite été lavées six fois avec le tampon IP, et les protéines immunoprécipitées ont été récupérées en les chauffant dans un tampon Laemmli 2,5X.

3.6 Immuno-buvardage

Des quantités équivalentes de lysats ont été soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) à une concentration de 12,5 %. Les protéines ainsi séparées ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose, qui ont par la suite été bloquées en utilisant une solution de lait en poudre à 5 % dans une solution de PBS-T. Par la suite, ces membranes ont été incubées avec des anticorps primaires, l'anti-Flag de souris (dilution 1:5000, Sigma, F1804), l'anti-Myc de chèvre (dilution 1:10 000, CedarLane, A190-104A), l'anti-actine de souris (dilution 1:10 000, MP Biomedicals, 69100) et l'anti-GFP de lapin (dilution 1:5000, Covance, B34).

Ensuite, les membranes ont été exposées aux anticorps secondaires appropriés conjugués à la peroxydase d'hydrogène (HRP) (dilution 1:5000, Jackson ImmunoResearch, anti-chèvre ; 705-035-003, anti-lapin ; 711-035-152, anti-souris ; 715-035-151). Le signal a été révélé en utilisant une solution d'ECL (ThermoFisher), et la détection a été réalisée soit sur des films radiographiques CL-Xposure (ThermoFisher) soit sur un appareil Chemidoc.

3.7 Immunofluorescence et *Proximity Ligation Assay* (PLA)

Les Hek293FT cultivées sur des lamelles 1.5H (ThorLabs) ont été fixées avec 4% PFA/PBS pendant 20 min à température ambiante, perméabilisées avec 0.2% Triton X-100/PBS pendant 10 min et bloquées avec 1%BSA/PBS pendant 30 min à température ambiante avant d'être incubées avec les anticorps primaires indiqués pendant 1h à RT : mouse anti-Flag (1:700, Sigma, F1804), rabbit anti-Caprin1 (1:10 000, Proteintech). Les lamelles ont ensuite été lavées avec du PBS et incubées avec les anticorps secondaires conjugués aux fluorophores appropriés, âne anti-souris Alexa 488 et âne anti-lapine Alexa 594 (1:200, CedarLane) pendant 1h à température ambiante, puis montées à l'aide du réactif Prolong Antifade (ThermoFisher).

Pour l'essai de ligature de proximité, des neurones corticaux primaires cultivés sur des lamelles 1,5 H (ThorLabs) ont été fixées avec 4 % de PFA/PBS pendant 20 minutes et perméabilisées avec 0,2 % de Triton X-100/PBS pendant 10 minutes à température ambiante. Après blocage avec la solution de blocage Duolink pendant 1h à 37°C dans une chambre humide, les lamelles ont été incubées avec une combinaison d'anticorps primaires pendant 1h à température ambiante : lapin anti-hnRNP A1B (anticorps maison, 1:50) (157), anti-Klcl1 de souris (1:50, Santa Cruz, sc-58776), anti-KIF5C de souris (1:50, Santa Cruz, sc-390951), anti-KIF5C de lapin (1:50, ProteinTech, 25897-1-AP), anti-DYNC1H1 de souris (1 : 50, Santa Cruz, sc-514579), anti-Myh9 de souris (1:100, Proteintech, 60233-1-Ig), anti-Flag de souris (1:1000, Sigma, F1804), anti-Myc de lapin (1:1000, Sigma, C3956). Le signal a ensuite été développé à l'aide du Duolink In Situ Red Starter Kit souris (-) / lapin (+) (Sigma) conformément aux directives du fabricant. Pour visualiser les processus neuronaux, les lamelles ont été marquées avec 1X Phalloïdine-488 (Abcam) pendant 20 minutes à température ambiante. Les lamelles ont ensuite été montées sur des lames avec le milieu de montage Duolink In Situ avec DAPI (Sigma).

3.8 Image, analyse et statistiques

Les Images des cellules HEK 293 FT ont été imagées sur le microscope confocal Leica TCS SP5 équipé avec un objectif 40X (1.25 N.A.) à l'huile et le logiciel d'imagerie *Leica Application Suite*.

Les images de l'essai PLA ont été obtenues avec le microscope ZEISS LSM 900 Airyscan 2 objectif 40X à l'huile et le logiciel d'imagerie ZEN version 3.8.

La signification statistique des expériences a été déterminée à l'aide du test Anova à un sens avec le logiciel GraphPad Prism. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (ESM).

3.9 Liste des transcrits

Pour identifier les transcrits qui sont éventuellement liés par la hnRNP A1B et transportés, nous avons croisé deux ensembles de données. Le premier a utilisé des cellules HeLa pour identifier les transcrits liés par la hnRNP A1 (dans la base de données ArrayExpress, numéro d'accès EMTAB-3612) (172) et le second a identifié le transcriptome axonal des motoneurones humains (dans Gene Expression Omnibus, numéro d'accès GSE121069) (173). Pour informer sur la pertinence biologique de ces interactions, des analyses bioinformatiques ont été réalisées à l'aide de Gene Ontology (espèce Homo sapiens, test type Fisher's exact avec p-value >0,05) (167).

3.10 Immunoprécipitation à l'ARN

Les cellules SHSY5Y ont été récoltées en utilisant du PBS préalablement refroidi, puis soumis à un *crosslink* d'UV à 400mJ/cm². Par la suite, les cellules ont été lysées dans une solution sans RNase de 500 mM Tris, pH 7.4, 100mM NaCl, 1% NP-40, 1X, les lysats ont été passés six fois à travers des seringues à aiguille 26G, incubés 20 minutes sur glace, centrifugés à 15 000 g et les surnageants ont été collectés. Les échantillons de 5-8 mg de lysats ont été immunoprécipités à 4°C pendant la nuit avec l'anticorps souris anti-Flag 10 µg (Sigma) pré-lié aux Protein G Dynabeads (ThermoFisher Scientific). Divers lavages ont été effectués avec du tampon lavage sans RNase riche en sels (50mM Tris-HCl pH 7,4, 1M NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,5% sodium de deoxycholate), du tampon de lavage sans RNase (20mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 0,2% Tween-20) et du tampon libre de RNase NT2 0,1% SDS (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0,05% NP-40). Ensuite, les billes ont été resuspendu dans du tampon libre de RNase NT2 0,1% SDS. Les immunoprécipités ont été traités avec de la DNase (Qiagen) et l'ARN a été récupéré avec du trizol (Invitrogen). Une quantité égale d'ARN a été inversement transcrite en utilisant la trousse QuantiTect Reverse Transcription (Quiagen). L'ADNc a été amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) standard avec les amorces suivantes : HNRNPA1 exon 4 sens: 5'-GGGCTTTGCCTTTGTAACCT-3'; HNRNPA1 exon 6 anti-sens: 5'-ACGACCGAAGTTGTCATTCC-3'; CAMK2α sens: 5'-CCACAGGGGCTTTAGGAGA-3'; CAMK2α anti-sens: 5'-GCTGCTGCCGCTTTTGTA-3' ; HSPA8 sens: 5'-ACTAATGACAAGGGCCGTTTGAG-3'; HSPA8 anti-sens: 5'-CCTCCTTCAATGGTGGGCCCTGAGG-3'; Actb sens, 5'-TCACCACCACGGCCGAGCGGG-3'; Actb antisens: 5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'. Les produits PCR ont été ensuite soumis à un gel d'électrophorèse 2% agarose.

4 Résultats

4.4 hnRNP A1B interagit et co-localise avec des protéines motrices

4.4.1 hnRNP A1B interagit avec des protéines impliquées dans le métabolisme et transport de l'ARN

Tout d'abord, il a été montré précédemment que les isoformes de *HNRNPA1*, possèdent des différences au niveau de leur séquence, ainsi que dans leur localisation cellulaire (101, 154, 157). Au niveau de leur localisation, hnRNP A1B peut être nucléaire et cytoplasmique dans les neurones, tandis que hnRNP A1 est majoritairement nucléaire (157).

Afin de mieux approfondir la distinction des isoformes hnRNP A1B et hnRNP A1, une immunoprécipitation suivie d'une spectrométrie de masse (IP-MS) fut effectuée (Figure 9A et B). Cette expérience fut produite à l'aide d'un anticorps spécifique à l'isoforme hnRNP A1B (anticorps maison) afin d'identifier des partenaires d'interaction cytoplasmique et nucléaire. À partir de la liste de potentiels partenaires d'interaction obtenue, seules les protéines présentant un enrichissement d'au moins 2 fois en nombre de peptides par rapport au contrôle IgG dans les trois réplicats (Figure 9B), ont été considérées comme interaction de haute-fidélité. Ensuite, la liste fut comparée aux partenaires de liaison hnRNP-A1 répertoriés auparavant dans la littérature (BIOGRID (165) et GPS-Prot (166)). Il peut être observé que certains résultats dans la liste des peptides récupérés sont des protéines de liaison à l'ARN et protéines motrices. Notamment, on retrouve des protéines de la famille myosine IIa non musculaire (MYH9, MYO18A, MYH10, MYL6, MYL12b), kinésine-1 (KIF5C/KLC1), la chaîne lourde de la dynéine (Dync1h1) et d'autres hnRNP's (hnRNP A2B1, hnRNP C, hnRNP K...). En effet, toutes ces protéines sont retrouvées dans les neurites (cytoplasme) et noyau des neurones, ce qui coïncide avec la localisation différentielle de l'isoforme hnRNP A1B. Aussi, quasiment toutes les protéines motrices n'avaient jamais été répertoriées préalablement comme partenaires d'interaction de la hnRNP A1.

Par ailleurs, des analyses *in silico* avec STRING (168) et par Gene Ontology (167) (Figure 10 A et B) ont été réalisées pour déterminer dans quelle voie cellulaire la hnRNP A1B pouvait être impliquée. Ces logiciels permettent notamment d'identifier des potentielles associations fonctionnelles entre les protéines et leurs interactions. Premièrement, l'analyse STRING (Figure

10A) a permis d'identifier plusieurs sous-groupes de protéines associés notamment à l'activation du complément (orange), le transport dépendant de l'actine (jaune), le transport dépendant au microtubule (vert), les modificateurs du cytosquelette (bleu) et le métabolisme de l'ARN (rouge). Ensuite, l'analyse par Gene Ontology (Figure 10B) a permis de déterminer trois associations fonctionnelles ; métabolisme d'ARN, inflammation et transport dépendant du cytosquelette. Donc, ces résultats suggèrent que l'isoforme hnRNP A1B aurait potentiellement un rôle dans le transport dépendant au cytosquelette grâce à des éventuelles interactions avec des protéines motrices et/ou d'autre protéine de liaison à l'ARN.

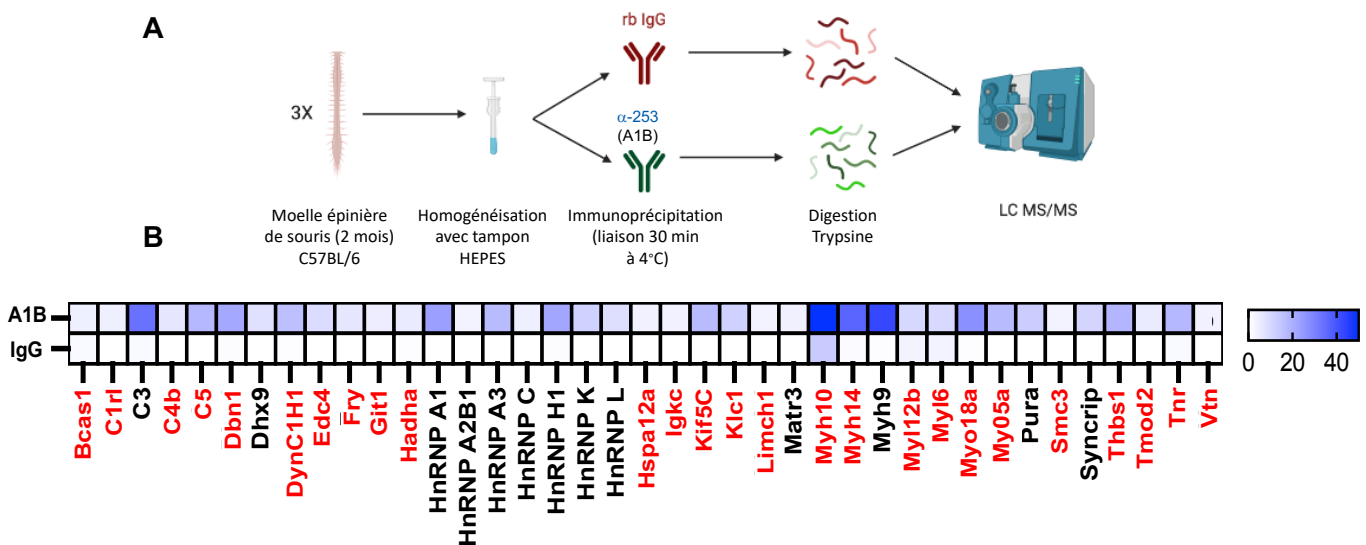
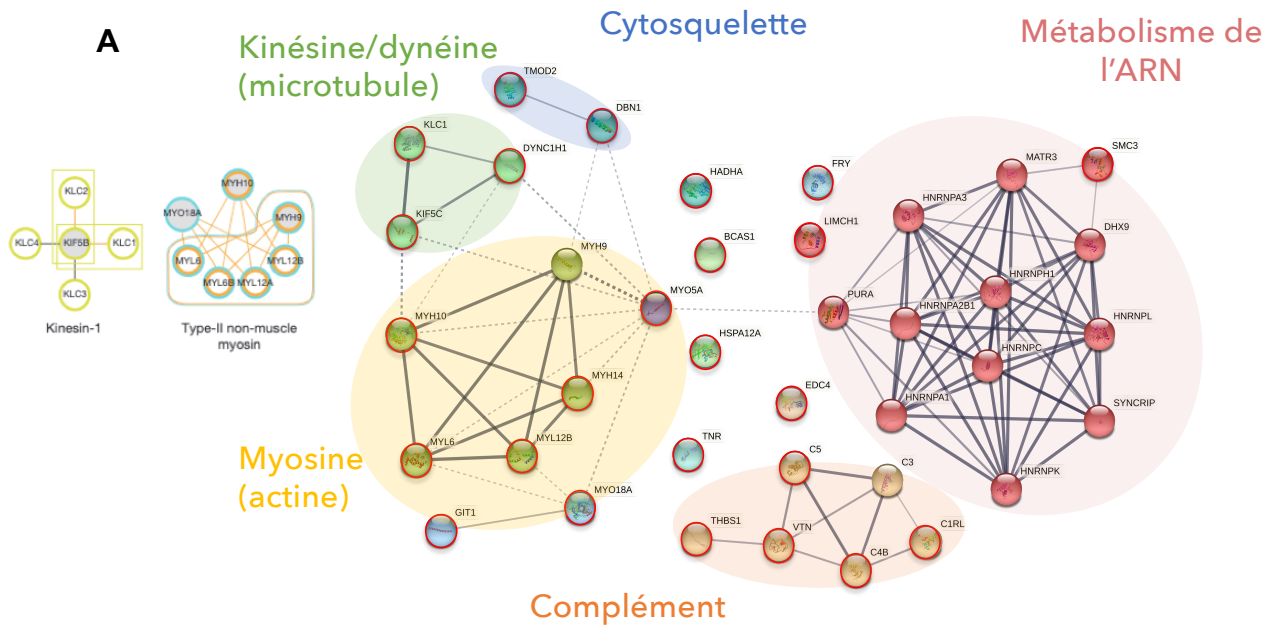


Figure 9. hnRNP A1B lie des partenaires d'interaction n'ayant jamais été répertoriés pour hnRNP A1 auparavant.

(A) Schéma expérimental de l'essai IP/LC-MS/MS réalisé à partir de moelle épinière de souris de 2 mois C57BL/6N immunoprécipitée avec une IgG anti-hnRNP A1B ou une IgG de contrôle. (B) Carte thermique des moyennes du nombre de peptides des interacteurs identifiés (enrichissement d'un facteur 2 du nombre de peptides par rapport au contrôle dans 3 réplicats), en rouge les protéines qui n'ont pas été précédemment répertoriés comme partenaire d'interaction de la hnRNP A1 (GPS-prot et BIOGRID combinés (165, 166)).



B

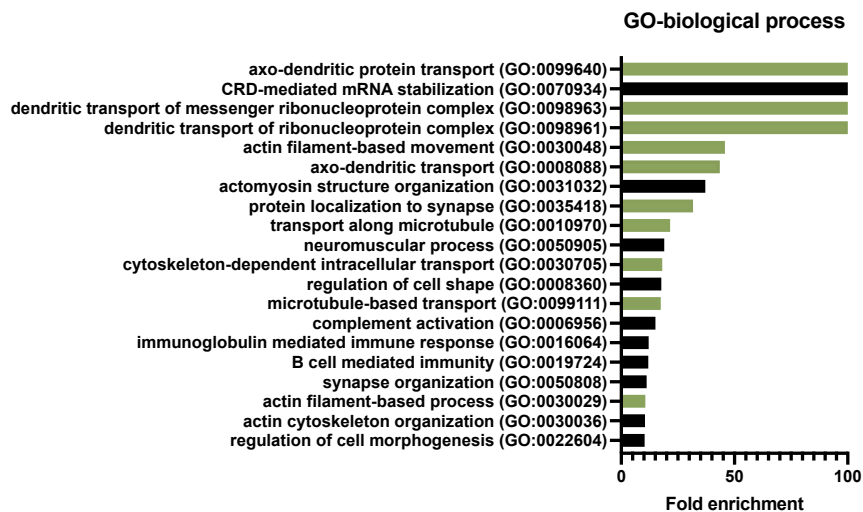


Figure 10. Les partenaires d'interaction de hnRNP A1B sont impliqués dans le métabolisme de l'ARN, le transport dépendant du cytosquelette et dans l'inflammation.

(A) Réseau STRING, l'épaisseur indique la force des données justificatives, clustering de Markov avec des paramètres d'inflation de 5, les lignes pointillées indiquent l'interaction entre les clusters (38 nœuds, 92 arêtes, 16 arêtes attendues, valeur p de l'enrichissement $PPI < 1,0 \times 10^{-16}$), les interacteurs qui n'ont pas été précédemment répertoriés comme partenaire d'interaction de la hnRNP A1 sont soulignés en rouge (168). (B) Gene Ontology Biological process (espèce *Mus musculus*, test type Fisher's exact with p-value > 0.05), un seuil d'enrichissement > 10 a été appliqué, le vert indique les voies cellulaires en lien avec le transport dépendant du cytosquelette (167).

4.4.2 Validation des interactions pour la hnRNP A1B et leur localisation

Dans le but de valider les partenaires d'interaction et évaluer la spécificité des interactions avec les isoformes de *HNRNPA1* avec les protéines motrices, des expériences de co-immunoprécipitation ont été effectuées à l'aide de cellules HEK293FT co-exprimant flag-hnRNP A1/A1B et différentes protéines motrices étiquetées avec Myc ou GFP.

Dans un premier temps, une évaluation des interactions avec la chaîne légère de kinésine 1 (Klc1), l'isoforme 5C de la chaîne lourde de kinésine (KIF5C) (transport antérograde), et la Myosine-9 (MyH9) (transport dépendant de l'actine) a été effectuée. Les résultats des co-immunoprécipitations ont validé que Klc1, KIF5C et MyH9 pouvaient être co-immunoprécipités par les isoformes de *HNRNPA1* (Figure 11 A, B, C, D). De plus, il existe une tendance au niveau du degré de liaison des protéines motrices aux isoformes de la *HNRNPA1*. En effet, une quantité légèrement supérieure de Klc1 et Myh9 est co-immunoprécipités par l'isoforme hnRNP A1B. Il peut être observé que la bande correspondante à KLC1 est plus abondante pour la hnRNP A1B (Figure 11 A). D'une autre part, la bande de Myh9 (Figure 11 C) est quasiment identique à celle co-immunoprécipitée par la hnRNP A1 alors que de plus faibles quantités de la hnRNP A1B ont été immunoprécipité.

