

Université de Montréal

**La conséquence de l'expression de hnRNP A1^B sur la
réponse cellulaire au stress**

par Sophie Rolland

Université de Montréal

Faculté de médecine

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de maîtrise

en Neurosciences

Avril, 2018

© Sophie Rolland, 2018

Résumé

L'un des mécanismes de protection de première ligne par lequel les cellules répondent à une agression ou à un facteur de stress environnemental défavorable est la formation de granules de stress (GS). Les GS sont des structures cytoplasmiques, de la taille d'un micron, hautement dynamiques, contenant des ARNm, transcrits, mais non traduits, ainsi qu'une large gamme de protéines. Plusieurs éléments suggèrent que la réponse au stress via les GS est perturbée dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Cependant, on en sait très peu sur les mécanismes de régulation de l'assemblage et du désassemblage de ces granules ribonucléoprotéiques. HnRNP A1 est une protéine de liaison à l'ARN qui pourrait affecter la récupération des cellules. HnRNP A1 est très abondante dans les motoneurones. L'épissage alternatif produit une seconde isoforme, hnRNP A1^B, qui est physiologiquement exprimée à un plus faible niveau. HnRNP A1^B provient de l'inclusion de l'exon 7B dans le transcrite de hnRNPA1. Cela conduit à la rétention de 52 acides aminés dans le domaine apparenté aux prions de la protéine.

Nous avons récemment démontré que hnRNP A1^B est augmentée dans les tissus de patients affectés par la SLA et que la protéine possède une plus forte propension à s'agréger comparé à la forme sauvage, hnRNPA1 et par conséquent, cela augmente la toxicité pour la cellule.

La fonction de hnRNP A1^B dans la dynamique des granules de stress n'a pas encore été élucidée. Nous avons émis l'hypothèse que l'épissage alternatif augmenté de hnRNP A1^B contribue à la toxicité cellulaire par: i) la perturbation de la dynamique des granules de stress, et ii) la formation d'inclusions cytoplasmiques déclenchée par hnRNP A1^B. À l'aide de méthodes *in vitro*, nous avons démontré comment hnRNP A1^B affecte la réponse au stress cellulaire en altérant la dynamique des granules de stress.

Mots-clés : Sclérose latérale amyotrophique, hnRNP A1, hnRNP A1^B, épissage alternatif, granules de stress, *processing bodies*, agrégation protéique, domaine apparenté aux prions

Abstract

A first-line protective mechanism by which cells respond to an adverse environmental insult or stressor is the formation of stress granules (SGs). SGs are micron-sized, cytoplasmic structures that are highly dynamic and contain translationally arrested mRNAs and a broad range of proteins. Several lines of evidence suggest that the SG response is perturbed in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). However, very little is known regarding the regulatory mechanisms of SG assembly and disassembly. One protein that could affect the recovery of cells from stress is the RNA binding protein hnRNP A1. This protein is highly abundant in motor neurons. The protein product of its alternatively spliced isoform, hnRNP A1^B, is physiologically expressed at low levels. HnRNP A1^B arises from the inclusion of exon 7B in the hnRNP A1 transcript. This leads to the retention of 52 amino acids in the protein's prion-like domain.

We have recently shown that hnRNP A1^B is increased in ALS-affected tissues and that it has a higher propensity to aggregate compared to hnRNP A1 and this correlates with increased toxicity. The function of hnRNP A1^B in SG dynamics has yet to be elucidated. We hypothesize that increased splicing of hnRNP A1 to hnRNP A1^B contributes to cellular toxicity by: a) disrupting SG dynamics, and b) hnRNP A1^B triggers formation of cytoplasmic inclusions. Our work indicates how hnRNP A1^B affects the cellular stress response by altering SG dynamics.

Keywords : amyotrophic lateral sclerosis, hnRNP A1, hnRNP A1^B, stress granules, processing bodies, stress response, protein aggregation, prion like domain

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures	vi
Liste des sigles	vii
Liste des abréviations	viii
Remerciements.....	x
Introduction	1
La réponse cellulaire au stress	1
1.1 La découverte	1
1.2 Les granules de stress	2
1.2.1 Composition protéique des granules de stress canoniques.....	2
1.2.2 Séparation de phase par Interface liquide-liquide.....	3
1.2.3 La cinétique des granules de stress	4
1.2.4 La survie cellulaire et la formation de granules de stress	7
1.3 Les <i>processing bodies</i>	8
1.3.1 Généralités	8
1.3.2 La dégradation des ARNm dans les PB	8
1.3.3 Interaction entre les PB et les GS	9
1.4 La réponse au stress dans un contexte pathologique	11
2. Sclérose latérale amyotrophique	13
2.1 Historique.....	13
2.2 Épidémiologie et considérations cliniques.....	13
2.3 Étiologie de la neuropathologie.....	14
2.3.1 Pathogenèse motoneuronale	15
2.3.1.1 Génétique	15
2.3.1.2 Stress oxydatif et dysfonctions mitochondriales	16