Deuxièmement, concernant l'interaction avec KIF5C, celle-ci présente un faible niveau pour les deux isoformes. Cela est potentiellement dû au fait que les protéines kinésine-1 lient généralement leur cargaison par l'intermédiaire des chaînes légères de kinésine. Pour vérifier si l'interaction entre KIF5C et HNRNPA1 était donc médiée par Klc1, les deux sous-unités ont été surexprimées dans les cellules. En effet, les résultats obtenus montrent une augmentation de la co-immunoprécipitation de KIF5C pour les deux isoformes de HNRNPA1 (Figure 11 D). De plus, la quantité co-immunoprocipité du complexe par la hnRNP A1B semble être plus importante, puisqu'une plus faible quantité de la hnRNP A1B fut immunoprécipitée.

Donc, ces résultats suggèrent que les deux isoformes de HNRNPA1 peuvent interagir avec les protéines motrices du cytosquelette, mais la présence et la force de ces interactions peuvent dépendre du contexte cellulaire.

Puis, étant donné que *HNRNPA1* code pour une protéine de liaison à l'ARN, est-ce que cette liaison est nécessaire pour l'association avec les protéines motrices ? Afin de répondre à cette question, un traitement à l'ARNase fut effectué pour la condition hnRNP A1B et KLC1. Les résultats obtenus montrent que la quantité de Klc1 récupérée après immunoprécipitation de la hnRNP A1B est restée

semblable (Figure 11 E). Ceci suggère que l'interaction entre la hnRNP A1B et Klc1 est indépendante de la liaison à l'ARN.

Finalement, une particularité de l'isoforme hnRNP A1B, est que celle-ci peut localiser dans les neurites (157), et les protéines motrices sont aussi connues pour cette localisation (86). De plus, il est répertorié que les protéines motrices sont en proximité des granules de transport dans les neurites (72). Ainsi, pour valider la localisation de l'interaction entre la hnRNP A1B et les protéines motrices, des tests de ligature de proximité (*PLA*) ont été effectués entre hnRNP A1B et KLC1, Myh9 et la chaîne lourde de la dynéine (*Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1-DYNC1H1*) dans des neurones corticaux primaires. Cet essai permet de montrer que deux protéines sont en proximité à moins de 40 nm (174) et nous permet de valider davantage les interactions avec les protéines motrices. Les résultats soulèvent que des interactions peuvent être observées dans le soma et les processus neuronaux pour la hnRNP A1B et les protéines motrices Klc1 et MyH9 (Figure 12). De plus, on a été capable de montrer une proximité avec la protéine DynC1H1 (Figure 12), ce qui valide que la hnRNP A1B peut interagir avec les trois classes de protéines motrices dans les neurites. Aussi, ces résultats valident que les potentiels granules de la hnRNP A1B dans les neurites sont en proximité avec les protéines motrices. Des résultats comparables ont été obtenus pour le contrôle positif Klc1-KIF5C, connu pour former le complexe de la kinésine-1. Puis, un contrôle négatif (Myc-Flag), deux protéines qui ne sont pas présentes dans les neurites, a été aussi effectué pour valider le processus expérimental et éviter des faux positifs.

Globalement, les résultats montrent que la hnRNP A1B interagit et est en proximité avec les protéines motrices au sein des neurites et appuient donc l'hypothèse que cette isoforme possède une fonction cytoplasmique. Mais comment la hnRNP A1B peut interagir avec les protéines motrices ?

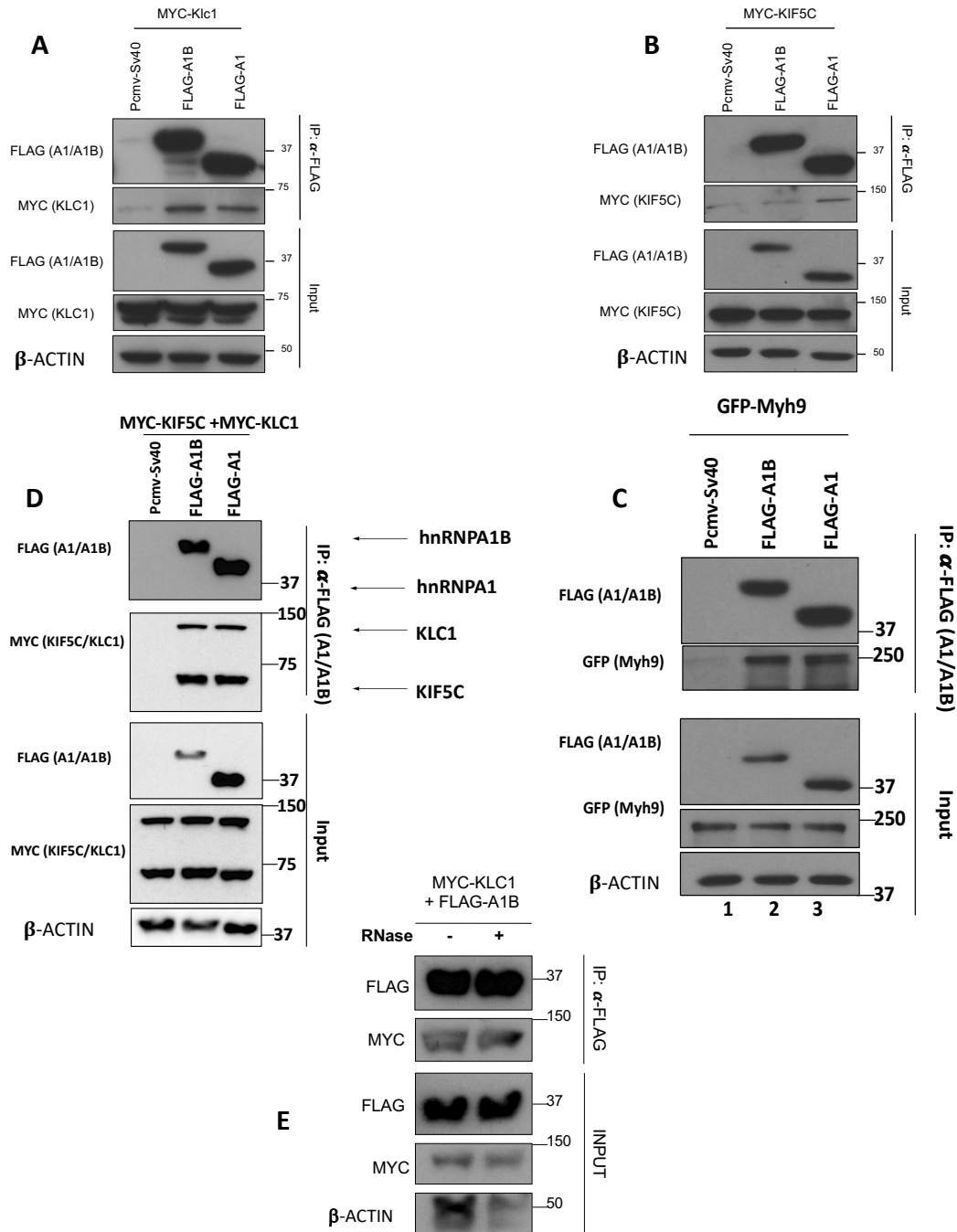


Figure 11. hnRNP A1B interagit avec des protéines de la machinerie du transport dans un contexte indépendant à l'ARN.

(A, B, C, D) Immunoprécipitation à partir de cellule HEK293FT sur-exprimant Flag-hnRNP A1B, Flag-hnRNP A1 ou vecteur vide avec (résultats représentatifs, n=3), (A) myc-KLC1 (B) myc-KIF5C (C) GFP-MyH9 (D) myc-KLC1+myc-KIF5C (E) Immunoprécipitation de hnRNP A1B à partir de cellule HEK293FT sur-exprimant Flag-hnRNPA1B avec myc-KLC1 avec ou sans traitement à la RNase, résultats représentatifs, n=2.

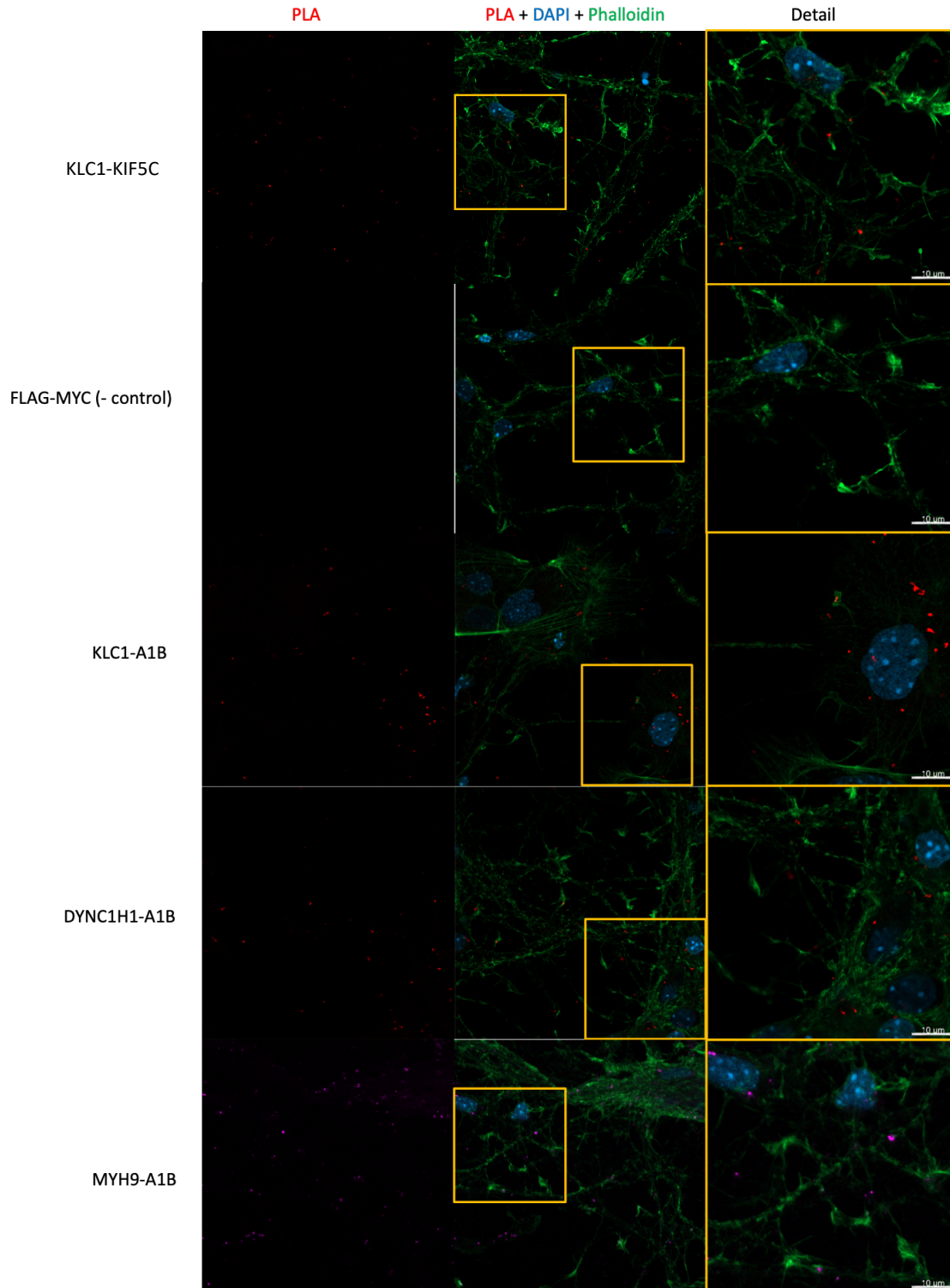


Figure 12. hnRNP A1B co-localise en proximité avec les protéines motrices dans les neurites. Essai de ligature de proximité entre hnRNP A1B et les protéines motrices KLC1, DYNC1H1 et MYH9 dans le processus neuronal des neurones corticaux primaires, Klc1 et KIF5C, Flag et Myc ont été utilisés comme contrôle positif et négatif, barre d'échelle = 10 μ m, meilleures images représentatives de n=1.

4.4.3 Le motif acide-Y est-il une partie du mécanisme d'interaction de la hnRNP A1B et KLC1 ?

Les protéines motrices présentent une capacité remarquable à interagir avec une large variété de cargos et d'adaptateurs (175). Dans la littérature, il est connu que les motifs WD-acide et Y-acide facilitent l'interaction entre les cargos et Klc1 (176, 177). Afin de déterminer si *HNRNPA1* pourrait interagir avec Klc1 par la présence de ces motifs, une analyse approfondie de la séquence de la protéine a été effectuée.

Tout d'abord, le motif WD-acide ne semble pas présent dans la séquence peptidique de *HNRNPA1* (données non montrées). Cependant, une séquence ressemblant au motif Y-acide a été identifiée dans le domaine globulaire de *HNRNPA1*. Par la suite, cette séquence a été comparée à des motifs Y-acides déjà répertoriés dans la littérature, tels que dans SHD26, JIP1, et TorsinA (170, 176). Cette comparaison a montré la présence des deux éléments essentiels du motif : des extrémités acides (D/E) et un cœur hydrophobe (I/Y/L/F...) (Figure 13A).

En outre, pour vérifier la conservation évolutive de ce motif, un alignement multiple a été réalisé à l'aide de l'outil Clustal Omega (178), à partir des séquences de la hnRNP A1 de diverses espèces. Les résultats de l'alignement ont soulevé un degré élevé de conservation de ce motif entre les différentes espèces (Figure 13B).

A		Motif Y-acide	
	SH2D6	172-PDE DIYLE CE-	
	JIP1	704-PTED DIYLE ^{COOH}	
	TorsinA	704-TKL DYYLD ^{COOH}	
	hnRNP A1B/A1	120-HLRD- YFE QY-	
B		Motif Y-acide	
hnRNP-A1-ZEBRAFISH	TTVKKIFVGGIKDDTEENHLR DYFD QFGKIEVVEIMVDHKTGNKRGFAFVTFDDHDSVDR		180
hnRNP-A1-FROG	LTVKKIFVGGIKEDTEEHHLR EYFE QYGKIEVIEIMTDRGSGKKRGFAFVTFEDHDSVDK		161
hnRNP-A1-HUMAN	LTVKKIFVGGIKEDTEEHHLR DYFE QYGKIEVIEIMTDRGSGKKRGFAFVTFDDHDSVDK		161
hnRNP-A1-MOUSE	LTVKKIFVGGIKEDTEEHHLR DYFE QYGKIEVIEIMTDRGSGKKRGFAFVTFDDHDSVDK		161
hnRNP-A1-POLAR-bear	LTVKKIFVGGIKEDTEEHHLR DYFE QYGKIEVIEIMTDRGSGKKRGFAFVTFDDHDSVDK		161

Figure 13. Identification du motif Y-acide dans *HNRNPA1*.

(A) Alignement du motif de *HNRNPA1* avec les autres motifs Y-acide (rouge) déjà répertoriés dans la littérature (B) Alignement de séquences hnRNP A1 de diverses espèces, en rouge le motif Y-acide identifié.

Deuxièmement, il est établi dans la littérature que la substitution de l'acide aminé tyrosine du motif par l'alanine grâce à une mutation ponctuelle (Y→A) dans le motif de JIP1 (179) inhibe l'interaction avec Klc1. De plus, dans certains cas familiaux de SLA, l'acide aminé polaire non chargé, la glutamine, subit une mutation en arginine, ce qui introduit une charge positive adjacente au motif (180). Par conséquent, suite à l'identification de ce motif, deux variantes de *HNRNPA1* ont été conçues, Y124A et Q127R, afin d'évaluer la fonctionnalité du motif.

Tout d'abord, étant donné que les mutants *HNRNPA1* dans la SLA ont tendance à s'agréger de manière aberrante, l'expression de ces variantes mutantes a été évaluée. Cette évaluation a été effectuée, à l'aide de cellules HEK293-FT exprimant la Flag-hnRNP A1/A1B (WT, Y124A, Q127R), via deux méthodes complémentaires : Western Blot (WB) (Figure 14A), et Immunofluorescence (IF) (Figure 14B). Les résultats indiquent un profil d'expression satisfaisant par WB et une tendance à l'agrégation minimale par IF.

Par la suite, afin d'évaluer l'interaction entre Klc1 et les mutants *HNRNPA1*, des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées en utilisant des cellules co-exprimant Flag-hnRNP A1/A1B (WT, Y124A, Q127R) et Myc-Klc1. Les résultats de l'essai de co-immunoprécipitation (figure 14C), montrent que les mutants Y124A et Q127R interagissent avec la protéine motrice Klc1. En outre, pour mieux comprendre ces interactions, des quantifications et des analyses statistiques, telles que l'ANOVA à sens unique, ont été effectuées (Figure 14D). Les résultats de ces analyses soulèvent que, par rapport à la condition WT, il n'y a pas de variation statistiquement significative dans la co-immunoprécipitation de Klc1 pour les mutants. Cependant, une tendance semble suggérer que les mutations de la hnRNP A1B renforcent potentiellement l'interaction avec Klc1, alors que pour la hnRNP A1, ces mutations semblent diminuer l'interaction (Figure 14 C et D).

En résumé, ces données soulignent la présence d'un motif apparenté au motif Y-acide. Cependant, ce motif à lui seul ne permet pas l'interaction directe avec Klc1. Puis l'impact de ce motif sur l'interaction avec Klc1 semble plutôt dépendre de l'isoforme de *HNRNPA1*.

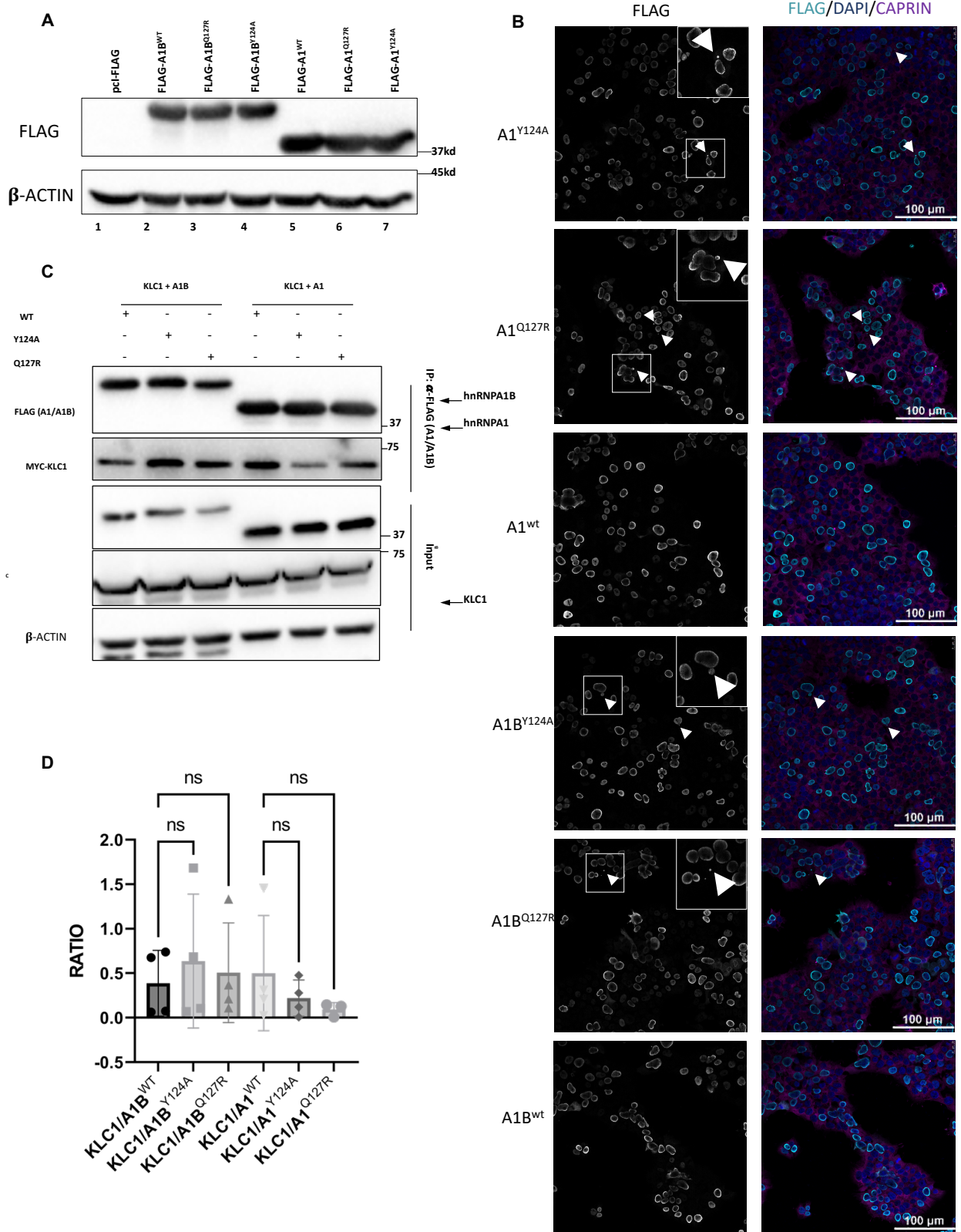


Figure 14. Le motif Y-acide est non fonctionnel dans *HNRNPA1*.

(A) Western Blot, (B) Immunofluorescence, (C) Immunoprécipitation, de HEK293FT exprimant Flag-hnRNP A1B et hnRNP A1, WT, mutant qui inhibe l'interaction avec Klc1 (Y124A) ou

mutant SLA (Q127R), (A) blots représentatives, n=2. (B) Caprin : marqueur cytosolique, DAPI marqueur nucléaire, les flèches blanches soulignent des agrégats protéiques, barre d'échelle = 100 μm , images représentatives de n=1. (C) Immunoprécipitation de cellules co-exprimant Myc-Klc1, pour évaluer l'interaction avec les mutants, blots représentatives, n=4. (D) Quantification densitométrique (moyenne +/- SEM) du ratio Myc/Flag par ImageJ. Cette figure est représentative de n=4, un point fut exclu pour la condition Klc1/ A1^{Q127R} selon le test de Grubbs, ns : non significatif.

4.5 hnRNP A1B dans le contexte pathologique de la SLA : impact des mutations sur les interactions avec les protéines motrices

Les résultats précédents suggèrent que la mutation SLA dans le domaine globulaire de *HNRNPA1* (Q127R) aurait un impact sur l'interaction avec la kinésine (Figure 14). Les mutations associées à la maladie sont majoritairement situées dans le domaine C-terminal (Figure 7). En particulier, dans plusieurs modèles, les mutations favorisent la localisation cytoplasmique et l'agrégation de la hnRNP A1 (D262V, P288A) (161-163). Il a été démontré que l'expression de la mutation D314V de la hnRNP A1B, augmente l'agrégation de la hnRNP A1B et que certaines mutations sont spécifiques à l'exon 7B telles que G283R (141). Afin d'étudier l'impact des mutations de la SLA au niveau des interactions avec les protéines motrices, trois autres variantes de la hnRNP A1B ont été conçues, G283R (exon 7B), D314V (RID) et P340A (M9).

Tout d'abord, étant donné que les mutants *HNRNPA1* dans la SLA ont tendance à s'agréger de manière aberrante, l'expression de ces variantes mutantes a été évaluée. Cette évaluation a été effectuée, à l'aide de cellules HEK293-FT exprimant la Flag-hnRNP A1B (WT, G283R, D314V, P340A), via deux méthodes complémentaires : Western Blot (WB) (Figure 15A), et Immunofluorescence (IF) (Figure 15B). Les résultats indiquent un profil d'expression satisfaisant par WB et une tendance à l'agrégation minimale par IF. Cependant, dans ce modèle, la localisation cytoplasmique ne semble pas être accentuée (Figure 15 B).

Par la suite, afin d'évaluer l'interaction entre les protéines motrices et les mutants hnRNP A1B, des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées en utilisant des cellules co-exprimant Flag-hnRNP A1B (WT, G283R, D314V, P340A) et Myc-Klc1 ou GFP-Myh9. Les résultats de l'essai de co-immunoprécipitation (Figure 16 A et B), montrent que les mutants de la hnRNP A1B interagissent avec Klc1 et Myh9, mais de forces différentes. En effet, la mutation P340A de la hnRNP A1B semble favoriser l'interaction avec les protéines motrices. Ainsi, pour mieux comprendre ces variations d'interaction, des quantifications et des analyses statistiques, telles que

l'ANOVA à sens unique, ont été effectuées (Figure 16 C et D). Les résultats de ces analyses soulèvent que, par rapport à la condition WT, il n'y a pas de variation statistiquement significative dans les co-immunoprécipitations des protéines motrices pour les mutants. Cependant, une tendance semble suggérer que la mutation G283R de la hnRNP A1B renforcent potentiellement l'interaction avec Klc1, alors que pour Myh9, cette mutation semble ne pas avoir un impact au niveau de l'interaction (Figure 16 C et D).

Ainsi, ces données suggèrent que les mutations peuvent avoir un impact différent selon le type de protéines motrices associées avec la hnRNP A1B.

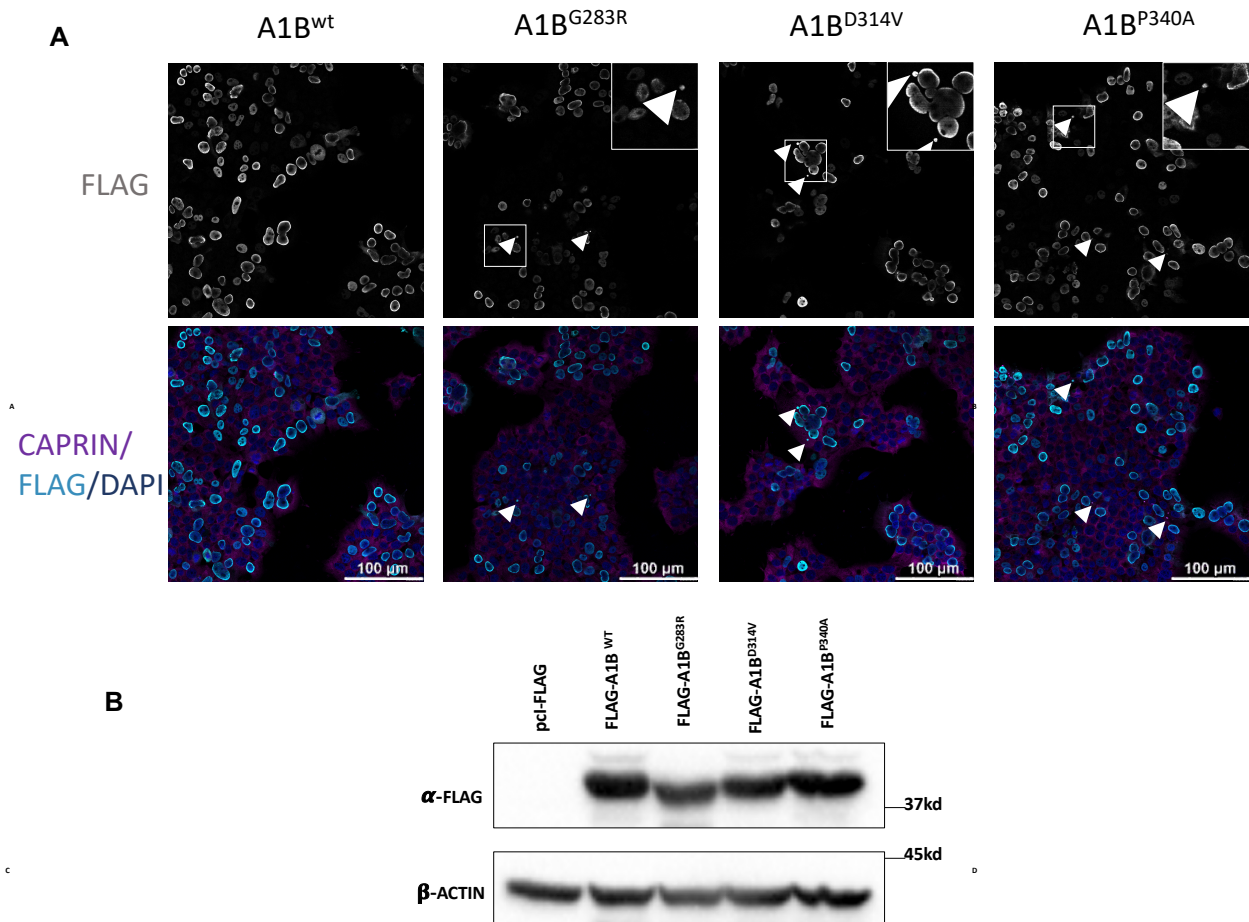


Figure 15. Expression des mutants SLA de la hnRNP A1B dans des cellules HEK293FT.

(A) Immunofluorescence, (B) Western Blot de HEK293FT exprimant Flag-hnRNP A1B, WT, G283R, D314V, P340A. (A), Caprin : marqueur cytosolique, DAPI marqueur nucléaire, les flèches blanches soulignent des agrégats protéiques, barre d'échelle = 100 μm, images représentatives de n=1. (B) blots représentatives, n=2.

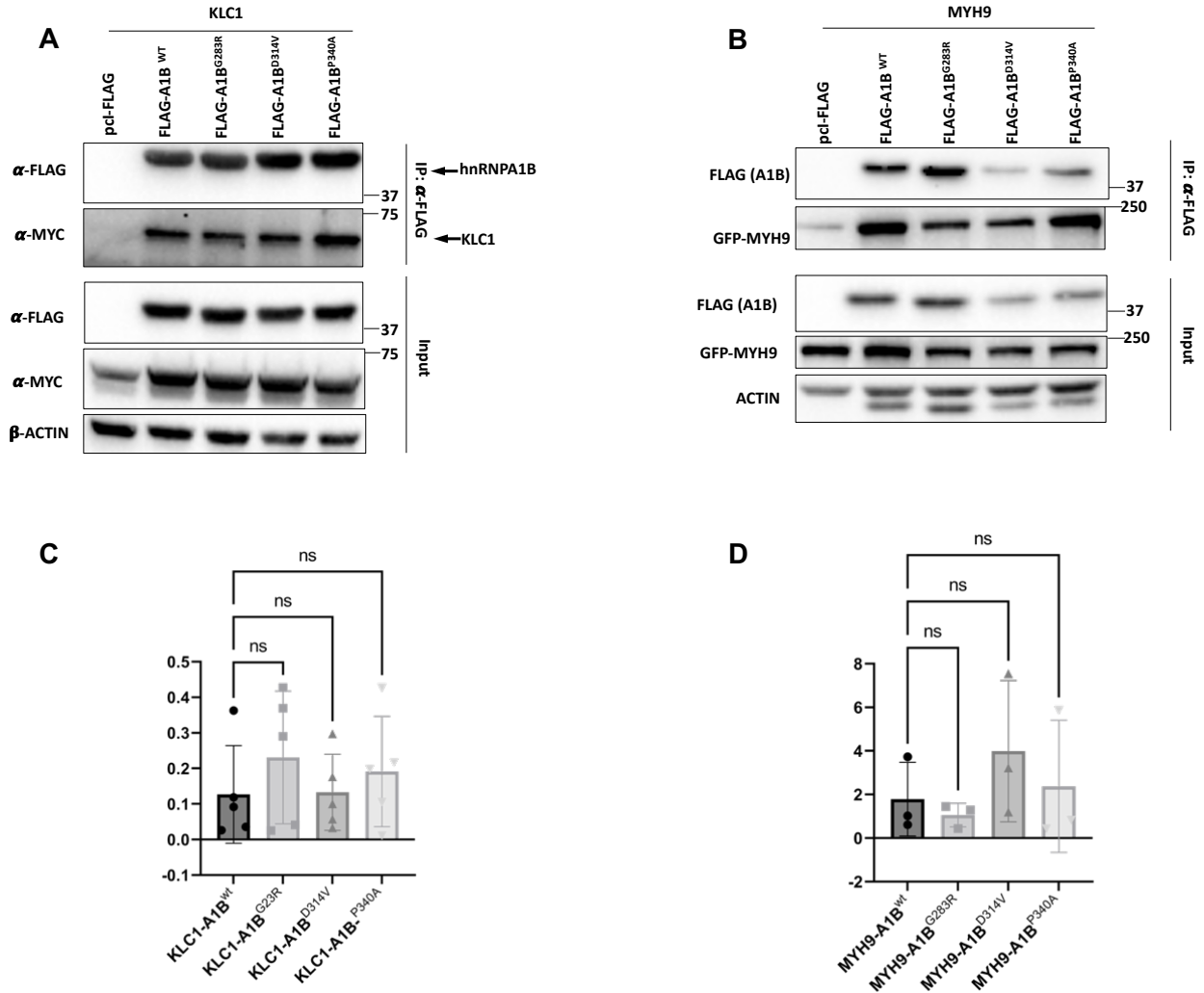


Figure 16. Les mutants SLA de la hnRNP A1B ont potentiellement un impact au niveau des interactions avec les protéines motrices.

(A,B) Immunoprécipitation de cellules Hek293ft co-exprimant Flag-hnRNP A1B, (WT, G293R,D314V,P340A) et (A) Myc-Klc1 ou (B) GFP-Myh9, pour évaluer l'interaction avec les mutants de la SLA, résultats représentatifs, (A) n=5 et (B) n=3. (C, D) Quantification densitométrique (moyenne +/- SEM) du ratio (C) Myc /Flag, (D) GFP/Flag par ImageJ de l'ensemble des expériences d'immunoprécipitation, ns : non significatif.

4.6 hnRNP A1B : une protéine de liaison à l'ARN

Les protéines de liaison à l'ARN (PLA) s'assemblent avec leurs transcrits en assemblages macromoléculaires de ribonucléoprotéines (RNP) appelés granules RNP. Ces assemblages de RNP sont ensuite transportés à l'intérieur des cellules par des protéines motrices. Pour déterminer de manière préliminaire les transcrits transportés par la hnRNP A1B au sein des neurites, une analyse de chevauchement a été réalisée entre les données CLIPseq de la hnRNP A1 humaine (172) et le transcriptome axonal des motoneurones humains (173). Cette intégration de données a dévoilé l'association de 51 transcrits spécifiques avec l'hnRNP A1B (Figure 17A).

Ensuite, une analyse de Gene Ontology (167) a été réalisée pour mettre en évidence les points communs entre ces transcrits. Cette étude est importante, car la littérature décrit généralement que les transcrits associés aux mêmes voies cellulaires sont fréquemment transportés et régulés par les mêmes PLA (62). Les résultats (Figure 17B) montrent que les transcrits sont associés dans des voies cellulaires de régulation comme la régulation du métabolisme, mort cellulaire, apoptose, réponse au stress et traduction. Ces mécanismes de régulation sont très importants pour l'homéostasie des neurones.

Suite à ces résultats, un essai d'immunoprécipitation de l'ARN (RIP) a été réalisé pour valider la capacité de la hnRNP A1B à se lier à divers transcrits identifiés. Premièrement, afin d'étudier si la hnRNP A1B participe au transport des ARNm dans les neurites, un RIP fut effectué avec le transcrit ACTB qui est connu dans la littérature pour faire partie des granules d'ARN des neurites (181). Les résultats (figure 17C) ont confirmé l'interaction de la hnRNP A1B avec ce transcrit. Ensuite, un RIP fut effectué avec le transcrit *Camk2 α* , même si celui-ci n'était pas dans la liste, afin d'évaluer si la hnRNP A1B pouvait participer au transport dans les dendrites. En effet, ce transcrit fait partie des granules d'ARN des dendrites (62, 182) et les résultats du RIP (figure 17C) montre que la hnRNP A1B peut lier cet ARNm. Aussi, la validation de l'interaction avec le transcrit de la chaperonne HSPA8, importante pour la protéostase des neurones, fut effectuée. Les résultats (figure 17C) ont confirmé l'interaction de la hnRNP A1B avec ce transcrit. De plus, comme la hnRNP A1 est connue pour son mécanisme d'autorégulation dans l'épissage de son ARN, l'interaction avec le transcrit hnRNP A1 et hnRNP A1B fut évaluée. Les résultats soulèvent que la hnRNP A1B peut interagir avec les deux transcrits.

En conclusion, ces résultats montrent que la hnRNP A1B peut lier des ARNm faisant partie des granules d'ARNm dans les neurites. Aussi des ARNm important pour l'homéostasie des neurones

comme la chaperonne HsPA8 et il est capable de lier son propre transcrit avec celui de l'isoforme hnRNP A1. En résumé, ces résultats appuient l'hypothèse que la hnRNP A1B participe dans le transport des ARNm dans les neurones et serait potentiellement impliqué dans un mécanisme d'autorégulation de son ARN.