2.3.1.3	Excitotoxicité.....	19
2.3.1.4	Métabolisme des ARN	19
2.3.1.5	Agrégation protéique.....	20
2.4	Démence fronto-temporale.....	21
3.	Protéines de liaison à l'ARN.....	23
3.1	TDP-43.....	24
3.1.1	Généralités.....	24
3.1.2	Implication dans la SLA.....	24
3.2	hnRNP A1	25
3.2.1	Généralités.....	25
3.2.2	Épissage alternatif.....	25
3.2.3	Fonctions	27
3.2.4	Implication dans la SLA.....	28
3.3	TDP-43 et hnRNP A1 dans le contexte de la SLA.....	29
	Hypothèses et objectifs.....	31
	Matériel et méthodes.....	32
1.	Constructions	32
2.	Culture cellulaire et transfection.....	32
3.	Stress oxydatif à l'arsénite de sodium.....	33
4.	Immuno- buvardage	33
5.	Immunofluorescence	33
6.	Quantification de la taille et du nombre de GS et PB	34
8.	Analyse statistique.....	35
	Résultats	36
1.	HnRNP A1 ^B perturbe la dynamique des granules de stress en retardant l'assemblage. ...	36
2.	L'expression de hnRNP A1 ^B favorise l'agrégation <i>in vitro</i>	40
3.	HnRNP A1 ^B retarde l'assemblage des PB.....	43
4.	HnRNP A1 ^B interfère dans l'amarrage avec les GS	47
	Discussion.....	49

Conclusion	58
Bibliographie	62
Annexe.....	77

Liste des figures

Figure 1.	Les GS et les PB sont des granules à ARN impliqués dans la réponse au stress	10
Figure 2.	La phosphorylation de eIF2 α est assurée par quatre kinases.	12
Figure 3.	La découverte des gènes associés à la SLA	16
Figure 4.	Les mutations de SOD1 affectent plusieurs voies de signalisation cellulaire, les rendant dysfonctionnelles	18
Figure 5.	La SLA et la DFT peuvent être considérées dans un continuum	22
Figure 6.	Schématisation des domaines fonctionnels de hnRNPA1.....	26
Figure 7.	L'expression de hnRNP A1 ^B modifie la cinétique en terme de taille mais non de nombre des GS	38
Figure 8.	La surexpression de hnRNP A1 ^B réduit le niveau protéique de G3BP1.	39
Figure 9.	L'ajout de l'exon 7B dans la DRG favorise l'agrégation protéique	42
Figure 10.	L'expression de hnRNP A1 ^B perturbe la dynamique des PB en condition basale	45
Figure 11.	L'expression de hnRNP A1 ^B résulte en une taille inférieure pour les PB	46
Figure 12.	L'amarrage entre les GS et les PB est réduit dans les cellules exprimant hnRNP A1 ^B	48
Figure 13.	L'expression augmentée de hnRNP A1 ^B est potentiellement nocive pour la cellule	57

Liste des sigles

ADN: acide désoxyribonucléique
ARN: acide ribonucléique
ARNm: ARN messenger
DFT: Démence fronto-temporale
DRG: Domaine riche en glycine
EC: élément conservé
FB: forme bulbaire
FS: forme spinale
GDP: Guanosine diphosphate
GS: granule de stress
GTP: Guanosine triphosphate
hnRNP: *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein*
kDa: kilodalton
LLPS: *liquid-liquid phase separation*
NES: *Nuclear export sequence*
NLS: *Nuclear localisation sequence*
PB: *processing bodies*
PrLD: *Prion like domain*
RBP: *RNA-binding protein*
ROS: *reactive oxygen species*
RRM: *RNA recognition motifs*
RRG: *Rich-Arginine-glycine motif*
SA: arsénite de sodium
SLA: sclérose latérale amyotrophique
fSLA: sclérose latérale amyotrophique familiale
sSLA: sclérose latérale amyotrophique sporadique
 α : alpha
 β : beta
 κ : Kappa

Liste des abréviations

Cat. # : Numéro de catalogue

Cell. : cellule

Fig. : Figure

min. : minute

Etc. : Et cætera

Ex : exemple

À toi qui m'a quitté trop tôt, mais qui veille sur moi d'en haut, je t'aime maman

Remerciements

Le temps des remerciements ... Ils sont nécessaires, car sans vous, qui m'avez supporté, guidé, enduré, aimé, conseillé, motivé, inspiré, encouragé, je n'y serais pas arrivée avec un tel sentiment du devoir accompli.

Je commencerai en te remerciant Christine, non seulement pour m'avoir accueillie dans ton laboratoire, mais aussi pour m'avoir permis de toucher à différents projets avant de commencer le mien. J'ai pu acquérir une variété de nouvelles aptitudes en biochimie, biologie moléculaire et cellulaire. Venant d'une formation en neurosciences, rien n'aurait pu m'être plus bénéfique, cela m'a fait toucher à des techniques de laboratoire, mais aussi cela m'a permis de comprendre qu'en recherche, l'optimisation est souvent plus longue que l'expérience en elle-même. Merci de ta patience et d'avoir contribué à mon dépassement personnel et professionnel, j'ai toujours été fière d'être dans la VV team !

Je te remercie Jade, pour m'avoir pris sous ton aile, dans ton projet de maîtrise, pour que je puisse apprendre les rudiments de laboratoire et les bonnes pratiques. Je suis pas mal fière d'avoir, même si ce ne fut que durant quelques mois, côtoyé de près cet ambitieux projet qui est maintenant publié. Je te remercie Laurie pour avoir été là, non seulement pour me montrer les techniques avec autant de professionnalisme, mais aussi pour ta présence et ton calme légendaire. Merci Sabrina, d'être une collègue de laboratoire disponible et attentive, tu as été mon exemple de minutie et de persévérance. Merci Sarah, Yousra, Myriam, Hadjara, Walters pour vos conseils et votre disponibilité. Céline, je l'ai déjà fait de vive voix, je le refais encore, merci de m'avoir poussé, critiqué et même quelques fois disputé, parce que venant de toi, c'était une grosse dose d'amour et surtout une démonstration de confiance en mes aptitudes. Je ne serais pas la scientifique que je suis aujourd'hui sans ta contribution. Merci au FRSQ pour la bourse, sans soucis financiers, c'est plus facile.