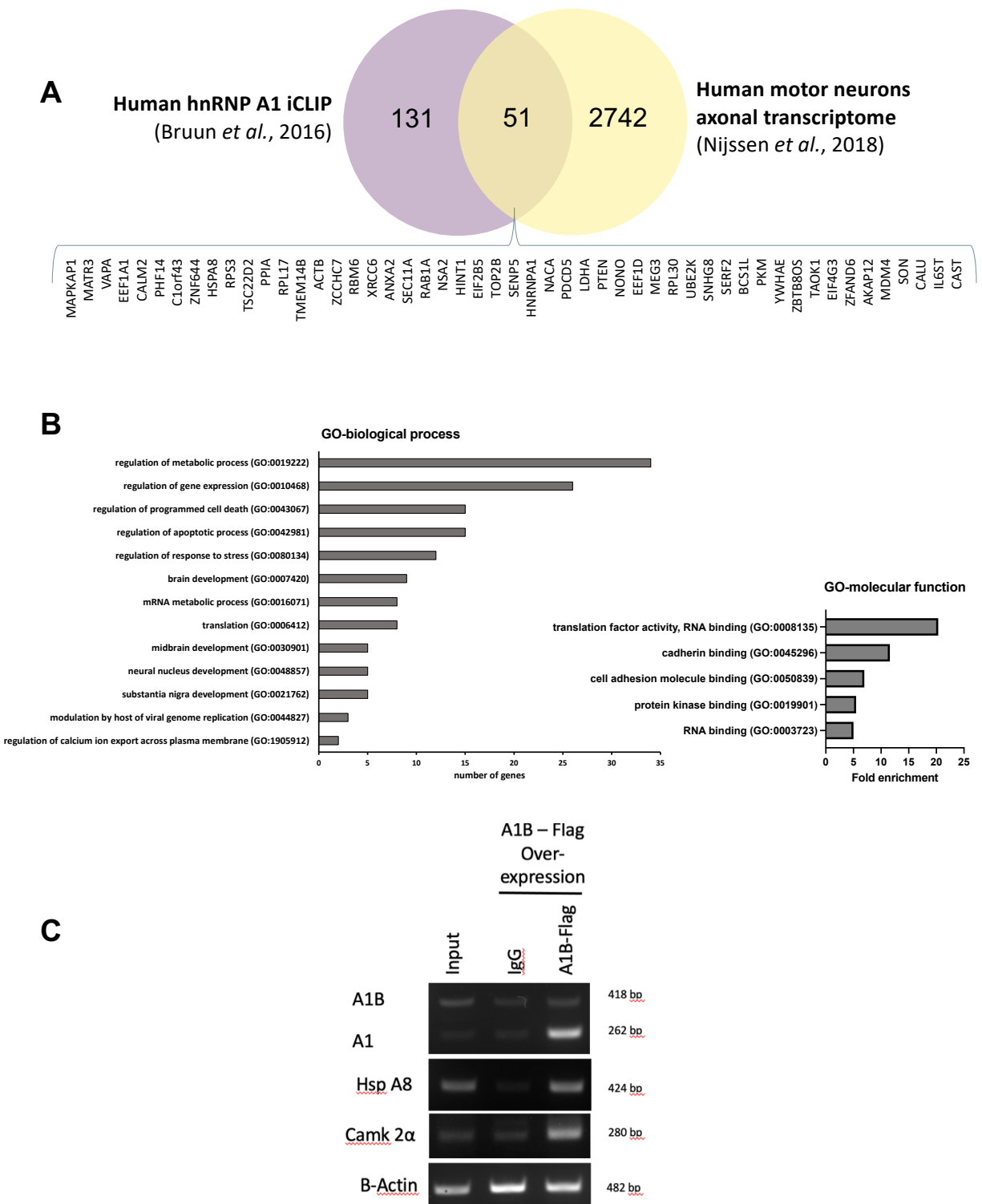


Figure 17. La hnRNP A1B peut interagir avec des ARNm spécifiques au compartiment axonal.

(A) Diagramme de Venn des transcrits liés par la hnRNP A1 (iCLIP) (Bruun *et al.*, 2016) et transcriptome axonal des motoneurones humains (Nijssen *et al.*, 2018), identification de 51 transcrits communs. (B) Gene Ontology (espèce *Homo sapiens*, test de type Fisher's exact avec p -value $>0,05$), selon le nombre de gènes commun et un seuil d'enrichissement par pli >5 a été appliqué, pour la fonction moléculaire. (C) RNA-IP de cellule SH-SY5Y exprimant flag-hnRNP A1B, $n=3$.

5 Discussion

5.1 HNRNPA1, des protéines des granules mRNP du transport dans les neurones

Le transport des ARNm dans les axones et les dendrites permet la synthèse locale de protéines dans des sites spécifiques afin de répondre à divers besoins dans les neurones. Les interactions ARNm-protéines sont à l'origine de cette régulation post-transcriptionnelle, mais les connaissances sur les protéines de liaison à l'ARN (PLA) dans les neurites sont limitées.

Les hnRNPs sont connues pour leurs multiples fonctions dans le métabolisme de l'ARN dans le noyau, mais très peu est caractérisé par rapport à leurs fonctions dans le transport des ARNm. Plusieurs hnRNPs telles que hnRNP A2/B1, hnRNP H1, hnRNP K, hnRNP U et hnRNP A1 sont connues pour leur implication dans le transport d'ARNm dans les cellules, notamment les neurones. Cependant, les études se basent sur l'identification d'ARNm liés par ces protéines dans les neurites sans aucune caractérisation du mécanisme derrière l'assemblage des granules de transport et leur interaction avec les protéines motrices. Sont-elles capables de lier les protéines motrices ou doivent-elles faire appel à un intermédiaire (adaptateur) ? Les granules sont-ils composés de diverses hnRNPs ou une seule hnRNP est suffisante pour effectuer le transport ? C'est des questions que de nos jours restent encore à élucider.

La première partie de cette étude, a permis de valider que la hnRNP A1B interagit et est en proximité dans les neurites avec les trois classes de protéines motrices impliquées dans le transport (kinésine, dynéine, myosine) (Figure 8-10). En effet, cette validation d'interaction est l'une des premières effectuées par rapport aux hnRNP impliqué dans le transport des ARNm. De nos jours, seules la hnRNP U et la hnRNP P2 (FUS) (183) ont aussi été validées comme interacteurs de protéines motrices par la technique d'immunoprécipitation.

Cette interaction semble être aussi plausible avec l'autre isoforme hnRNP A1. Se partagent d'interactions est potentiellement dû au fait que, même si la hnRNP A1 est majoritairement nucléaire, diverses études montrent qu'elle joue un rôle important dans la régulation de la traduction de divers mRNA, favorisant leur localisation cytoplasmique. Puis, certaines modifications post-traductionnelles peuvent favoriser sa localisation dans le cytoplasme.

Cependant, la hnRNP A1B ayant un pool cytoplasmique, serait plus favorable à des interactions protéine-protéine menant plus facilement à la séparation de phase et donc à l'assemblage des complexes mRNP impliqués dans le transport (81-83). Des études futures devraient être effectuées pour vérifier à quel degré les fonctions entre les deux isoformes sont partagées, différenciées ou un travail d'équipe.

5.1.1 la hnRNP A1B une PLA des granules mRNP dans les axones

Le transport des ARNm est essentiel pour les axones afin de maintenir leur morphologie et leurs fonctions. Les protéines de liaison à l'ARN forment des complexes avec les ARNm et régulent le transport des ARNm vers les axones, tout en les traduisant localement en protéines. La traduction locale des ARNm se produit activement au cours du développement et de la détérioration des neurones et joue un rôle important dans l'allongement des axones, la régénération et la formation des synapses. Cependant, les connaissances sur les protéines de liaison à l'ARN (PLA) dans les axones sont limitées.

Puisque la hnRNP A1B est une PLA et elle interagit avec les protéines motrices, elle pourrait potentiellement être impliquée dans le transport des ARNm. Cette hypothèse est soutenue particulièrement grâce aux autres protéines qui ont été identifiées comme possible partenaire d'interaction dans l'IP-MS (Figure 8). Effectivement, dans cette liste, diverses hnRNP ont été identifiées, telles que la hnRNP H1, hnRNP K et hnRNP C.

Premièrement, une étude récente (181) a montré que divers hnRNP telle que hnRNP H1, K, F, A2B1, A1 peuvent lier les motifs de localisation axonale des ARNm *Nrn1*, *Hmgb1*, *Actb* et *Gap43*, impliqués dans la réponse à la lésion axonale (6, 8, 22, 25, 36). La localisation axonale n'était pas répertoriée auparavant pour la plupart des hnRNP identifiées dans cette étude. Néanmoins, la multifonctionnalité a déjà été montrée pour plusieurs PLA, comme la ZBP1 axonale, la FMRP, la nucléoline et la HuD qui contribuent au transport et à la traduction des ARNm neuronaux (6, 51-54). Aussi, dans cette étude, aucune protéine à haute spécificité d'interaction n'était partagée entre les quatre motifs de localisation d'ARNm, ce qui suggère l'existence de multiples complexes ARNm-protéines définis par la composition des PLA interagissant avec ces motifs d'ARNm. Effectivement, les granules mRNP sont potentiellement composés de un à trois ARNm avec une douzaine de PLA (609–613). Dans cette étude, hnRNP A1, hnRNP A2B1 et hnRNP K lient l'ARNm *Gap43* et donc pourrait être rassemblée potentiellement dans un complexe granules

mRNP. Aussi, il pourrait potentiellement avoir un autre complexe, composé de hnRNP A1, hnRNP A2B1 et hnRNP H1 qui sont capables de lier l'ARNm Actb.

Deuxièmement, du point de vue des granules mRNP, ceux-ci, dont la composition implique plusieurs hnRNP, sont très peu répertoriés dans la littérature. Cependant, cette hypothèse est soutenue par la possibilité des hnRNP a formé des complexes hétérogènes. Il y a notamment une étude (184), basée sur un *crosslinking* chimique couplé à une spectrométrie de masse de lysat de cellule HeLa, qui a permis de mettre en avant la possibilité des hnRNP à former des complexes. En effet, des interactions ont été démontrées entre les couples hnRNP A1-hnRNP C, hnRNP A2/B1-hnRNP C, grâce à des interactions entre leur arginine (K). Le lien entre hnRNPC et hnRNPA1 a été établi en associant les résidus lysine K42 et K350, respectivement. Ces deux résidus se trouvent dans le domaine RRM de la hnRNP C et le domaine de la hnRNPA1. Ainsi, ces résultats suggèrent la possibilité que la hnRNP C et la hnRNP A1 interagissent de manière coordonnée dans le traitement (via le RRM) et l'exportation (via le M9) des ARNm du noyau vers le cytoplasme. De plus, leur étude a montré que la liaison des domaines est accessible aux solvants et, par conséquent, disponible à la liaison à l'ARN.

En résumé, ces études avec nos résultats apportent un nouveau niveau de discussion sur la façon dont les protéines hnRNP interagissent dans leurs complexes pour réguler les ARN. Aussi, les granules mRNP impliqué dans le transport des ARNm pourraient potentiellement être constitués de diverses hnRNP en complexes et liées à un même ARN, ce qui favoriserait leur séparation de phase (SPLL). En effet, il est intéressant de noter que les résultats de l'IP-MS (Figure 8) indiquent que la hnRNP A1B semble interagir avec hnRNP A2B1, hnRNP K, hnRNP C et hnRNP H1. Ainsi, la hnRNP A1B, étant le facteur commun entre ses hnRNP, aurait potentiellement un rôle central dans les granules mRNP impliqués dans la réponse à la lésion axonale et aussi participer au transport des ARNm axonaux (Figure 18).

Il serait pertinent de réaliser des études avec du *crosslinking* afin de mieux comprendre la structure de ces granules mRNP. Aussi, des essais de co-localisation ou de proximité pourrait être effectués avec les autres hnRNPs identifier dans la liste IP-MS. Cela permettrait de déterminer si les granules de la hnRNP A1B possèdent les autres hnRNPs. Puis, une étude sur l'expression axonale de la hnRNP A1B lors d'une lésion axonale pourrait être évaluée afin d'observer si le niveau de la protéine est plus élevé dans le cytoplasme comme réponse à ce stress. Cependant, le transport axonal n'est pas le seul transport important pour les neurones.

5.1.2 la hnRNP A1B dans le transport dendritique : hnRNP A1B, hnRNP U et Puralpha, un travail d'équipe ?

Le transport des ARNm n'est pas seulement nécessaire dans les axones, mais aussi dans les dendrites. En effet, des ARNm, des ribosomes et des facteurs de traduction peuvent être présents dans les dendrites, et même dans les épines dendritiques, ce qui montre la présence de la régulation de la synthèse locale des protéines (62, 182). Encore une fois, les PLA impliquées dans ce transport sont très peu répertoriées dans la littérature.

Une étude (185), réalisée en 2004, a identifié 34 protéines impliquées dans les granules mRNP transportés par les kinésine dans le cerveau de souris et plus précisément dans les dendrites. Leurs résultats montrent que Puralpha et hnRNP U1 sont des protéines retrouvées dans les granules mRNP dans les dendrites. Il est important de soulever ces protéines puisque Pura est un résultat de l'essai d'IP-MS de la hnRNP A1B (Figure 8). La hnRNP U est aussi présente comme résultat, mais dans la liste d'enrichissement dans deux réplicats au lieu de trois (données non montrées). Globalement, cette étude a montré que ces deux protéines sont retrouvées dans les dendrites et font partie des granules des ARNm transportés par la kinésine. Aussi, ces granules comprenaient staufer, des FMRP, des EF-1 α et les ARNm de CaMKII α et d'Arc. De plus, la hnRNP A1, A/B et A0 ont été aussi identifiées dans leurs études comme des protéines faisant partie des granules de transport des kinésine, mais jusqu'à aujourd'hui, seule la hnRNP A/B a été associée à des granules d'ARNm dans les dendrites (105, 186).

D'une autre part, le transport dendritique effectué par la protéine de liaison à l'ARN Puralpha est bien répertorié dans la littérature. En effet, une étude (187) a montré qu'elle localise non seulement dans les tiges dendritiques, mais aussi dans les épines des neurones matures. Ceci suggère que Puralpha joue un rôle clé dans la livraison synaptique de l'ARNm pour la synthèse locale des protéines. Le transport des granules Puralpha dans les tiges dendritiques est effectué par les kinésine/dynéine, mais son transport dans les épines dendritiques est acheminé par la myosine Va (Myo5a). De plus, cette étude a montré que le transport des granules Puralpha aux épines est régulé par l'activation du récepteur métabotropiques du glutamate 5 (mGluR5), jouant un rôle clé dans la signalisation neuronale (188).

Les protéines Puralpha, KIF5C, Myo5a, hnRNP U, hnRNP A2B1 sont des partenaires d'interaction de la hnRNP A1B dans l'expérience IP-MS effectuée dans notre étude. De plus, les ARNm

Camk2 α et Actb (actine- β) sont liés par la hnRNP A1B (Figure 17) et sont reconnus comme des ARNm transportés dans les dendrites. Ainsi, la hnRNP A1B aurait potentiellement une fonction dans le transport d'ARNm dans les tiges/épines dendritiques (Figure 18) mais plus d'expérience sont nécessaires afin de valider cette fonction. En effet, des essais d'immunoprécipitation et de co-localisation peuvent être effectués pour valider les interactions avec la hnRNP A1B. Aussi, il serait pertinent d'étudier la régulation du transport de la hnRNP A1B par l'activation du récepteur métabotropiques du glutamate 5 avec des techniques d'imagerie. Puis, il serait intéressant de déterminer si les protéines mentionnées font partie des mêmes granules d'ARNm dans les dendrites et aussi dans les axones. En effet, les granules d'ARNm ne sont pas uniformes et leurs mouvements et localisations dépendent des molécules qui les composent, ce qui témoigne la diversité des granules d'ARN.

5.1.3 la hnRNP A1B, une possibilité d'adaptateur entre les granules mRNP et les protéines motrices

L'une des grandes questions dans le transport des ARNm dans les neurites est comment les PLA sont couplées aux protéines motrices. Jusqu'à aujourd'hui, il existe plusieurs candidats, comme FMRP connus pour sa liaison directe avec la kinésine (189) et SFPQ liaison directe KLC1/KIF5A (motif Y-acide) (170), qui peuvent être potentiellement des adaptateurs entre les granules d'ARNm et les protéines motrices (kinésine, dynéine, myosine). Cependant, il est important de faire une emphase sur le fait que jusqu'à aujourd'hui, il n'y a aucune validation d'adaptateurs. En effet, la compréhension derrière l'arrangement des protéines et ARNm dans les granules causés par la séparation de phase (SPLL) restent encore à élucider.

Les résultats de cette étude montrent que la hnRNP A1B peut lier les trois classes de protéines motrices. Aussi, l'interaction avec la chaîne légère de la kinésine KLC1 semble être non dépendante à l'ARN (Figure 10), ce qui suggère une liaison directe. Pour valider une interaction non dépendante à l'ARN, des mutations ponctuelles pourraient être introduites sur les phénylalanines des domaines RRM de la hnRNP A1B, nécessaires pour l'interaction à l'ARN (Figure 6). Ainsi, la hnRNP A1B serait un candidat optimal comme adaptateur entre les granules d'ARNm et les protéines motrices. Mais comment les protéines peuvent lier les protéines motrices ? En effet, une multitude de séquences appelées motifs de liaison ont été identifiées dans les protéines capables de lier les protéines motrices.

Tout d'abord, concernant la kinésine, un motif appelé le motif Y-acide est connu dans la littérature pour permettre la liaison avec KLC1. Cette étude a permis d'identifier un motif qui ressemble aux motifs Y-acide précédemment caractérisé dans JIP1, TorsinA, SH2D6 et SFPQ (170, 176, 177) dans la séquence de la hnRNP A1 et A1B (Figure 13). Cependant, ce motif semble non fonctionnel dans les isoformes HNRNPA1. Cela est potentiellement dû au fait que le motif se retrouve dans le domaine de liaison à l'ARN (RRM2) alors que ce motif se retrouve plutôt dans des régions désordonnées ou dans l'enroulement hélicoïdal. Donc comment cette protéine pourrait interagir avec la kinésine ?

En effet, une étude (190) a montré que la protéine de liaison nucléoline peut lier directement la kinésine via son domaine RGG. Ceci est intéressant, car ce domaine RGG fournit un lien essentiel et direct entre les granules d'ARN contenant de la nucléoline et la machinerie de transport antérograde. Donc il serait intéressant de faire une délétion du domaine RGG de la hnRNP A1B et voir si son interaction avec la kinésine est perdue. Néanmoins, il reste aussi à déterminer comment la hnRNP A1B est capable de lier les autres protéines motrices (myosine et dynéine). Des délétions des domaines importants de la hnRNP A1B pourraient être construit pour déterminer lesquels sont nécessaires pour l'interaction avec les protéines motrices.

Un domaine important aux interactions protéine-protéine qui pourrait expliquer la liaison aux protéines motrices est le domaine intrinsèquement désordonné (RID) de la hnRNP A1B grâce à la présence de courts motifs appelés MoRF. Ces courts motifs peptidiques peuvent adopter des structures secondaires et ainsi permettre l'interaction avec des domaines structurés d'autres protéines (191). Une analyse *in silico* fut effectuée pour les isoformes HNRNPA1 (Figure 19), grâce à divers outils de prédiction de MoRF (MoRFchibi et MoRFpred) et de structures secondaires (LS2P), ainsi que des comparaisons avec ce qui était déjà répertorié dans la littérature (UniProt). Les résultats suggèrent que l'isoforme hnRNP A1B possède 4-5 MoRFs dont un est causé par l'élongation du domaine RID (exon 7B). Ces résultats sont intéressants, car ces MoRFs pourrait permettre notamment l'interaction avec des nouveaux partenaires d'interaction, par exemple les protéines moteurs trouvées dans les résultats d'IP-MS (Figure 8A). Aussi, la prédiction des MoRFs est appuyée par la prédiction de potentielles hélices alpha et des feuillets bêtas dans le RID par le logiciel LS2P (Figure 19). Cependant, ce ne sont que des résultats préliminaires et une validation expérimentale supplémentaire doit être effectuée.

Premièrement, on pourrait effectuer des délétions des divers motifs MoRFs prédits par les logiciels et voir leur impact dans les interactions avec les protéines motrices. D'autre part, on pourrait utiliser des méthodes expérimentales pour déterminer la structure secondaire du RID telle que la spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD) et ainsi déterminer s'il a la présence de MoRFs. En effet, cette méthode permet d'analyser quantitativement le contenu en hélice, en feuillets et en tours des protéines dans différents environnements et en tant que composants de complexes (192). Cependant, jusqu'à aujourd'hui, les méthodes expérimentales de détermination de structure des RID ne sont pas encore optimales du fait que les MoRFs ne possède pas une structure secondaire fixe à travers le temps (192).