C'est une chance d'être au CRCHUM, cela m'a permis de côtoyer des scientifiques dans d'autres champs de recherche, et ouvrir mon cercle de connaissances. En particulier merci au labo Parker pour m'avoir enseigné l'art des *C elegans*, même si finalement, cela n'a pas fait partie de mon projet, c'est maintenant dans mon bagage. Merci à Sandra du labo Fernandes, pour avoir partagé avec moi l'art d'un mémoire bien construit, de m'avoir guidé et conseillé.

Merci à Dr Lacaille et Dr Sapieha, de mon comité de parrainage, vos judicieux conseils m'ont guidé et assuré mon projet de recherche.

Finalement, ma famille, mes amis... vous êtes si précieux. Merci à vous, Lyam, Félix et Antoine, mes garçons, merci d'avoir voulu partager votre maman avec la science et à vous Frédérique, ma fille et Charles, mon beau-fils, d'avoir été présents, conciliants et aidants. Ensemble, nous avons démontré qu'avec beaucoup d'amour, on peut soulever des montagnes, je vous aime tellement mes amours. Merci à mes sublimes amis. Plus particulièrement à toi Val, pour être mon rayon de soleil et Max, sans toi, mon Bac n'aurait pas été le même... nous étions quand même la première cohorte de neurosciences, et de surcoût, en cheminement Honor, tout un accomplissement. Merci à toi Just, pour avoir été là, à partager ma bulle et surtout d'avoir *masterisé* EndNote aussi rapidement ! Merci à Pogo d'avoir accompagné mes déplacements au CRCHUM, c'est quand même 3,5 heures par jour que l'on a passé ensemble ! Merci à ma maman qui nous a quittée avant de me voir graduer et mon papa d'être aussi impliqué. Je vous aime, tous, tellement.

J'ai gardé le mot de la fin pour toi mon mari, ma moitié, mon homme à moi. Parce que tu es celui qui m'ancre dans la tempête et fait que je me relève chaque fois que la vie me fait une jambette. On va s'aimer encore, à la vie à la mort, de plus en plus fort, on va s'aimer encore. Faire ma maîtrise aurait été impossible sans vous tous.

Introduction

La réponse cellulaire au stress

1.1 La découverte

Quand des changements d'ordres physiologiques, externes ou émanant d'une pathologie, menacent l'homéostasie cellulaire, de nombreux mécanismes de réponse au stress s'organisent et se coordonnent afin de préserver l'intégrité et la survie de la cellule [5, 6]. Ces mécanismes sont mis en place afin de limiter les dommages, réparer les altérations et/ou entrer en apoptose [7-10]. Certains de ces processus biologiques adaptatifs sont si importants, qu'ils sont hautement conservés [11]. À titre d'exemple, lorsque les cellules sont exposées à des températures élevées, s'enclenche la transcription d'un groupe de gènes codant pour des protéines chaperonnes, nommées protéines de choc thermique (HSP), est retrouvé tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes [12, 13].

Chez les eucaryotes, la réponse intégrée aux stress se définit comme étant le déclenchement de cascades moléculaires complexes, quand l'homéostasie cellulaire est perturbée. Des stress comme des carences en acides aminés ou glucose, l'hypoxie, les infections virales et les autres stress comme le stress oxydatif ou osmotique [5, 6, 14, 15] déclenchent la réponse au stress intégrée. L'élément clé de la réponse intégrée reste la phosphorylation de eIF2 α , qui sera abordé ultérieurement [5, 6, 14-17]. La formation d'agrégats de ribonucléoprotéines, appelés granules de stress (GS), qui s'organise de façons aléatoires dans tout le cytoplasme des cellules stressées, est un autre exemple de mécanisme favorisé lors de l'activation de la réponse au stress intégrée [18].

1.2 Les granules de stress

L'homéostasie cellulaire est précaire et doit être préservée afin d'assurer la pérennité des cellules et le bon fonctionnement cellulaire, tissus et organes mammaliens. Lorsque les cellules sont soumises à un stress, qu'il soit de nature osmotique [19, 20], thermique [21], oxydatif [18, 22], ionisant [23, 24], ou encore viral [25], des mécanismes de protection s'organisent. Parmi ceux-ci, la formation de « foci » cytoplasmiques, les GS, s'enclenche rapidement.

On nomme GS ces petits « foci » cytoplasmiques et dynamiques, de moins de $5\mu\text{m}^2$, sans membrane, composés d'ARN polyadénylés, de facteurs d'initiation de la traduction (eIF3, eIF4E, eIF4G), de petites sous-unités ribosomales et de protéines liant l'ARNm (RBP) comme TIA-1, HuR, TDP-43, etc. Elles sont formées à la suite de la phosphorylation de eIF2 α , et répondent à une dynamique de formation, à l'exposition au stress, à la fusion, au cours du temps et au désassemblage une fois le stress disparu. Leur formation est induite ou inhibée par l'utilisation de drogues comme la puromycine ou cycloheximide, respectivement [18, 26].

1.2.1 Composition protéique des granules de stress canoniques

La composition protéique des GS est plutôt hétérogène. Pendant longtemps, il fut impossible de purifier des GS en raison de leur nature labile dynamique et sans membrane. Les composantes des GS sont en échange constant avec le cytoplasme [27, 28] et plusieurs protéines vont entrer et sortir des GS dans un flux constant [27], ceci conférant aux GS leur nature dynamique. Cependant, tout récemment, une équipe de l'université du Colorado, aurait réussi l'impossible en isolant le « cœur » de granules de stress, à l'aide de centrifugations séquentielles et d'enrichissement par immunoprécipitation [29].

Outre les ARNm, des facteurs d'initiations et la sous-unité ribosomale 40S, de nombreuses protéines sont présentes dans les GS. On y trouve des protéines impliquées dans la régulation de la traduction des ARNm comme Caprin1 [30]. On note aussi la présence de protéines présentes dans des cascades de signalisation intracellulaires apoptotiques, comme TNF receptor associated factor 2 (Traf2). Traf2 est impliquée dans la voie d'activation de NF- κ B par le TNF α [31].

Enfin, une panoplie de protéines de liaison à l'ARN, régulant fonctions et structures de l'ARNm s'y trouvent. Poly A binding protein 1 (PABP1) qui se lie à la queue poly(A) des ARNm [18]. Les protéines T-cell-restricted intracellular antigen-1 (TIA-1) et GAP SH3 domain-binding protein 1 (G3BP1) sont les marqueurs de GS les plus utilisés et leur surexpression a la particularité d'induire la formation de « foci » cytoplasmiques ayant été nommés GS constitutives [32]. Ceci est cohérent avec leur aptitude à faire la nucléation des GS, même en absence de stress [33]. Sans oublier les protéines multifonctionnelles, impliquées dans le transport, la stabilité et le métabolisme de l'ARN comme TAR DNA Binding Protein (TDP-43) et heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) pour ne nommer que celles-ci.

Les GS ont longtemps été perçus comme des inclusions quasi uniformes induites par différents stress. Cependant, la littérature semble maintenant scinder les GS en sous-types selon différents critères. Sans être exhaustif, mentionnons que les GS dites canoniques « canonical stress granules » sont ceux induits par le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α phosphorylé, la présence d'ARNm polyadénylés et ayant un pourcentage élevé de GS immunoréactif pour G3BP1 [18, 26, 34]. Alors que les GS dits non canoniques sont formés indépendamment de la phosphorylation de eIF2 (et contiennent peu d'ARNm polyadénylés, 35, 36]. Alors que les GS dits non canoniques sont formés indépendamment de la phosphorylation de eIF2 α et contiennent peu d'ARNm polyadénylés [37]. Notons que les stress oxydatifs comme celui à l'arsénite de sodium (NaAsO₂), le choc thermique, et le stress ionisant (UV) formeraient des GS canoniques alors que les stress purement osmotiques (ex : NaCl), ou l'exposition au Pateamine A induiraient des GS dites non canoniques [26, 34].

1.2.2 Séparation de phase par Interface liquide-liquide

Plusieurs réactions biochimiques complexes ont lieu dans la cellule. Pour être efficaces et précises, ces réactions doivent être séquestrées dans un environnement chimique approprié, distinct et délimité, mais avec une perméabilité sélective permettant à ces réactions/interactions d'avoir lieu. Les organelles, délimitées par leur membrane, sont un exemple évident de ces environnements aux fonctionnalités cellulaires distinctes. Cependant, en ce qui concerne les inclusions sans membrane comme les nucléoles [38] ou les GS, il est moins intuitif d'illustrer ce principe.

L'observation de granule P provenant d'embryons de *Caenorhabditis elegans* par microscopie électronique fut une première explication de la possibilité de compartimentation sous forme de « gouttelettes » [39]. C'est en 2009 qu'une équipe du Max Planck Institute en Allemagne, réitérait en décrivant les granules P comme des gouttelettes qui se condensaient, fusionnaient, échangeaient des composants avec le cytoplasme rapidement et qui se dissolvaient dans le cytoplasme confirmant leur nature liquide [40]. La séparation de phase par interface liquide-liquide (LLPS) fut dès lors proposée pour décrire comment les composantes des foci se concentrent rapidement de façon réversible dans la cellule [41].

La nature extrêmement dynamique des GS, dont la nucléation et le désassemblage qui s'effectuent sur un peu plus d'une dizaine de minutes [27] et la période de résidences de ses composantes qui varie de quelques secondes à quelques minutes laissent à penser qu'elles pourraient aussi émerger par LLPS [9]. Cette nouvelle modélisation des GS retient de plus en plus l'attention. Il fut d'abord démontré que hnRNP A1 et FUS, avec leur région riche en glycine (DRG) avait la capacité de se concentrer en gouttelette par LLPS [42, 43]. Par la suite, ce modèle a été bonifié en caractérisant la structure séquentielle de ses composants. Ainsi, les GS s'assembleraient, d'abord, en LLPS, avec un « cœur » dense et stable, contenant les protéines de nucléation comme G3BP1 et TIA-1 et composé d'interactions multivalentes faibles entre les domaines riches en glycine (DRG). Ce cœur, qui par la suite, serait entouré d'une coquille plus visqueuse et moins concentrée, maintenue ensemble par de faibles interactions [44].

1.2.3 La cinétique des granules de stress

Les GS sont des inclusions cytoplasmiques très dynamiques et les différentes étapes structurant l'apparition et la disparition des GS se nomment cinétique [28]. L'exposition au stress plonge les cellules dans un mode transitoire où elles arrêtent momentanément la traduction. Les polysomes, du complexe d'initiation de la traduction bloquée, se dissocient et s'accumulent dans la cellule [18].