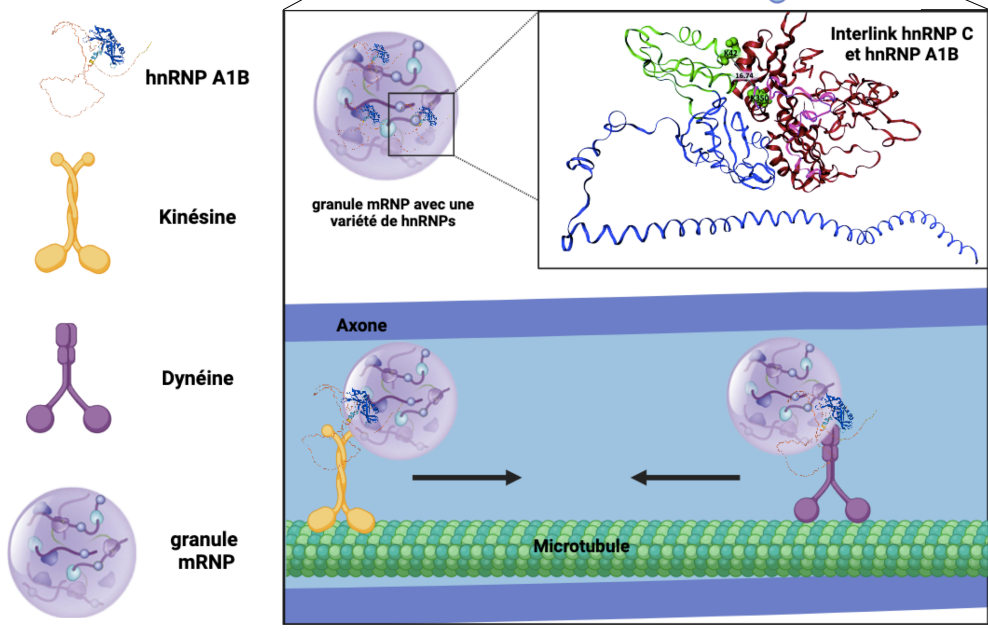
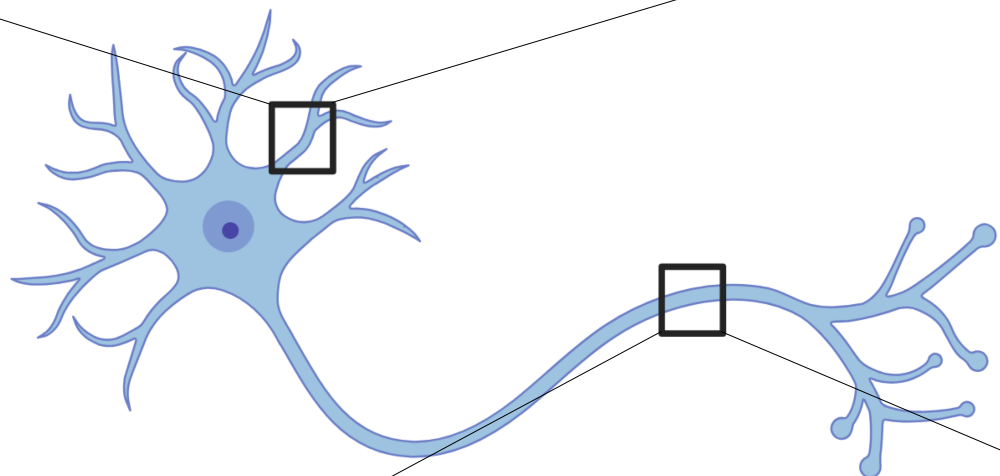
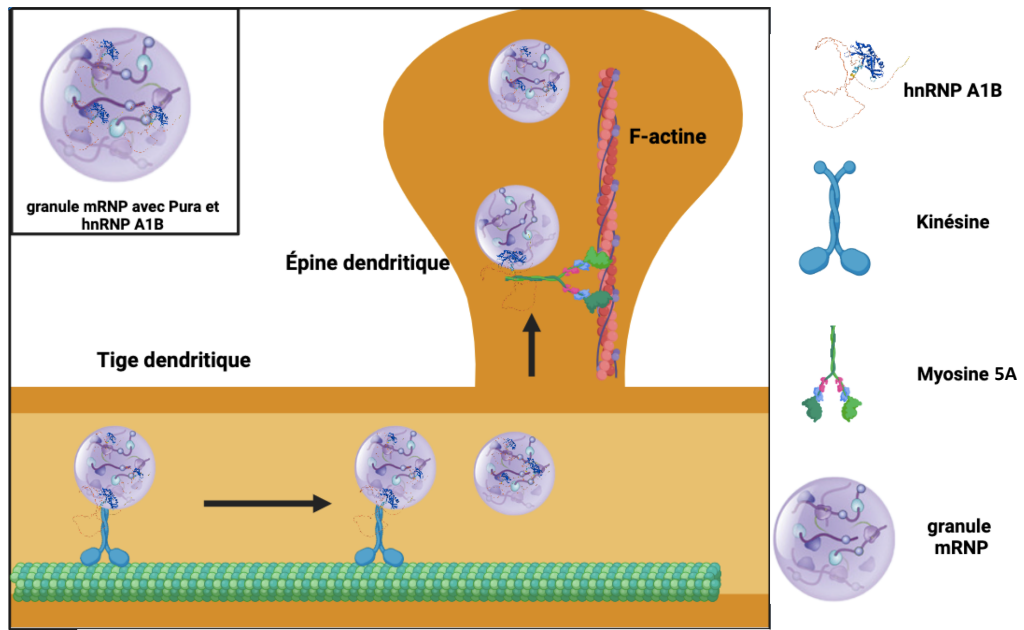


Figure 18. Modèle potentiel des granules de la hnRNP A1B impliqués dans le transport des granules mRNP.

La hnRNP A1B peut participer dans le transport axonal de divers ARNm avec d'autres hnRNPs en formant des granules mRNP couplés avec les protéines motrices. Aussi, elle peut participer au transport des granules mRNP dans les dendrites grâce à son interaction avec d'autres PLA telles que Pura et la protéine motrice Myo-5a.

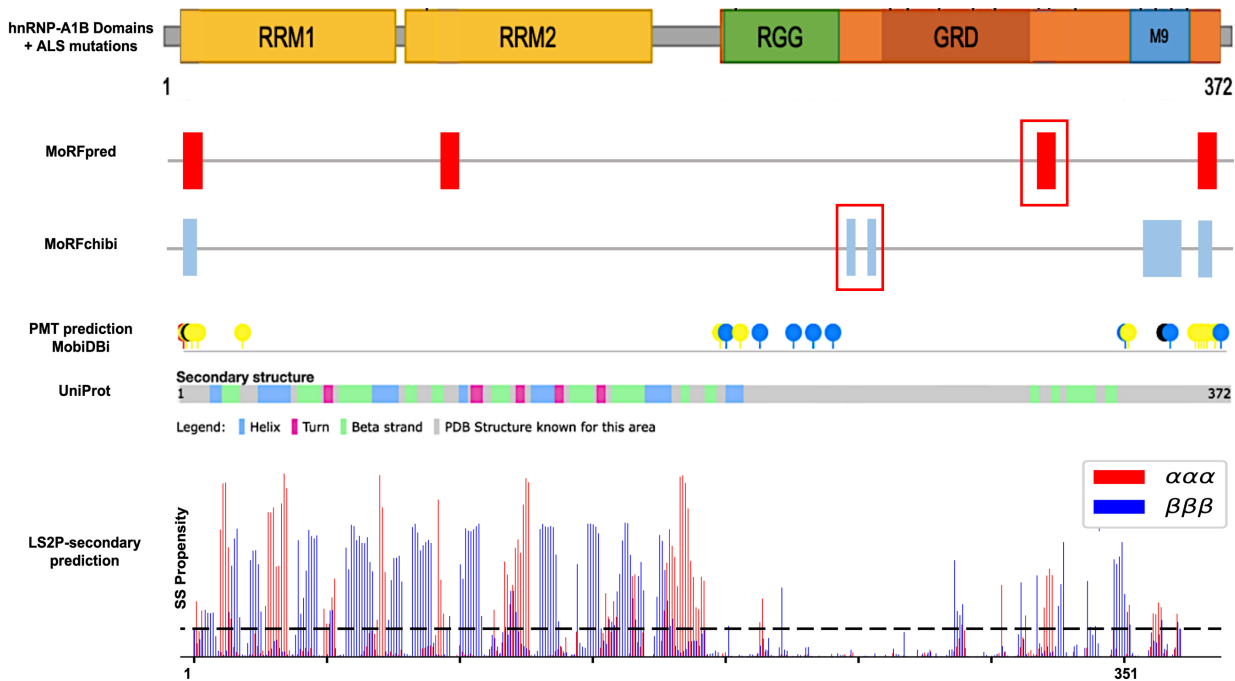


Figure 19. Analyse in-silico de HNRNPA1 : prédiction des motifs Morfs .

Domaines important de la hnRNPA1, suivi de la prédiction de MoRFs par deux logiciels (MoRFpred, MoRFchibi : les MoRFs encadré ne font pas partie des prédictions pour hnRNP A1). On retrouve aussi les modifications post-traductionnelles (jaune : phosphoserine, bleu : Omega-N-methylarginine, noir : N6-acetyllysine) et la structure secondaire répertoriée par UniProt et prédite par le logiciel L2SP.

5.2 Les ARNm liés par la hnRNP A1B dans les granules mRNP, une réponse à divers stimuli.

Le transport des ARNm dans les neurites est important pour la traduction des protéines dans des compartiments spécifiques des neurones. En effet, un seul ARNm dans les neurites peut être traduit plusieurs fois en protéine, ce qui est un avantage énergétique pour les neurones (62). De plus, les neurones sont susceptibles de subir divers stimuli, tels que le stress physiologique dans les synapses (182), ce qui fait appel à un bon mécanisme de réponse face aux stimuli. Il est donc important d'identifier les ARNm liés par les protéines de liaison à l'ARN (PLA), impliqués dans le transport des granules ARNm, pour comprendre leur implication dans l'homéostasie neuronale.

Afin d'obtenir une première piste sur quels ARN sont liés par la hnRNP A1B, une analyse de chevauchement a été réalisée entre les données iCLIP de la hnRNP A1 humaine (172) et le transcriptome axonal des motoneurones humains (173). Ce type d'analyse prend en considération que les deux isoformes de *HNRNPA1* partagent les mêmes domaines de reconnaissance à l'ARN (UP1) et peuvent donc potentiellement lier les mêmes ARN. Cette intégration de données a dévoilé l'association de 51 transcrits à la hnRNP A1B (Figure 16A). On retrouve, notamment, l'ARN du gène *ACTB*, codant pour la protéine B-actine, qui est connu dans la littérature pour être transporté et traduit de manière distale. Aussi, comme discuté dans la section précédente, *ACTB* est important dans le transport axonal pour la réponse à la lésion et morphologie axonale, puis aussi dans le transport dendritique (62, 182). Cette étude a permis de valider que la hnRNP A1B était capable de lier cet ARN, ce qui appuie l'hypothèse que la protéine possède un rôle dans le transport des ARNm dans les neurites. De plus, pour appuyer davantage cette hypothèse, la validation pour l'ARNm *Camk α* , qui est impliqué dans les granules d'ARN dendritiques (185) fut validée aussi, même si celui-ci n'était pas un gène identifié dans notre liste.

Mais pourquoi le transport des ARNm par la hnRNP A1B serait important pour les neurones ? En effet, l'analyse par Gene Ontology de ces 51 transcrits a montré que ceux-ci sont impliqués dans des voies cellulaires de régulation comme la régulation du métabolisme, mort cellulaire, apoptose, réponse au stress et traduction. Ces mécanismes de régulation sont très importants pour l'homéostasie des neurones comme le maintien de la protéostase au sein des neurites. Pour assurer l'équilibre de la protéostase, les neurones régulent la synthèse et la dégradation des protéines et

s'appuient sur les chaperons pour faciliter le repliement des protéines (193). En effet, la hnRNP A1B peut lier le transcrite HSPA8 qui code pour un chaperon très important pour les neurones.

Tout d'abord, HSPA8 est un membre de la famille des chaperons HSP70, qui est exprimé à des niveaux élevés dans les neurones par rapport à d'autres types de cellules (194). Elle est exprimée de manière constitutive, puis elle participe notamment au repliement des protéines naissantes ou au repliement des protéines altérées, et à leur ciblage vers la machinerie ubiquitine/protéasome en vue de leur dégradation (193). Au niveau de sa localisation, des études ont montré que les neurones soumis à un stress protéotoxique présentent des niveaux élevés de HSP40 et de HSP70 dans les dendrites et leurs synapses en cas de stress (195). Donc HSPA8 est importante pour le maintien de la protéostase dans les neurones et sa localisation dans les neurites est essentielle pour sa fonction (196). Cependant, le mécanisme qui régule la distribution subcellulaire des HSP dans les neurones n'est pas très bien élucidé dans la littérature.

En effet, une étude récente (196) soulève que le transport de l'ARNm HSPA8 est régulé par la protéine de fusion FUS (Fusion dans le sarcome) et hnRNP A2B1 (ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène A2/B1) favorisant la protéostase dendritique et la survie neuronale lors de situations de stress. Notre étude a montré que la hnRNP A1B peut lier le transcrite de HSPA8 et la hnRNP A2B1 est un résultat de notre liste d'interacteurs de la hnRNP A1B dans l'essai IP-MS (Figure 8). De plus, même si la protéine FUS n'a pas été obtenue dans la liste d'interacteurs, il y a une étude protéomique (197) qui a montré que la hnRNP A1 peut interagir avec elle dans le noyau. Ainsi, avec les résultats de notre étude et ses études, on peut soulever l'hypothèse que la hnRNP A1B, FUS et hnRNP A2B1 peuvent constituer le granule d'ARNm de la HSPA8 dans les dendrites. Donc, la hnRNP A1B aurait potentiellement une fonction importante dans la protéostase des dendrites, mais des expériences de validations sont nécessaires pour confirmer cette fonction.

Finalement, une autre fonction plausible de la hnRNP A1B qui serait intéressante à étudier est sa fonction dans les granules de stress (GS). En effet, comme discuté précédemment, les transcrits qui semblent être ciblés par la hnRNP A1B participent à des mécanismes de régulation, tels que la réponse au stress. Ceci est intéressant, car l'isoforme hnRNP A1, a déjà été répertoriée dans la littérature comme protéine localisant dans les GS (150, 198). Une étude (150) a montré que l'hyperphosphorylation de la hnRNP A1 en réponse au stress par l'activation des kinases Mnk1/2 entraîne une accumulation cytoplasmique de la protéine. Par la suite, cette accumulation, induite

par le stress, favorise la localisation de la protéine dans les GS. De plus, la déplétion de la hnRNP A1 affecte la récupération des cellules après un stress, ce qui suggère un rôle physiologique important de la hnRNP A1 dans la réponse au stress.

En effet, les granules de stress sont des organites sans membrane où sont séquestrés des facteurs d'initiation de la traduction, des ARNm et des protéines de liaison à l'ARN qui servent à garder divers ARNm dans un état de non-translation. Une fois le stress apaisé, les GS commencent à se désassembler selon un processus qui serait régi par plusieurs mécanismes dépendant de l'ATP, notamment l'activation de protéines chaperons telles que les protéines de choc thermique 40 et 70 (HSP40/70) (149). Globalement, la formation et la décomposition des granules de stress sont très dynamiques et impliquent une multitude de protéines de liaison à l'ARN différentes qui ne sont pas complètement élucidées jusqu'à aujourd'hui. Donc, puisque la hnRNP A1B est une protéine de liaison à l'ARN localisée dans le cytoplasme et capable de lier l'ARNm de HSPA8 et des ARNm impliqués dans la réponse au stress, il serait pertinent d'étudier son rôle potentiel dans les GS phase à la réponse au stress.

De plus, les modifications post-traductionnelles (MPT) sont un facteur important à considérer lors de l'étude des fonctions de la hnRNP A1B. En effet, comme discuté dans la section introduction, les MPT augmentent les états fonctionnels dans lesquels une protéine peut exister dans la cellule (40) et sont aussi impliquées dans les MoRFs des protéines désordonnées. En outre, l'inclusion de l'exon 7B dans la hnRNP A1B, introduit 15 nouveaux sites de phosphorylation (Tableau 4). Il serait intéressant d'étudier l'impact de ces phosphorylations dans la localisation de la protéine, son potentiel rôle dans la réponse au stress, ses interactions protéine-protéine (lien des MoRFs) et aussi les impacts au niveau de sa reconnaissance à l'ARN. De plus, il serait nécessaire d'effectuer des techniques de iCLIP pour identifier tous les transcrits qui peuvent être liés par la hnRNP A1B dans les neurites et le soma. Ceci nous donnerait plus d'information sur quelles voies la hnRNP A1B est impliquée.

5.3 L'implication de la hnRNP A1B dans la SLA

De nombreuses mutations du gène *HNRNPA1* ont été associées à la SLA et à la DFT, et la plupart sont situées dans le domaine C-terminal (Figure 7). En particulier, dans plusieurs modèles, ces mutations dans le domaine C-terminal de la hnRNP A1 peuvent favoriser la localisation cytoplasmique et l'agrégation (D262V, P288A) (161-163). Il a été démontré que l'expression de la mutation D314V de la hnRNP A1B, augmente l'agrégation de la hnRNP A1B et que certaines mutations sont spécifiques à l'exon 7B telle que G283R (154). Cependant, l'impact des mutations n'a jamais été répertorié dans le contexte de la fonction de la hnRNP A1B. Ainsi, dans notre étude, on a voulu évaluer l'impact des mutations Q127R (RRM2), G283R (exon 7B), D314V (RID) et P340A ((M9) par rapport à la liaison entre la protéine et les protéines motrices. Les résultats de cette étude n'ont pas montré d'impact significatif des mutations sur l'interaction hnRNP A1B/protéines motrices avec la technique d'immunoprécipitation. Donc comment les mutations pourraient influencer la fonction de la hnRNP A1B dans le transport des granules d'ARN ?

Tout d'abord, la plupart des mutations de la hnRNP A1B ont un impact sur le domaine désordonné de l'extrémité C-terminale (RID). Les RID des PLA assurent l'assemblage des granules d'ARN, et les mutations pathologiques dans ces domaines RID peuvent perturber la dynamique de l'assemblage et du désassemblage des granules d'ARN (85). En effet, des études (89, 199) ont montré que les mutations du domaine C-terminal de la TDP-43 diminuent le transport antérograde, le dynamisme des granules et favorise le transport rétrograde. Aussi, les propriétés biophysiques des granules varient selon leur localisation dans l'axone (199). Il est donc important d'étudier les granules d'ARN dans le cadre morphologique des neurones afin de comprendre leur rôle physiologique et les transitions pathologiques de ces structures dans les maladies neurodégénératives.

La hnRNP A1B serait un candidat optimal pour évaluer le dynamisme des granules d'ARN. Un modèle qui pourrait être utilisé est les chambres microfluidiques (Figure 20) qui permettent d'isoler les neurites dans des tunnels, ce qui rend plus accessible la visualisation des granules de transport et les quantifications. De plus, des techniques d'imagerie en temps réel peuvent être appliquées pour caractériser le transport et évaluer l'impact des mutations retrouvées dans la hnRNP A1B.

Cellules SH-SY5Y différenciées

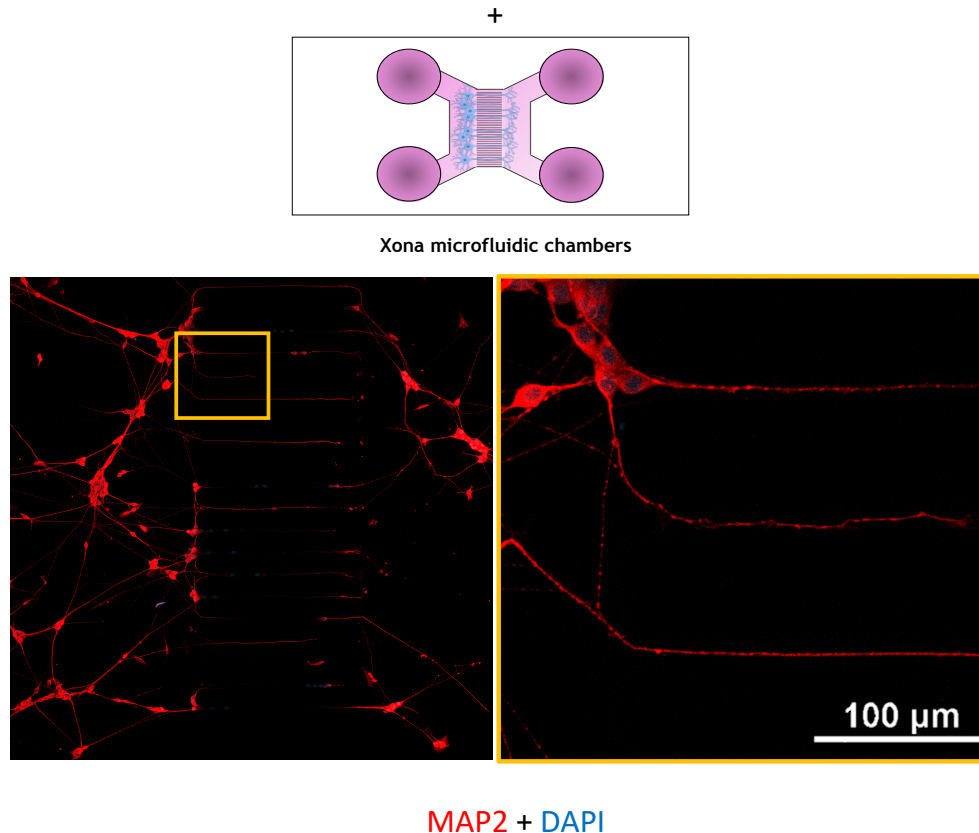


Figure 20. Neurones SH-SY5Y différenciés dans des chambres microfluidiques

Marqueur du cytosquelette, protéine 2 associée aux microtubules, MAP-2.

Deuxièmement, la hnRNP A1B aurait potentiellement d'autres mécanismes perturbés dans le contexte pathologique. Une étude a montré que la hnRNP A1B est régulée à la hausse lors de la déplétion nucléaire de la TDP-43 qui est observé dans les cas de la SLA. Ceci pourrait favoriser l'accumulation cytoplasmique et donc l'agrégation de la protéine (154).

Comme discuté précédemment, cette protéine aurait potentiellement une fonction importante dans la morphologie axonale, la réponse à la lésion axonale, la réponse au stress et la traduction locale du chaperon HSPA8 dans les dendrites. On peut soulever l'hypothèse qu'en condition de stress, une translocation temporaire de TDP-43 dans le cytoplasme ou un autre facteur, augmente le niveau de la hnRNP A1B pour favoriser la réponse face à ces stimuli. Cependant, si la TDP-43 localise en continu dans le cytoplasme, la protéine hnRNP A1B forme des agrégats, et donc les voies de transport des ARN menées par celle-ci sont affectées. Les mutations favorisent davantage l'agrégation de la protéine. Ainsi, la réponse au stress et l'homéostasie neuronale sont aberrantes, favorisant la mort cellulaire (Figure 21).

Réponse à un stimuli

Réponse déficiente dans la SLA

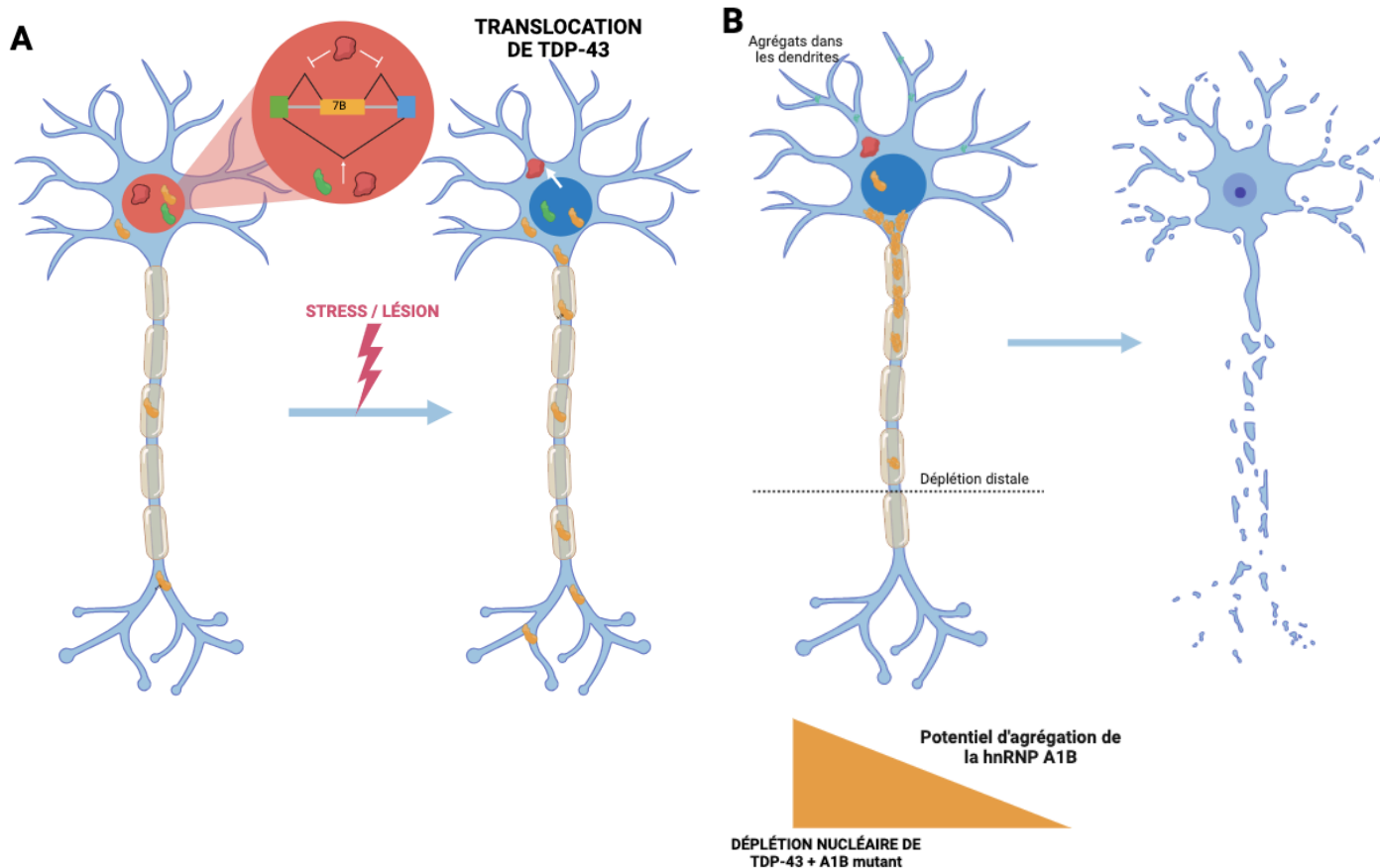


Figure 21. Modèle de régulation de la hnRNP A1B et son implication dans la SLA.

(inspiré de Gagné M., thèse doctorat, Biochimie, UdeM (129))

La hnRNP A1B est présente dans le soma et les neurites. En cas de stress, le transport des granules d'ARN comprenant la hnRNP A1B est augmenté. Dans la SLA une dérégulation du niveau de la hnRNP A1B peut causer la formation d'agrégats, ce qui est davantage favorisé par des mutations dans son domaine C-terminal. La présence d'agrégats peut causer une perte de fonction de la hnRNP A1B qui aboutit à une perturbation du transport dans les neurites et un mauvais repliement des protéines (moins de chaperon).

Finalement, un autre mécanisme dans lequel la hnRNPA1B peut potentiellement contribuer à la pathologie de la SLA est dans le contexte des expansions répétées GGGGCC de C9orf72. Ce cas représente la variante génétique la plus courante de la sclérose latérale amyotrophique et de la dégénérescence frontotemporale (18). En effet, une étude (200) a montré que l'expression de Hsc70-4/HSPA8 est réduite au niveau post-transcriptionnel dans les modèles iPSC C9orf72 de mouches et d'humains, mais le mécanisme derrière n'est pas tout à fait compris.

Comme discuté précédemment dans cette étude, la hnRNP A1B peut lier le transcrite de HSPA8 et possiblement participer à son transport dans les dendrites. De plus, des études (201, 202) ont montré que la hnRNP A1, hnRNP H1 et hnRNP A3 peuvent lier ou co-localiser avec les transcrits pathologiques de C9orf72 dans des tissus du système nerveux central de patients C9orf72+. En outre, ces trois protéines sont dans notre liste d'interactions identifiées (Figure 8) et la hnRNP A1B partage les mêmes domaines de reconnaissance à l'ARN que la hnRNP A1. Ainsi, la hnRNP A1B peut potentiellement lier les transcrits pathologiques, ce qui causerait la séquestration de la protéine. Donc le transport et la traduction locale du transcrite HSPA8 serait potentiellement diminuée dans ce modèle.

En résumé, la hnRNP A1B pourrait contribuer à travers divers mécanismes dans la pathologie de la SLA. Des expériences ultérieures devront être achevées pour déterminer et valider son degré de contribution. De plus, au niveau thérapeutique, il serait intéressant d'évaluer l'utilisation d'oligonucléotides antisens (OAS) de basculement d'épissage, des méthodes de dégradation ou identifier des chaperons de la hnRNP A1B pour rétablir un niveau basal de la protéine et éviter son agrégation dans la pathologie.

5.4 Les hnRNP comme biomarqueur.

La hnRNP A1 est un acteur majeur dans la régulation des ARN dans les neurones et cette étude met en avant le potentiel rôle majeur de la hnRNP A1B dans le transport des ARNm dans les neurites. En outre, dans le contexte pathologique de la SLA, la déplétion nucléaire de TDP-43 favorise l'isoforme hnRNP A1B, sa localisation dans le cytoplasme et son agrégation (154). Aussi, concernant l'isoforme hnRNP A1, des études effectuées dans des tissus post-mortem de patients SLA, ont montré qu'il y a une diminution de sa localisation nucléaire et la présence d'inclusion cytoplasmique (203). Il serait donc intéressant d'évaluer le potentiel de la hnRNP A1B et hnRNP A1 comme biomarqueurs de la pathologie. Mais comment évaluer ce potentiel ?

Les vésicules extracellulaires (VE), principalement composées d'exosomes et de microvésicules, constituent une source précieuse de biomarqueurs pour la détection non invasive des maladies neurodégénératives dans les biofluides (204). Ces marqueurs de maladie basés sur les VE peuvent être identifiés avant la manifestation de symptômes détectables de la maladie, ce qui est très prometteur pour le diagnostic précoce des maladies telles que la SLA (205). En outre, les VE sont des sources de phosphoprotéine, et comme déjà répertorié dans la littérature, la phosphorylation est un mécanisme majeur de régulation des hnRNP (101). Une étude (206) récente a permis d'identifier de nombreuses protéines et phosphoprotéines EV dans l'urine de patients atteints de la maladie de Parkinson (MP). Cette étude est intéressante, car un des candidats principaux comme biomarqueurs fut la hnRNP A1. En effet, la protéine est significativement régulée à la hausse chez les patients atteints de la maladie de Parkinson par rapport aux personnes en bonne santé. De plus, dans les données brutes des protéines identifiées dans les VE, ils ont aussi détecté d'autres hnRNP, telles que la hnRNP A2/B1 qui est un interacteur potentiel de la hnRNP A1B dans notre liste (Figure 8). Ainsi, cette méthode avec l'urine semble être un moyen de détection de diverses hnRNPs et comme discuté précédemment dans cette étude, ces protéines semblent travailler en équipe. Il serait donc intéressant d'étudier les divers hnRNP comme biomarqueurs dans les VE retrouvé dans l'urine de patient atteint de la SLA et plus particulièrement le couple hnRNP A1/hnRNP A1B.

Cependant, il faut prendre en considération que les hnRNP sont impliquées dans d'autres maladies neurodégénératives. Il serait intéressant d'étudier si cette méthode de détection peut aussi identifier la NF-H, un biomarqueur prometteur dans le contexte de la SLA (56, 58), pour ainsi avoir un panel de molécules biomarqueur spécifique à la pathologie de la SLA.

5.5 Limites de l'étude

Les résultats de cette étude contribuent à l'avancement des connaissances de la biologie moléculaire des neurones, mais il est important de soulever quelques limites de l'étude.

Tout d'abord, le choix expérimental pour valider et évaluer les interactions de la hnRNP A1B avec les protéines motrices présentent des limites. En effet, la méthode choisie, (l'IP) est une méthode qualitative qui permet de déterminer si oui ou non des protéines interagissent sans nous donner plus d'informations. Néanmoins, il est également important d'examiner les détails, tels que l'affinité et les propriétés cinétiques des interactions protéine-protéine, afin de comprendre les processus biologiques complexes auxquels elles participent. Ceci peut être effectué avec des méthodes telles que la calorimétrie par titration isotherme, spectroscopie de résonance des plasmons de surface, spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, etc. Ainsi, ces méthodes nous permettraient de déterminer si les interactions sont directes et la force de ces dernières.

Ensuite, la majorité des expériences ont été réalisées à partir de cellules HEK293FT, des cellules non-neuronales et ayant une surexpression de nos protéines d'intérêts. Il serait pertinent de valider les interactions dans un modèle plus neuronales et non surexprimé telles que les SHSY5Y ou les neurones humains dérivés d'iPSC. Cependant, il est important à soulever qu'il existe des différences de régulation/d'environnement entre les cellules neuronales *in-vitro* et les neurones chez l'humain *in-vivo*, variabilités qui ne sont pas prises en compte dans cette étude et ne peuvent pas être appliqué. De nos jours, le cerveau humain reste encore un mystère.

Finalement, certains résultats de notre étude sont préliminaires (n=1 ou n= 2), ce qui nous permet seulement d'énoncer des hypothèses. Il serait nécessaire de refaire les expériences de *proximity ligation assay* pour valider une co-localisation entre la hnRNP A1B et les protéines motrices dans les neurites. Aussi, il serait intéressant de faire l'expérience avec des neurones humains dérivés d'iPSC, pour déterminer si cette co-localisation est conservé chez l'humain. Puis, il serait pertinent de vérifier l'agrégation des mutants hnRNP A1B dans notre modèle d'étude. En effet, l'immunofluorescence a été effectuée une fois, et il serait important de valider que les mutants ne formes pas d'inclusion/agrégats dans les HEK293FT.

6 Conclusion et perspectives

En conclusion, il est important d'étudier individuellement les isoformes hnRNP A1 et hnRNP A1B, notamment dans le contexte pathologique de la SLA. En effet, une simple élongation de la RID de ses protéines intrinsèquement désordonnées ouvre la porte à de possibilités d'impact significatives au niveau de la fonction, structure secondaire et dans la pathologie. La structure de ses protéines désordonnées reste un mystère, mais des études futures viseront à clarifier ce problème, ainsi que l'importance de la prise en considération des RID. De plus, ceci permettra d'élucider davantage sur la fonctionnalité de cette protéine dans le transport des ARNm dans les neurones, puis dans le contexte pathologique.

Ces nouvelles connaissances acquises sur la hnRNP A1B dans le trafic des ARNm ouvriront de nouvelles opportunités pour évaluer le transport des ARNm dans les neurites qui pourraient être de futurs points d'intervention thérapeutique. Cependant, ce n'est que le début de cette histoire, il reste encore à approfondir les connaissances sur cette nouvelle fonction et des études postérieures sont nécessaires. Celles-ci pourront répondre aux questions, quel domaine de hnRNP A1B permet la liaison avec les protéines motrices ? Est-ce un domaine partagé avec la hnRNP A1 ? Pourquoi hnRNP A1B est impliquée dans le transport des neurites? Comment est régulé le transport de la hnRNP A1B? Quels sont les effets si ce-dit transport est perturbé ? Quels sont les ARNm transportés par la hnRNP A1B dans les neurites? Comment une fraction de hnRNP A1B se retrouve dans le cytoplasme ?

Annexes



LETTRE DE CONSENTEMENT

N.B. Ce document peut être acheminé par courriel.

23-10-2023

Madame, Gagné Myriam

Objet : Demande de consentement à la reproduction ou modification, publication et communication de figures de thèse sur lesquels vous détenez des droits.

Je suis, Mariana Llasera, étudiante de deuxième cycle (maitrise en Biochimie) de la Faculté de médecine à l'Université de Montréal. Je rédige actuellement un mémoire et souhaiterais utiliser quelques figure de votre thèse pour lesquelles vous êtes titulaire des droits d'auteur.

Je sollicite donc votre permission d'utiliser les Figures 8, 10 et 14 de votre thèse de doctorat, Évaluation du rôle biologique et pathologique de l'isoforme alternatif de HNRNPA1; hnRNP A1B

Cette demande écrite constitue une licence non exclusive pour fins de reproduction, publication et communication de matériel à des fins de recherche et de publication.

Vous pouvez me transmettre votre consentement par courrier électronique. Il va sans dire que je m'engage à mentionner la source de ces figure ou extraits de figures dans le mémoire qui sera publié dans le site papyrus de l'université de Montréal.

Sachez enfin que je suis ouvert à payer les coûts de reproduction, et ce, en fonction de vos politiques.

J'espère recevoir une réponse favorable à cette demande de consentement dans les meilleurs délais et je vous prie de croire en l'expression de notre profonde gratitude.

Mariana Llasera,

Signature de l'auteur

23 octobre 2023

Bibliographie

1. Björn O, Tania FG, Nathan PS. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. *Mayo Clinic Proceedings*. 2018;93(11):1617-28.
2. Goetz CG. Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle Nerve*. 2000;23(3):336-43. Epub 2000/02/19.
3. Hodgkinson VL, Lounsberry J, Mirian A, Genge A, Benstead T, Briemberg H, et al. Provincial Differences in the Diagnosis and Care of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Can J Neurol Sci*. 2018;45(6):652-9. Epub 2018/11/16.
4. Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamirano PF, et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg Neurol Int*. 2015;6:171. Epub 2015/12/03.
5. Ingre C, Roos PM, Piehl F, Kamel F, Fang F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Epidemiol*. 2015;7:181-93. Epub 2015/02/25.
6. Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(11):617-28. Epub 2013/10/16.
7. Gregory JM, Fagegaltier D, Phatnani H, Harms MB. Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current Genetic Medicine Reports*. 2020;8(4):121-31.
8. Tiryaki E, Horak HA. ALS and other motor neuron diseases. *Continuum (Minneap Minn)*. 2014;20(5 Peripheral Nervous System Disorders):1185-207. Epub 2014/10/10.
9. Shellikeri S, Karthikeyan V, Martino R, Black SE, Zinman L, Keith J, et al. The neuropathological signature of bulbar-onset ALS: A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2017;75:378-92.
10. Taylor JP, Brown RH, Jr., Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*. 2016;539(7628):197-206. Epub 2016/11/11.
11. Masrori P, Van Damme P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *Eur J Neurol*. 2020;27(10):1918-29. Epub 2020/07/07.
12. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993;362(6415):59-62. Epub 1993/03/04.
13. Mathis S, Goizet C, Soulages A, Vallat J-M, Masson GL. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: A review. *Journal of the Neurological Sciences*. 2019;399:217-26.
14. Mead RJ, Shan N, Reiser HJ, Marshall F, Shaw PJ. Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2023;22(3):185-212.
15. Atkinson RA, Fernandez-Martos CM, Atkin JD, Vickers JC, King AE. C9ORF72 expression and cellular localization over mouse development. *Acta neuropathologica communications*. 2015;3(1):1-11.
16. Frick P, Sellier C, Mackenzie IRA, Cheng CY, Tahraoui-Bories J, Martinat C, et al. Novel antibodies reveal presynaptic localization of C9orf72 protein and reduced protein levels in C9orf72 mutation carriers. *Acta Neuropathol Commun*. 2018;6(1):72. Epub 2018/08/05.
17. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie Ian R, Boeve Bradley F, Boxer Adam L, Baker M, Rutherford Nicola J, et al. Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011;72(2):245-56.