Dès l'exposition à la plupart des stress, la phosphorylation d'eIF2 α est une étape critique pour la formation des GS [45]. Elle va interférer dans la formation du complexe ternaire d'initiation de la traduction eIF2 α -GTP-tRNAⁱ Met [45].

De ce fait, eIF2 α -P empêche l'échange d'un GDP par un GTP inhibant par conséquent, la formation du complexe d'initiation de la traduction. Cette pause transitoire résulte en accumulation d'ARNm dont la traduction a été momentanément arrêtée, constituant la première étape de formation des GS, caractérisée par l'apparition de nombreuses petites inclusions cytoplasmiques [45].

La genèse des GS repose sur les domaines caractéristiques de ses protéines de nucléation. Le domaine riche en glycines (DRG), un domaine intrinsèquement désordonné, est constitué de répétitions enrichies en glycine, pouvant se retrouver au N-terminale comme au C-terminale [46]. Cette séquence particulière est réputée d'avoir la capacité de favoriser l'agrégation, et par conséquent avoir l'aptitude à induire la nucléation des GS [32]. TIA-1 et G3BP1 possèdent ce domaine spécifique favorisant les interactions protéine-protéine [27]. TIA-1 arbore un DRG et G3BP1 est, quant à elle, caractérisée par son domaine de dimérisation. En effet, la phosphorylation de la sérine 149 empêche l'autoagrégation et diminue la capacité de G3BP1 de nucléer les GS lors d'un stress à l'arsénite de sodium (SA) [33]. Caprin1, une autre protéine de nucléation [30], lorsque liée avec le RRG de G3BP1, favoriserait l'induction des GS. À l'effet opposé, l'ubiquitin-specific protease 10 (USP10), une enzyme qui hydrolyse l'ubiquitine [47] inhibe la formation de GS lorsqu'elle se lie à G3BP1 [48].

Dans le décours temporel de la cinétique des GS, après la nucléation, s'ensuit une étape dite, de coalescence, où les petits GS vont fusionner entre eux de façon à former de plus gros GS et en dénombrement réduit [27, 49]. Le nocodazole, est une drogue qui interfère avec la polymérisation des microtubules. Son utilisation dans l'étude de la contribution du cytosquelette dans la cinétique des GS a révélé que les microtubules contribuent à l'assemblage des GS. En effet, en déstabilisant les microtubules avec le nocodazole ou encore avec de la vinblastine, la nucléation peut encore avoir lieu de façon réduite, alors que la coalescence et le désassemblage sont inhibés [50, 51]. De plus la présence de dynéine et de kinésine, deux protéines motrices de transport antérograde et rétrograde (respectivement) a été démontré et la déplétion de ces deux protéines suggère qu'elles jouent un rôle dans l'assemblage et le désassemblage des gros GS [52]. Toutefois, bien que ces démonstrations indiquent que le cytosquelette joue un rôle dans la cinétique des GS, le rôle exact des microtubules demande encore à être clarifié.

Il est à noter que cette étape d'agrégation secondaire, où les GS sont plus gros, semble être celle qui favorise l'amarrage entre les GS et un autre type de granules à ARN, les PB qui seront décrits par la suite [53].

C'est sans doute l'étape finale de la cinétique qui est la moins comprise à ce jour. Conformément à leur nature transitoire, les GS se forment, fusionnent et une fois le stress éclipsé, les GS disparaissent des cellules, permettant à la cellule de reprendre ses activités et de surcroît, réinstaurer la traduction [54]. Il fut longtemps pensé qu'au contraire de l'assemblage qui se fait par étapes, le désassemblage semble être plus de type spontané. Cependant, de nouvelles évidences semblent indiquer que tout comme l'assemblage, le désassemblage se ferait en étapes, mais dans une fenêtre temporelle très étroite [44, 55]. L'autophagie consiste à la dégradation de certains éléments ciblés du cytoplasme dans le but de rétablir l'homéostasie cellulaire. Ce mécanisme de régulation homéostatique peut se produire par liaison aux lysosomes de la cellule ou encore être médié par des protéines chaperonnes [56-59].

L'enzyme ATP-ase, *Valosine containing protein* (VCP) est une protéine de type chaperonne qui joue différents rôles, mais plus particulièrement, facilite la dégradation, dans les protéasomes, des substrats qui sont poly-ubiquitinés [60, 61]. Plusieurs mutations de VCP sont maintenant liées à la sclérose latérale amyotrophique (SLA) [62-65]. Il fut démontré, en 2013 que les GS, chez la levure, pouvaient être ciblés pour subir l'autophagie [66]. La rapamycine est un agent immunosuppresseur [67], et qui induit l'autophagie [68]. L'équipe du Dr Parker a d'abord démontré que l'utilisation de la rapamycine dans des cellules stressées avec du SA favorisait la disparition des GS [9]. De plus, en utilisant un inhibiteur de l'autophagie, la wortmannin, il fut démontré que le désassemblage des GS est perturbé car les cellules, traitées avec la molécule qui inhibe l'autophagie, conservent leurs GS après la résolution du stress [9]. Ces différentes preuves tendent à démontrer que l'autophagie joue un rôle dans le désassemblage des GS.