18. Lee Y-B, Chen H-J, Peres João N, Gomez-Deza J, Attig J, Štalekar M, et al. Hexanucleotide Repeats in ALS/FTD Form Length-Dependent RNA Foci, Sequester RNA Binding Proteins, and Are Neurotoxic. *Cell Reports*. 2013;5(5):1178-86.
19. Lee Y-B, Baskaran P, Gomez-Deza J, Chen H-J, Nishimura AL, Smith BN, et al. C9orf72 poly GA RAN-translated protein plays a key role in amyotrophic lateral sclerosis via aggregation and toxicity. *Human molecular genetics*. 2017;26(24):4765-77.
20. Deleon J, Miller BL. Chapter 27 - Frontotemporal dementia. Dans: Geschwind DH, Paulson HL, Klein C, rédacteurs. *Handbook of Clinical Neurology*: Elsevier; 2018. p. 409-30.
21. Åman P, Panagopoulos I, Lassen C, Fioretos T, Mencinger M, Toresson H, et al. Expression Patterns of the Human Sarcoma-Associated Genes FUS and EWS and the Genomic Structure of FUS. *Genomics*. 1996;37(1):1-8.
22. Gal J, Zhang J, Kwinter DM, Zhai J, Jia H, Jia J, et al. Nuclear localization sequence of FUS and induction of stress granules by ALS mutants. *Neurobiology of aging*. 2011;32(12):2323. e27-e40.
23. Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, Kwiatkowski TJ, Jr, et al. Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Human Molecular Genetics*. 2010;19(21):4160-75.
24. Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *Journal of cell biology*. 2013;201(3):361-72.
25. Yang L, Gal J, Chen J, Zhu H. Self-assembled FUS binds active chromatin and regulates gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(50):17809-14.
26. Haibo W, Muralidhar LH. Molecular Basis of DNA Repair Defects in FUS-Associated ALS: Implications of a New Paradigm and Its Potential as Therapeutic Target. Dans: Muralidhar LH, rédacteur. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Rijeka: IntechOpen; 2020. p. Ch. 2.
27. Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VMY. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nature Medicine*. 2004;10(10):1055-63.
28. Kang YJ, Diep YN, Tran M, Cho H. Therapeutic Targeting Strategies for Early- to Late-Staged Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24). Epub 2020/12/20.
29. Suk TR, Rousseaux MWC. The role of TDP-43 mislocalization in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2020;15(1):45. Epub 2020/08/18.
30. Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*. 2013;79(3):416-38. Epub 2013/08/13.
31. Buratti E, Baralle FE. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front Biosci*. 2008;13:867-78. Epub 2007/11/06.
32. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006;314(5796):130-3. Epub 2006/10/07.
33. Leibiger C, Deisel J, Aufschnaiter A, Ambros S, Tereshchenko M, Verheijen BM, et al. TDP-43 controls lysosomal pathways thereby determining its own clearance and cytotoxicity. *Hum Mol Genet*. 2018;27(9):1593-607.
34. Ling JP, Pletnikova O, Troncoso JC, Wong PC. TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. *Science*. 2015;349(6248):650-5. Epub 2015/08/08.
35. Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, Liang TY, et al. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nature neuroscience*. 2011;14(4):459-68.

36. Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, et al. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci.* 2011;14(4):452-8. Epub 2011/03/02.
37. Bose JK, Huang CC, Shen CK. Regulation of autophagy by neuropathological protein TDP-43. *J Biol Chem.* 2011;286(52):44441-8. Epub 2011/11/05.
38. Scotter EL, Vance C, Nishimura AL, Lee YB, Chen HJ, Urwin H, et al. Differential roles of the ubiquitin proteasome system and autophagy in the clearance of soluble and aggregated TDP-43 species. *J Cell Sci.* 2014;127(Pt 6):1263-78. Epub 2014/01/16.
39. Xia Q, Wang H, Hao Z, Fu C, Hu Q, Gao F, et al. TDP-43 loss of function increases TFEB activity and blocks autophagosome-lysosome fusion. *Embo j.* 2016;35(2):121-42. Epub 2015/12/25.
40. Higashi S, Tsuchiya Y, Araki T, Wada K, Kabuta T. TDP-43 physically interacts with amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant CuZn superoxide dismutase. *Neurochem Int.* 2010;57(8):906-13. Epub 2010/10/12.
41. Woo JA, Liu T, Trotter C, Fang CC, De Narvaez E, LePochat P, et al. Loss of function CHCHD10 mutations in cytoplasmic TDP-43 accumulation and synaptic integrity. *Nat Commun.* 2017;8:15558. Epub 2017/06/07.
42. Wang W, Wang L, Lu J, Siedlak SL, Fujioka H, Liang J, et al. The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. *Nature Medicine.* 2016;22(8):869-78.
43. Bright F, Chan G, van Hummel A, Ittner LM, Ke YD. TDP-43 and Inflammation: Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15). Epub 2021/08/08.
44. Prasad A, Bharathi V, Sivalingam V, Girdhar A, Patel BK. Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:25. Epub 2019/03/07.
45. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med.* 1994;330(9):585-91. Epub 1994/03/03.
46. Abe K, Itoyama Y, Sobue G, Tsuji S, Aoki M, Doyu M, et al. Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014;15(7-8):610-7. Epub 2014/10/07.
47. Paganoni S, Macklin EA, Hendrix S, Berry JD, Elliott MA, Maisei S, et al. Trial of Sodium Phenylbutyrate-Taurursodiol for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med.* 2020;383(10):919-30. Epub 2020/09/03.
48. Jaiswal MK. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Med Res Rev.* 2019;39(2):733-48. Epub 2018/08/14.
49. Fumagalli E, Funicello M, Rauen T, Gobbi M, Mennini T. Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. *Eur J Pharmacol.* 2008;578(2-3):171-6. Epub 2007/11/27.
50. Kretschmer BD, Kratzer U, Schmidt WJ. Riluzole, a glutamate release inhibitor, and motor behavior. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998;358(2):181-90. Epub 1998/09/28.
51. Watanabe T, Yuki S, Egawa M, Nishi H. Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;268(3):1597-604. Epub 1994/03/01.
52. Del Signore SJ, Amante DJ, Kim J, Stack EC, Goodrich S, Cormier K, et al. Combined riluzole and sodium phenylbutyrate therapy in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009;10(2):85-94. Epub 2008/07/12.

53. Ryu H, Smith K, Camelo SI, Carreras I, Lee J, Iglesias AH, et al. Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurochem*. 2005;93(5):1087-98. Epub 2005/06/07.
54. Peña-Quintana L, Llarena M, Reyes-Suárez D, Aldámiz-Echevarria L. Profile of sodium phenylbutyrate granules for the treatment of urea-cycle disorders: patient perspectives. *Patient Prefer Adherence*. 2017;11:1489-96. Epub 2017/09/19.
55. Hofmann AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med*. 1999;159(22):2647-58. Epub 1999/12/22.
56. Sturmey E, Malaspina A. Blood biomarkers in ALS: challenges, applications and novel frontiers. *Acta Neurol Scand*. 2022;146(4):375-88. Epub 2022/09/27.
57. Gaetani L, Blennow K, Calabresi P, Di Filippo M, Parnetti L, Zetterberg H. Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90(8):870-81. Epub 2019/04/11.
58. Vacchiano V, Mastrangelo A, Zenesini C, Masullo M, Quadalti C, Avoni P, et al. Plasma and CSF Neurofilament Light Chain in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Cross-Sectional and Longitudinal Study. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:753242. Epub 2021/11/09.
59. Lu CH, Macdonald-Wallis C, Gray E, Pearce N, Petzold A, Norgren N, et al. Neurofilament light chain: A prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2015;84(22):2247-57. Epub 2015/05/03.
60. Benatar M, Wu J, Andersen PM, Lombardi V, Malaspina A. Neurofilament light: A candidate biomarker of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis and phenocopy. *Ann Neurol*. 2018;84(1):130-9. Epub 2018/07/18.
61. Magen I, Yacovzada NS, Yanowski E, Coenen-Stass A, Grosskreutz J, Lu CH, et al. Circulating miR-181 is a prognostic biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*. 2021;24(11):1534-41. Epub 2021/10/30.
62. Das S, Singer RH, Yoon YJ. The travels of mRNAs in neurons: do they know where they are going? *Curr Opin Neurobiol*. 2019;57:110-6. Epub 2019/02/21.
63. Terenzio M, Schiavo G, Fainzilber M. Compartmentalized Signaling in Neurons: From Cell Biology to Neuroscience. *Neuron*. 2017;96(3):667-79. Epub 2017/11/03.
64. Rodrigues EC, Grawenhoff J, Baumann SJ, Lorenzon N, Maurer SP. Mammalian Neuronal mRNA Transport Complexes: The Few Knowns and the Many Unknowns. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 2021;15.
65. Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M. Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron*. 2002;36(3):507-19. Epub 2002/11/01.
66. Wong HH, Lin JQ, Ströhl F, Roque CG, Cioni JM, Cagnetta R, et al. RNA Docking and Local Translation Regulate Site-Specific Axon Remodeling In Vivo. *Neuron*. 2017;95(4):852-68.e8. Epub 2017/08/07.
67. Formicola N, Vijayakumar J, Besse F. Neuronal ribonucleoprotein granules: Dynamic sensors of localized signals. *Traffic*. 2019;20(9):639-49.
68. Kiebler MA, Bassell GJ. Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron*. 2006;51(6):685-90. Epub 2006/09/20.
69. Subramanian M, Rage F, Tabet R, Flatter E, Mandel JL, Moine H. G-quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting. *EMBO Rep*. 2011;12(7):697-704. Epub 2011/05/14.
70. Tiruchinapalli DM, Olevnikov Y, Kelic S, Shenoy SM, Hartley A, Stanton PK, et al. Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA

in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J Neurosci*. 2003;23(8):3251-61. Epub 2003/04/30.

71. Tauber D, Tauber G, Parker R. Mechanisms and Regulation of RNA Condensation in RNP Granule Formation. *Trends Biochem Sci*. 2020;45(9):764-78. Epub 2020/06/02.

72. Buxbaum AR, Haimovich G, Singer RH. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(2):95-109. Epub 2015/01/01.

73. Maday S, Twelvetrees AE, Moughamian AJ, Holzbaur EL. Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation. *Neuron*. 2014;84(2):292-309. Epub 2014/11/07.

74. Bridgman PC. Myosin-dependent transport in neurons. *J Neurobiol*. 2004;58(2):164-74. Epub 2004/01/06.

75. Jankowsky E, Harris ME. Specificity and nonspecificity in RNA-protein interactions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(9):533-44. Epub 2015/08/20.

76. Kiebler MA, DesGroseillers L. Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron*. 2000;25(1):19-28. Epub 2000/03/09.

77. Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KY, Mele A, Fraser CE, et al. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*. 2011;146(2):247-61. Epub 2011/07/26.

78. Heraud-Farlow JE, Kiebler MA. The multifunctional Staufen proteins: conserved roles from neurogenesis to synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 2014;37(9):470-9. Epub 2014/07/12.

79. Dictenberg JB, Swanger SA, Antar LN, Singer RH, Bassell GJ. A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev Cell*. 2008;14(6):926-39. Epub 2008/06/10.

80. Olenick MA, Holzbaur ELF. Dynein activators and adaptors at a glance. *J Cell Sci*. 2019;132(6). Epub 2019/03/17.

81. Banani SF, Lee HO, Hyman AA, Rosen MK. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(5):285-98. Epub 2017/02/23.

82. Mittag T, Parker R. Multiple Modes of Protein-Protein Interactions Promote RNP Granule Assembly. *J Mol Biol*. 2018;430(23):4636-49. Epub 2018/08/14.

83. Molliex A, Temirov J, Lee J, Coughlin M, Kanagaraj AP, Kim HJ, et al. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell*. 2015;163(1):123-33. Epub 2015/09/26.

84. Hofweber M, Dormann D. Friend or foe-Post-translational modifications as regulators of phase separation and RNP granule dynamics. *J Biol Chem*. 2019;294(18):7137-50. Epub 2018/12/28.

85. Ramaswami M, Taylor JP, Parker R. Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. *Cell*. 2013;154(4):727-36. Epub 2013/08/21.

86. Encalada SE, Goldstein LS. Biophysical challenges to axonal transport: motor-cargo deficiencies and neurodegeneration. *Annual review of biophysics*. 2014;43:141-69.

87. Sleigh JN, Rossor AM, Fellows AD, Tosolini AP, Schiavo G. Axonal transport and neurological disease. *Nature Reviews Neurology*. 2019;15(12):691-703.

88. Ederle H, Dormann D. TDP-43 and FUS en route from the nucleus to the cytoplasm. *FEBS Lett*. 2017;591(11):1489-507. Epub 2017/04/06.

89. Alami NH, Smith RB, Carrasco MA, Williams LA, Winborn CS, Han SSW, et al. Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron*. 2014;81(3):536-43. Epub 2014/02/11.

90. Akiyama T, Suzuki N, Ishikawa M, Fujimori K, Sone T, Kawada J, et al. Aberrant axon branching via Fos-B dysregulation in FUS-ALS motor neurons. *EBioMedicine*. 2019;45:362-78. Epub 2019/07/03.

91. Briese M, Saal-Bauernschubert L, Lüningschrör P, Moradi M, Dombert B, Surrey V, et al. Loss of Tdp-43 disrupts the axonal transcriptome of motoneurons accompanied by impaired axonal translation and mitochondria function. *Acta Neuropathol Commun.* 2020;8(1):116. Epub 2020/07/28.
92. Charif SE, Luchelli L, Vila A, Blaustein M, Igaz LM. Cytoplasmic Expression of the ALS/FTD-Related Protein TDP-43 Decreases Global Translation Both in vitro and in vivo. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:594561. Epub 2020/12/29.
93. López-Erauskin J, Tadokoro T, Baughn MW, Myers B, McAlonis-Downes M, Chillon-Marinas C, et al. ALS/FTD-Linked Mutation in FUS Suppresses Intra-axonal Protein Synthesis and Drives Disease Without Nuclear Loss-of-Function of FUS. *Neuron.* 2018;100(4):816-30.e7. Epub 2018/10/23.
94. Guo W, Stoklund Dittlau K, Van Den Bosch L. Axonal transport defects and neurodegeneration: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2020;99:133-50.
95. Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A, Hughes L, Bevan S, Svenson IK, et al. A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *The American Journal of Human Genetics.* 2002;71(5):1189-94.
96. Brenner D, Yilmaz R, Müller K, Grehl T, Petri S, Meyer T, et al. Hot-spot KIF5A mutations cause familial ALS. *Brain.* 2018;141(3):688-97.
97. Vilariño-Güell C, Wider C, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Kachergus JM, Keeling BH, et al. Characterization of DCTN1 genetic variability in neurodegeneration. *Neurology.* 2009;72(23):2024-8. Epub 2009/06/10.
98. Theunissen F, West PK, Brennan S, Petrović B, Hooshmand K, Akkari PA, et al. New perspectives on cytoskeletal dysregulation and mitochondrial mislocalization in amyotrophic lateral sclerosis. *Translational Neurodegeneration.* 2021;10(1):46.
99. Smith BN, Ticozzi N, Fallini C, Gkazi AS, Topp S, Kenna KP, et al. Exome-wide rare variant analysis identifies TUBA4A mutations associated with familial ALS. *Neuron.* 2014;84(2):324-31. Epub 2014/11/07.
100. van Venrooij WJ, Janssen DB. hnRNP particles. *Mol Biol Rep.* 1978;4(1):3-8. Epub 1978/02/28.
101. Geuens T, Bouhy D, Timmerman V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet.* 2016;135(8):851-67. Epub 2016/05/25.
102. Thibault PA, Ganesan A, Kalyanamoorthy S, Clarke JWE, Salapa HE, Levin MC. hnRNP A/B Proteins: An Encyclopedic Assessment of Their Roles in Homeostasis and Disease. *Biology (Basel).* 2021;10(8). Epub 2021/08/28.
103. Mayeda A, Munroe SH, Cáceres JF, Krainer AR. Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins. *Embo j.* 1994;13(22):5483-95. Epub 1994/11/15.
104. Bekenstein U, Soreq H. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in health and neurodegenerative disease: from structural insights to post-transcriptional regulatory roles. *Mol Cell Neurosci.* 2013;56:436-46. Epub 2012/12/19.
105. Liu Y, Shi S-L. The roles of hnRNP A2/B1 in RNA biology and disease. *WIREs RNA.* 2021;12(2):e1612.
106. Hatfield JT, Rothnagel JA, Smith R. Characterization of the mouse hnRNP A2/B1/B0 gene and identification of processed pseudogenes. *Gene.* 2002;295(1):33-42. Epub 2002/09/21.
107. Han SP, Friend LR, Carson JH, Korza G, Barbarese E, Maggipinto M, et al. Differential subcellular distributions and trafficking functions of hnRNP A2/B1 spliceforms. *Traffic.* 2010;11(7):886-98. Epub 2010/04/22.

108. Brumwell C, Antolik C, Carson JH, Barbarese E. Intracellular trafficking of hnRNP A2 in oligodendrocytes. *Exp Cell Res.* 2002;279(2):310-20. Epub 2002/09/24.
109. Carson JH, Barbarese E. Systems analysis of RNA trafficking in neural cells. *Biology of the Cell.* 2005;97(1):51-62.
110. Akindahunsi AA, Bandiera A, Manzini G. Vertebrate 2xRBD hnRNP proteins: a comparative analysis of genome, mRNA and protein sequences. *Comput Biol Chem.* 2005;29(1):13-23. Epub 2005/02/01.
111. Guerousov S, Weatheritt RJ, O'Hanlon D, Lin ZY, Narula A, Gingras AC, et al. Regulatory Expansion in Mammals of Multivalent hnRNP Assemblies that Globally Control Alternative Splicing. *Cell.* 2017;170(2):324-39 e23. Epub 2017/07/15.
112. Reinhardt HC, Hasskamp P, Schmedding I, Morandell S, van Vugt MA, Wang X, et al. DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization. *Mol Cell.* 2010;40(1):34-49. Epub 2010/10/12.
113. Han SP, Tang YH, Smith R. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J.* 2010;430(3):379-92. Epub 2010/08/28.
114. Nguyen ED, Balas MM, Griffin AM, Roberts JT, Johnson AM. Global profiling of hnRNP A2/B1-RNA binding on chromatin highlights LncRNA interactions. *RNA Biol.* 2018;15(7):901-13. Epub 2018/06/26.
115. Dyson HJ, Wright PE. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(3):197-208. Epub 2005/03/02.
116. Chabot B, Blanchette M, Lapierre I, La Branche H. An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1. *Mol Cell Biol.* 1997;17(4):1776-86. Epub 1997/04/01.
117. Simard MJ, Chabot B. Control of hnRNP A1 alternative splicing: an intron element represses use of the common 3' splice site. *Mol Cell Biol.* 2000;20(19):7353-62. Epub 2000/09/13.
118. Blanchette M, Chabot B. A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B. *Rna.* 1997;3(4):405-19. Epub 1997/04/01.
119. Shamoo Y, Krueger U, Rice LM, Williams KR, Steitz TA. Crystal structure of the two RNA binding domains of human hnRNP A1 at 1.75 Å resolution. *Nat Struct Biol.* 1997;4(3):215-22.
120. Görlach M, Wittekind M, Beckman RA, Mueller L, Dreyfuss G. Interaction of the RNA-binding domain of the hnRNP C proteins with RNA. *Embo j.* 1992;11(9):3289-95.
121. Mayeda A, Munroe SH, Xu RM, Krainer AR. Distinct functions of the closely related tandem RNA-recognition motifs of hnRNP A1. *Rna.* 1998;4(9):1111-23.
122. Merrill BM, Stone KL, Cobianchi F, Wilson SH, Williams KR. Phenylalanines that are conserved among several RNA-binding proteins form part of a nucleic acid-binding pocket in the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein. *J Biol Chem.* 1988;263(7):3307-13.
123. Levengood JD, Tolbert BS. Idiosyncrasies of hnRNP A1-RNA recognition: Can binding mode influence function. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2019;86:150-61.
124. Megumi I, Maiko S, Ayako T, Akira N, Michiyuki Y. Two motifs essential for nuclear import of the hnRNP A1 nucleocytoplasmic shuttling sequence M9 core. *FEBS Letters.* 2006;580(5):1365-70.
125. Fridell RA, Truant R, Thorne L, Benson RE, Cullen BR. Nuclear import of hnRNP A1 is mediated by a novel cellular cofactor related to karyopherin-beta. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 11):1325-31. Epub 1997/06/01.
126. Liu X, Xu Y. HnRNPA1 Specifically Recognizes the Base of Nucleotide at the Loop of RNA G-Quadruplex. *Molecules.* 2018;23(1). Epub 2018/01/25.

- 127.Hudson JS, Ding L, Le V, Lewis E, Graves D. Recognition and binding of human telomeric G-quadruplex DNA by unfolding protein 1. *Biochemistry*. 2014;53(20):3347-56. Epub 20140515.
- 128.Wang B, Zhang L, Dai T, Qin Z, Lu H, Zhang L, et al. Liquid–liquid phase separation in human health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):290.
- 129.Gagné M. Évaluation du rôle biologique et pathologique de l'isoforme alternatif de HNRNPA1; hnRNP A1B. Faculté de médecine, Thèses et mémoires UdeM. 2022;Biochimie.
- 130.Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583-9.
- 131.Clarke JP, Thibault PA, Salapa HE, Levin MC. A Comprehensive Analysis of the Role of hnRNP A1 Function and Dysfunction in the Pathogenesis of Neurodegenerative Disease. *Front Mol Biosci*. 2021;8:659610. Epub 2021/04/30.
- 132.Jean-Philippe J, Paz S, Caputi M. hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):18999-9024. Epub 2013/09/26.
- 133.Das S, Ward SV, Markle D, Samuel CE. DNA damage-binding proteins and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 function as constitutive KCS element components of the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase promoter. *J Biol Chem*. 2004;279(8):7313-21. Epub 2003/12/03.
- 134.Lau JS, Baumeister P, Kim E, Roy B, Hsieh TY, Lai M, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as regulators of gene expression through interactions with the human thymidine kinase promoter. *J Cell Biochem*. 2000;79(3):395-406. Epub 2000/09/06.
- 135.Hay DC, Kemp GD, Dargemont C, Hay RT. Interaction between hnRNPA1 and IkappaBalpha is required for maximal activation of NF-kappaB-dependent transcription. *Mol Cell Biol*. 2001;21(10):3482-90. Epub 2001/04/21.
- 136.Ghosh M, Singh M. RGG-box in hnRNPA1 specifically recognizes the telomere G-quadruplex DNA and enhances the G-quadruplex unfolding ability of UP1 domain. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(19):10246-61. Epub 2018/09/25.
- 137.Han K, Yeo G, An P, Burge CB, Grabowski PJ. A combinatorial code for splicing silencing: UAGG and GGGG motifs. *PLoS Biol*. 2005;3(5):e158. Epub 2005/04/15.
- 138.Liu Y, Kim D, Choi N, Oh J, Ha J, Zhou J, et al. hnRNP A1 Regulates Alternative Splicing of Tau Exon 10 by Targeting 3' Splice Sites. *Cells*. 2020;9(4). Epub 2020/04/16.
- 139.Liu F, Gong CX. Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies. *Mol Neurodegener*. 2008;3:8. Epub 2008/07/12.
- 140.Kashima T, Rao N, David CJ, Manley JL. hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Hum Mol Genet*. 2007;16(24):3149-59. Epub 2007/09/22.
- 141.Fang J, Bolanos LC, Choi K, Liu X, Christie S, Akunuru S, et al. Ubiquitination of hnRNPA1 by TRAF6 links chronic innate immune signaling with myelodysplasia. *Nat Immunol*. 2017;18(2):236-45. Epub 2016/12/27.
- 142.Bonnal S, Pileur F, Orsini C, Parker F, Pujol F, Prats AC, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4144-53. Epub 20041103.
- 143.Martin J, Masri J, Cloninger C, Holmes B, Artinian N, Funk A, et al. Phosphomimetic substitution of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 at serine 199 abolishes AKT-dependent internal ribosome entry site-transacting factor (ITAF) function via effects on strand annealing and results in mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) inhibitor sensitivity. *J Biol Chem*. 2011;286(18):16402-13. Epub 20110316.

- 144.Roy R, Durie D, Li H, Liu BQ, Skehel JM, Mauri F, et al. hnRNPA1 couples nuclear export and translation of specific mRNAs downstream of FGF-2/S6K2 signalling. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(20):12483-97. Epub 20141016.
- 145.Barrera A, Ramos H, Vera-Otarola J, Fernández-García L, Angulo J, Olguín V, et al. Post-translational modifications of hnRNP A1 differentially modulate retroviral IRES-mediated translation initiation. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(18):10479-99.
- 146.Hsu MC, Pan MR, Chu PY, Tsai YL, Tsai CH, Shan YS, et al. Protein Arginine Methyltransferase 3 Enhances Chemoresistance in Pancreatic Cancer by Methylating hnRNPA1 to Increase ABCG2 Expression. *Cancers (Basel).* 2018;11(1). Epub 20181220.
- 147.Wall ML, Lewis SM. Methylarginines within the RGG-Motif Region of hnRNP A1 Affect Its IRES Trans-Acting Factor Activity and Are Required for hnRNP A1 Stress Granule Localization and Formation. *J Mol Biol.* 2017;429(2):295-307. Epub 20161213.
- 148.Buxadé M, Parra JL, Rousseau S, Shpiro N, Marquez R, Morrice N, et al. The Mnks are novel components in the control of TNF alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1. *Immunity.* 2005;23(2):177-89. Epub 2005/08/23.
- 149.Protter DS, Parker R. Principles and properties of stress granules. *Trends in cell biology.* 2016;26(9):668-79.
- 150.Guil S, Long JC, Cáceres JF. hnRNP A1 Relocalization to the Stress Granules Reflects a Role in the Stress Response. *Molecular and Cellular Biology.* 2006;26(15):5744-58.
- 151.Dunker AK, Brown CJ, Lawson JD, Iakoucheva LM, Obradović Z. Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry.* 2002;41(21):6573-82. Epub 2002/05/23.
- 152.Uversky VN. Introduction to intrinsically disordered proteins (IDPs). *Chem Rev.* 2014;114(13):6557-60. Epub 2014/07/10.
- 153.Donev RM, Doneva TA, Bowen WR, Sheer D. HnRNP-A1 binds directly to double-stranded DNA in vitro within a 36 bp sequence. *Mol Cell Biochem.* 2002;233(1-2):181-5. Epub 2002/06/27.
- 154.Deshaies JE, Shkreta L, Moszczynski AJ, Sidibe H, Semmler S, Fouillen A, et al. TDP-43 regulates the alternative splicing of hnRNP A1 to yield an aggregation-prone variant in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2018;141(5):1320-33. Epub 2018/03/22.
- 155.Kapeli K, Martinez FJ, Yeo GW. Genetic mutations in RNA-binding proteins and their roles in ALS. *Hum Genet.* 2017;136(9):1193-214. Epub 2017/08/02.
- 156.Purice MD, Taylor JP. Linking hnRNP Function to ALS and FTD Pathology. *Front Neurosci.* 2018;12:326. Epub 2018/06/06.
- 157.Gagne M, Deshaies JE, Sidibe H, Benchaar Y, Arbour D, Dubinski A, et al. hnRNP A1B, a Splice Variant of HNRNPA1, Is Spatially and Temporally Regulated. *Front Neurosci.* 2021;15:724307. Epub 2021/10/12.
- 158.Lico DT, Lopes GS, Brusco J, Rosa JC, Gould RM, De Giorgis JA, et al. A novel SDS-stable dimer of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein at presynaptic terminals of squid neurons. *Neuroscience.* 2015;300:381-92. Epub 2015/05/28.
- 159.Mohan A, Oldfield CJ, Radivojac P, Vacic V, Cortese MS, Dunker AK, et al. Analysis of molecular recognition features (MoRFs). *J Mol Biol.* 2006;362(5):1043-59. Epub 2006/08/29.
- 160.Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol.* 1999;294(5):1351-62. Epub 1999/12/22.
- 161.Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, et al. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature.* 2013;495(7442):467-73. Epub 2013/03/05.

- 162.Liu Q, Shu S, Wang RR, Liu F, Cui B, Guo XN, et al. Whole-exome sequencing identifies a missense mutation in hnRNPA1 in a family with flail arm ALS. *Neurology*. 2016;87(17):1763-9. Epub 2016/10/26.
- 163.Gilpin KM, Chang L, Monteiro MJ. ALS-linked mutations in ubiquilin-2 or hnRNPA1 reduce interaction between ubiquilin-2 and hnRNPA1. *Hum Mol Genet*. 2015;24(9):2565-77. Epub 2015/01/27.
- 164.Batlle C, Yang P, Coughlin M, Messing J, Pesarrodonna M, Szulc E, et al. hnRNPD Phase Separation Is Regulated by Alternative Splicing and Disease-Causing Mutations Accelerate Its Aggregation. *Cell Rep*. 2020;30(4):1117-28.e5. Epub 2020/01/30.
- 165.Oughtred R, Rust J, Chang C, Breitkreutz BJ, Stark C, Willems A, et al. The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Sci*. 2021;30(1):187-200. Epub 2020/11/23.
- 166.Fahey ME, Bennett MJ, Mahon C, Jäger S, Pache L, Kumar D, et al. GPS-Prot: A web-based visualization platform for integrating host-pathogen interaction data. *BMC Bioinformatics*. 2011;12(1):298.
- 167.Thomas PD, Ebert D, Muruganujan A, Mushayahama T, Albou L-P, Mi H. PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Science*. 2022;31(1):8-22.
- 168.Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, et al. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*. 2020;49(D1):D605-D12.
- 169.Jacobelli J, Bennett FC, Pandurangi P, Tooley AJ, Krummel MF. Myosin-IIA and ICAM-1 regulate the interchange between two distinct modes of T cell migration. *J Immunol*. 2009;182(4):2041-50.
- 170.Fukuda Y, Pazyra-Murphy MF, Silagi ES, Tasdemir-Yilmaz OE, Li Y, Rose L, et al. Binding and transport of SFPQ-RNA granules by KIF5A/KLC1 motors promotes axon survival. *J Cell Biol*. 2021;220(1).
- 171.Twelvetrees AE, Yuen EY, Arancibia-Carcamo IL, MacAskill AF, Rostaing P, Lumb MJ, et al. Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron*. 2010;65(1):53-65.
- 172.Bruun GH, Doktor TK, Borch-Jensen J, Masuda A, Krainer AR, Ohno K, et al. Global identification of hnRNP A1 binding sites for SSO-based splicing modulation. *BMC Biology*. 2016;14(1):54.
- 173.Nijssen J, Aguila J, Hoogstraaten R, Kee N, Hedlund E. Axon-seq decodes the motor axon transcriptome and its modulation in response to ALS. *Stem cell reports*. 2018;11(6):1565-78.
- 174.Alam MS. Proximity Ligation Assay (PLA). *Current Protocols in Immunology*. 2018;123(1):e58.
- 175.Sweeney HL, Holzbaur ELF. Motor Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2018;10(5).
- 176.Nguyen TQ, Aumont-Nicaise M, Andreani J, Velours C, Chenon M, Vilela F, et al. Characterization of the binding mode of JNK-interacting protein 1 (JIP1) to kinesin-light chain 1 (KLC1). *J Biol Chem*. 2018;293(36):13946-60. Epub 2018/07/22.
- 177.Pernigo S, Chegkazi MS, Yip YY, Treacy C, Glorani G, Hansen K, et al. Structural basis for isoform-specific kinesin-1 recognition of Y-acidic cargo adaptors. *Elife*. 2018;7. Epub 2018/10/16.
- 178.Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. 2011;7(1):539.

179. Verhey KJ, Meyer D, Deehan R, Blenis J, Schnapp BJ, Rapoport TA, et al. Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol.* 2001;152(5):959-70. Epub 2001/03/10.
180. Grassano M, Calvo A, Scholz S, Traynor B, Chiò A. Mutational Analysis of Known ALS Genes in a Large Italian Population-based Cohort (4256). *Neurology.* 2020;94(15 Supplement):4256.
181. Lee SJ, Oses-Prieto JA, Kawaguchi R, Sahoo PK, Kar AN, Rozenbaum M, et al. hnRNPs Interacting with mRNA Localization Motifs Define Axonal RNA Regulons. *Mol Cell Proteomics.* 2018;17(11):2091-106. Epub 20180723.
182. Bramham CR, Wells DG. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nature Reviews Neuroscience.* 2007;8(10):776-89.
183. Yasuda K, Clatterbuck-Soper SF, Jackrel ME, Shorter J, Mili S. FUS inclusions disrupt RNA localization by sequestering kinesin-1 and inhibiting microtubule deetyrosination. *Journal of Cell Biology.* 2017;216(4):1015-34.
184. Wippel HH, Fioramonte M, Chavez JD, Bruce JE. Deciphering the architecture and interactome of hnRNP proteins and enigmRBPs. *Molecular Omics.* 2021;17(4):503-16.
185. Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. Kinesin Transports RNA: Isolation and Characterization of an RNA-Transporting Granule. *Neuron.* 2004;43(4):513-25.
186. Muslimov IA, Tuzhilin A, Tang TH, Wong RKS, Bianchi R, Tiedge H. Interactions of noncanonical motifs with hnRNP A2 promote activity-dependent RNA transport in neurons. *Journal of Cell Biology.* 2014;205(4):493-510.
187. Mitsumori K, Takei Y, Hirokawa N. Components of RNA granules affect their localization and dynamics in neuronal dendrites. *Mol Biol Cell.* 2017;28(11):1412-7. Epub 20170412.
188. Schoepp DD. Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2001;299(1):12-20.
189. Davidovic L, Jaglin XH, Lepagnol-Bestel A-M, Tremblay S, Simonneau M, Bardoni B, et al. The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Human Molecular Genetics.* 2007;16(24):3047-58.
190. Doron-Mandel E, Koppel I, Abraham O, Rishal I, Smith TP, Buchanan CN, et al. The glycine arginine-rich domain of the RNA-binding protein nucleolin regulates its subcellular localization. *Embo j.* 2021;40(20):e107158. Epub 20210913.
191. van der Lee R, Buljan M, Lang B, Weatheritt RJ, Daughdrill GW, Dunker AK, et al. Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chemical Reviews.* 2014;114(13):6589-631.
192. Miles AJ, Drew ED, Wallace BA. DichroIDP: a method for analyses of intrinsically disordered proteins using circular dichroism spectroscopy. *Communications Biology.* 2023;6(1):823.
193. Stetler RA, Gan Y, Zhang W, Liou AK, Gao Y, Cao G, et al. Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 2010;92(2):184-211. Epub 20100604.
194. Chen S, Brown IR. Translocation of constitutively expressed heat shock protein Hsc70 to synapse-enriched areas of the cerebral cortex after hyperthermic stress. *Journal of neuroscience research.* 2007;85(2):402-9.
195. Suzuki T, Usuda N, Murata S, Nakazawa A, Ohtsuka K, Takagi H. Presence of molecular chaperones, heat shock cognate (Hsc) 70 and heat shock proteins (Hsp) 40, in the postsynaptic structures of rat brain. *Brain Res.* 1999;816(1):99-110.

196. Alecki C, Rizwan J, Le P, Jacob-Tomas S, Xu S, Minotti S, et al. Localized synthesis of molecular chaperones sustains neuronal proteostasis. *bioRxiv*. 2023:2023.10.03.560761.
197. Kamelgarn M, Chen J, Kuang L, Arenas A, Zhai J, Zhu H, et al. Proteomic analysis of FUS interacting proteins provides insights into FUS function and its role in ALS. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2016;1862(10):2004-14.
198. Anees A, Salapa HE, Thibault PA, Hutchinson C, Hammond SA, Levin MC. Knock-Down of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Results in Neurite Damage, Altered Stress Granule Biology, and Cellular Toxicity in Differentiated Neuronal Cells. *eneuro*. 2021;8(6):ENEURO.0350-21.2021.
199. Gopal PP, Nirschl JJ, Klinman E, Holzbaur ELF. Amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations increase the viscosity of liquid-like TDP-43 RNP granules in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(12):E2466-E75.
200. Coyne AN, Lorenzini I, Chou CC, Torvund M, Rogers RS, Starr A, et al. Post-transcriptional Inhibition of Hsc70-4/HSPA8 Expression Leads to Synaptic Vesicle Cycling Defects in Multiple Models of ALS. *Cell Rep*. 2017;21(1):110-25.
201. Cooper-Knock J, Walsh MJ, Higginbottom A, Robin Highley J, Dickman MJ, Edbauer D, et al. Sequestration of multiple RNA recognition motif-containing proteins by C9orf72 repeat expansions. *Brain*. 2014;137(Pt 7):2040-51. Epub 20140527.
202. Mori K, Lammich S, Mackenzie IRA, Forné I, Zilow S, Kretzschmar H, et al. hnRNP A3 binds to GGGGCC repeats and is a constituent of p62-positive/TDP43-negative inclusions in the hippocampus of patients with C9orf72 mutations. *Acta Neuropathologica*. 2013;125(3):413-23.
203. Honda H, Hamasaki H, Wakamiya T, Koyama S, Suzuki SO, Fujii N, et al. Loss of hnRNPA1 in ALS spinal cord motor neurons with TDP-43-positive inclusions. *Neuropathology*. 2015;35(1):37-43. Epub 2014/10/24.
204. An M, Gao Y. Urinary Biomarkers of Brain Diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(6):345-54. Epub 20160102.
205. Yang KS, Im H, Hong S, Pergolini I, Del Castillo AF, Wang R, et al. Multiparametric plasma EV profiling facilitates diagnosis of pancreatic malignancy. *Sci Transl Med*. 2017;9(391).
206. Hadisurya M, Li L, Kuwarananchaoen K, Wu X, Lee Z-C, Alcalay RN, et al. Quantitative proteomics and phosphoproteomics of urinary extracellular vesicles define putative diagnostic biosignatures for Parkinson's disease. *Communications Medicine*. 2023;3(1):64.