1.2.4 La survie cellulaire et la formation de granules de stress

À strictement parler, on décrit les GS en spécifiant qu'ils sont la manifestation d'une répression des fonctions basales cellulaires et séquestrant les ARNm néo-transcrits. Le tout afin de faire place aux mécanismes de réponse au stress et, par conséquent, favoriser la survie cellulaire; il est concevable de conclure que les GS sont cytoprotectifs. En ce sens, des évidences semblent indiquer que la formation de GS limite l'augmentation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), lesquelles sont produites lorsque les cellules sont exposées au stress par le biais de G3BP1 et USP10. La régulation à la baisse des ROS interrompt, par le fait même, la cascade de signalisation menant à l'apoptose qui est normalement induite par l'augmentation de ROS [69, 70]. De plus, il fut démontré qu'en inhibant la phosphorylation de eIF2 α ou encore avec la déplétion de « protéines de GS » comme TIA-1, les cellules étaient beaucoup plus vulnérables lorsqu'exposées à un stress [71].

Une équipe de chercheurs, qui inclut des médecins et des pharmaciens, a opté pour une nouvelle approche thérapeutique qui vise directement les GS. Ils ont fait un criblage afin de trouver une molécule qui vient inhiber la formation d'inclusions immunoréactives pour TDP-43 lorsqu'exposés à un stress oxydatif reconnu pour induire les GS [72]. Les premiers résultats expérimentaux dans des cellules ont été prometteurs et les molécules ciblées sont en essai préclinique. L'avenir saura nous révéler si cela s'avère une cible thérapeutique prometteuse.

Aussi, la séquestration des protéines favorisant l'apoptose comme Traf2, Rock1 et Rack1 dans les GS, prévient le déclenchement de la cascade apoptotique, ce qui est favorable en cas de stress transitoire [31, 73]. Cependant, la fine régulation de la dynamique des GS est sous la loupe de plusieurs équipes de recherche. En effet, comme des protéines liées à plusieurs maladies neurodégénératives, formant des agrégats insolubles, co-localisent avec les GS, il est louable de s'y attarder. Ce qui est le cas pour TDP-43, formant des agrégats hautement insolubles et retrouvés dans 97% des tissus de patients atteints de SLA, ce qui sera discuté ultérieurement [74].

1.3 Les *processing bodies*

1.3.1 Généralités

Une fois le stress passé, la cellule reprend le cours normal de ses activités et fonctions, ainsi le dessein des ARNm emmagasinés est double, soit ils retournent aux polysomes afin d'être traduits, soit ils sont transférés dans les PB [9]. Comparativement aux GS, les PB sont présents dans les cellules prolifératives et quiescentes, mais sont induits plus fortement lors de l'exposition aux stress [45]. Ils sont plus petits, plus denses et de formes plus régulières. La fonction exacte des PB est encore source de nombreux débats dans la littérature, mais il semblerait toutefois, exister un consensus sur le fait que le transfert des ARNm aux PB est destiné à la dégradation [45]. De nouvelles évidences remettent cette conclusion en question et les détails seront abordés dans la section suivante [75].

Les granules de stress et les PB partagent un certain nombre de composants similaires, mais ils se distinguent par la composition de leur « cœur ». Ainsi le cœur des GS serait composé de la machinerie nécessaire à la traduction des ARNm alors que le « cœur » des PB contiendrait la machinerie dédiée à la dégradation et la répression des ARNm [76-79].

1.3.2 La dégradation des ARNm dans les PB

La dégradation des ARNm donne la flexibilité cellulaire requise pour changer rapidement les niveaux de traduction afin de s'adapter et répondre adéquatement aux signaux environnementaux ou métaboliques. La dégradation des ARNm fait partie de ces mécanismes de régulation qui donne la malléabilité souhaitée aux cellules.

Les PB sont composés d'enzymes « décapantes » de l'ARNm, mRNA decapping enzyme 1 et 2 (DCP1 et 2) [80] ainsi que des protéines de répression de traduction, telles les protéines Argonautes [81]. La dégradation des ARNm débute, habituellement par une déadénylase qui raccourcit la queue poly(A) afin de faire de la place pour qu'une exonucléase puisse faire la dégradation du 5'-3' [82]. Le « cœur » des PB est composé de l'enzyme décapante DCP1 et de l'exonucléase XRN1 [83]. Cela étant cohérent avec la fonction de dégradation des ARNm par les PB.

Les techniques de génomiques et protéomiques se raffinent et ce progrès récent a permis à une équipe de chercheurs de Paris de révéler avec plus de précision la composition des PB. Outre les nombreuses protéines associées à la répression de la traduction et la dégradation de l'ARNm, Hubstenberger et ses collaborateurs ont réussi à mettre en évidence que les ARNm de PB n'étaient pas différents des autres ARNm [75].

Avec des demi-vies similaires et une distribution qui n'est pas polarisée, comme on l'aurait pensé, pour la dégradation, les ARNm dans les PB sont certes en arrêt transitoire de traduction, mais ne seraient pas destinés uniquement à la dégradation. Ils ont aussi démontré que les ARNm liés au PB étaient aussi associés à la régulation génique laissant penser que les ARNm pourraient être dirigés vers les PB afin d'en réguler l'expression génique [75].

Ces nouvelles évidences élargissent la compréhension de l'aspect fonctionnel des PB, cependant, elles soulèvent aussi beaucoup de questions en ce qui concerne la dégradation des ARNm. La régulation génique est un sujet très actuel en recherche fondamentale et de nouvelles données ne devraient pas tarder à être présentées afin d'éclaircir le sujet.

1.3.3 Interaction entre les PB et les GS

De nombreuses observations ont été rapportées dans la littérature sur les interactions entre les GS et les PB. Laissant penser que ces deux types de granules à ARN pourraient s'échanger des ARNm de façon réciproque.

Par immunofluorescence, il est possible d'observer la colocalisation partielle entre les GS et les PB, suite à l'exposition au stress de différentes natures [84]. Ainsi, la juxtaposition de ces deux granules à ARN, en condition de stress, se nomme « amarrage » (*docking*) et permettrait les échanges [77] (Fig. 1).

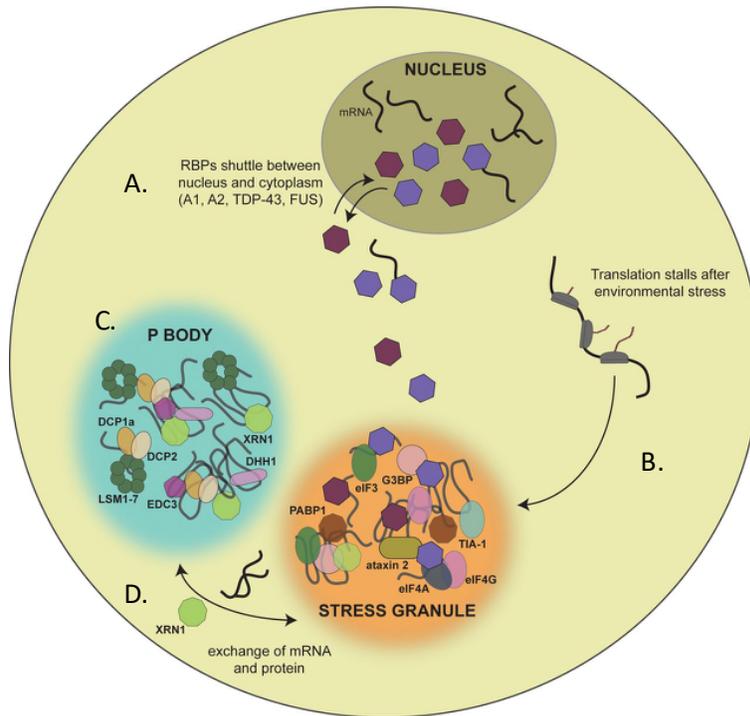


Figure 1. Les GS et le PB sont des granules à ARN impliqués dans la réponse au stress. Inspirée et adaptée de Harisson et Shorter, 2017 [1]. A) Plusieurs protéines de liaison qui font la navette entre le noyau et le cytoplasme sont recrutées aux granules de stress. B) L'arrêt momentané de la traduction inféré par un stress induit la formation de GS qui séquestre les ARNm non traduits. C) Les processing bodies (BP), quoiqu'induits en nombre supérieur suivant un stress, sont présents de façon constitutive dans la cellule. Leur cœur est composé de différentes protéines nécessaires à la dégradation de l'ARNm, dont les enzymes de décapage. D) L'amarrage entre les GS et les PB est pensé servir à l'échange de protéines et d'ARNm.

1.4 La réponse au stress dans un contexte pathologique

La formation de GS fait partie d'une réponse intégrée pour permettre à la cellule de survivre, en présence de stimuli stressants transitoires, afin de rétablir l'homéostasie cellulaire rapidement et récupérer. Quatre kinases répondent promptement quand la dérégulation homéostatique survient afin de phosphoryler eIF2 α et d'enclencher la réponse au stress intégrée; PKR, PERK, GCN2 et HRI [16] (Fig. 2). Ainsi il faut une variété de kinases pour répondre à une variété de stimuli stressants, où la phosphorylation d'eIF2 α permet à la cellule de conserver ses ressources et gérer efficacement les conditions stressantes.

La privation nutritionnelle, comme une carence en acides aminés, l'exposition aux UV et le stress oxydant vont induire la phosphorylation de eIF2 α par la kinase GCN2 [85-87]. Les protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique créent un stress qui active la kinase PERK [88]. La réponse antivirale, médiée par les interférons, est quant à elle assurée par l'activation de la PKR [89]. Finalement, HRI est la kinase qui participe à la régulation de la synthèse de l'hémoglobine en fonction de la disponibilité du cofacteur hème [90].

La phosphorylation de eIF2 α induit la formation de GS et comme mentionné, des protéines (TDP-43, FUS/TLS et TIA-1) y sont recrutées. Le stigmate le plus saillant de la SLA est la présence d'inclusions immunoréactives surtout pour TDP-43, mais aussi pour FUS/TLS [91]. Il fut démontré que leur DRG a la capacité d'induire l'autoagrégation de la protéine, un peu à la manière de prions [92].

La présence d'inclusions, potentiellement pathologiques, de protéines étroitement associées avec la SLA, supporte l'idée qu'une réponse au stress déficiente pourrait contribuer à la pathogénie de la SLA et la démence fronto-temporale.

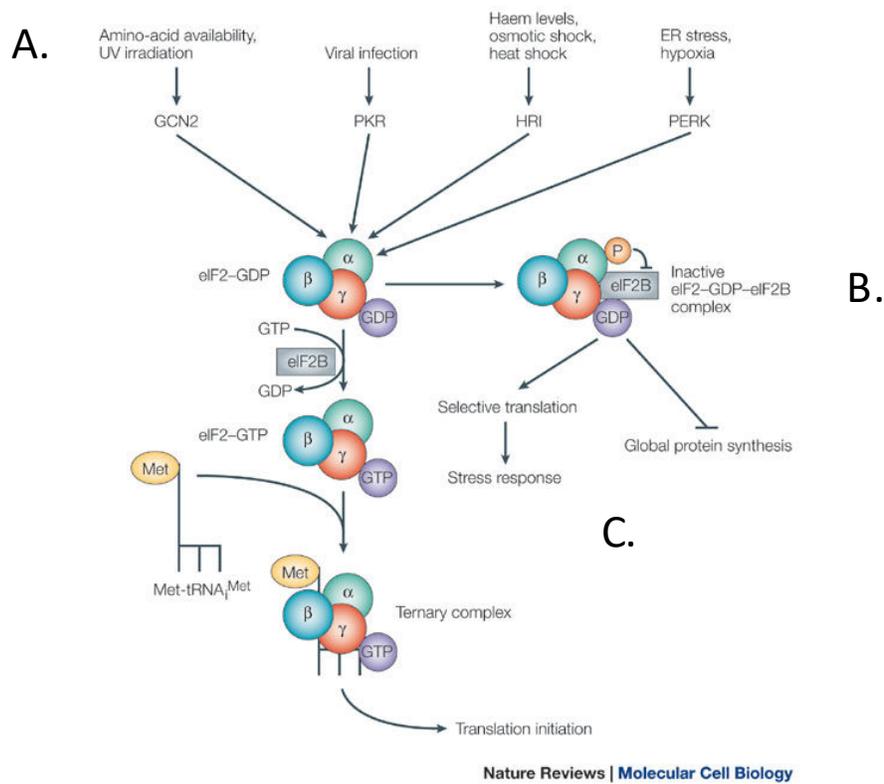


Figure 2. La phosphorylation de eIF2 α est assurée par quatre kinases. Inspirée et adaptée Holcik & Sonenberg, 2005[93]. La cascade de signalisation cellulaire induite en réponse à une panoplie de stimuli menaçants résulte par la phosphorylation de la sous-unité α du facteur d'initiation eucaryote 2 (eIF2). A) Quatre kinases assurent la phosphorylation, et ce en fonction de la nature du stress. B) L'ajout d'un phosphore sur la sous-unité α empêche la formation du complexe ternaire d'initiation de la traduction eIF2 α -GTP-tRNAⁱ Met. C) La phosphorylation de eIF2 α interrompt momentanément la synthèse globale de protéine. Cela permet la traduction sélective de protéines de réponse au stress comme les HSP.

2. Sclérose latérale amyotrophique

2.1 Historique

Jean-Martin Charcot (1825 - 1893), en 1874, fut le premier à faire la description claire des phénotypes de la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Ce neurobiologiste français, fondateur de l'hôpital Salpêtrière à Paris, fut le premier à observer et décrypter des cas de paralysie progressive et d'atrophie musculaire. Elle fut appelée longtemps « maladie de Charcot » pour cette raison [94]. En Amérique, on l'appelle plutôt maladie de Lou Gehrig (1903-1941). Ce célèbre athlète, joueur de baseball américain, intronisé au temple de la renommée, reçut le diagnostic en 1939, pour en décéder en 1941. La personnalité la plus connue ayant souffert de la SLA fut, sans aucun doute, Stephen Hawking (1942-2018), l'astrophysicien, mathématicien et cosmologiste anglais. Il reçut son diagnostic à l'âge de 21 ans et vécut pendant près de 55 ans avec la maladie.

Cependant, il est possible d'affirmer qu'avant le défi du « Ice Bucket Challenge », lancé sur les réseaux sociaux en 2014, très peu de gens connaissaient ce qu'était la SLA. Ce défi consistait à se verser un seau d'eau avec de la glace sur la tête, afin d'illustrer à quoi peut ressembler la douche froide que reçoivent le patient et sa famille, à l'annonce du terrible diagnostic. Cette vague de compassion a réussi à amasser des sommes historiques qui ont enfin pu constituer une réserve afin de supporter à la fois les gens atteints et la recherche fondamentale.

Même si la SLA est plus connue, il n'est pas rare de devoir faire référence au « Ice bucket challenge » pour permettre d'identifier la maladie mortelle qu'est la SLA.

2.2 Épidémiologie et considérations cliniques

La SLA est une maladie rare touchant environ 1,7 à 2,2 personnes par 100 000 [95, 96]. De cause encore inconnue, au-delà des mutations génétiques associées à la SLA, elle semble toucher plus les hommes que les femmes; des études, tant aux États-Unis qu'en Europe, montrent une prépondérance de la maladie chez l'homme, touchant 2,4 personnes par 100 000.

Alors que chez la femme l'incidence est de 1,5 cas par 100 000 personnes [97, 98]. Il s'agit d'une maladie neurodégénérative grave avec une évolution progressive létale affectant la voie motrice volontaire, d'abord dans la voie pyramidale, pour ensuite atteindre les neurones moteurs périphériques [99, 100]. Même si une faible proportion des gens atteints de la SLA survivent pendant plus de 10 ans, pour la majorité des patients, la durée moyenne de la maladie se situe entre 2 et 5 ans. La mort survient quand la paralysie atteint les muscles responsables de la ventilation [101]. Distinguée par l'apparition des premiers symptômes, la SLA est divisée en deux formes; bulbaire (FB) et spinale (FS).

La FB semble plus commune chez les femmes et l'incidence de la maladie augmenterait chez les patients ayant développé la maladie après 70 ans [102, 103]. Cette forme est caractérisée par les premières manifestations de la maladie, soient la dysarthrie et la dysphagie, qui sont respectivement des troubles d'articulation lors du parler et troubles de déglutition. Certains patients ont un changement au niveau de la tonalité de la voix [104, 105]. La FS, quant à elle, est caractérisée par des raideurs et des faiblesses musculaires. Les patients trébuchent sans raison apparente et/ou ont de la difficulté à prendre des objets aussi légers qu'une bouteille d'eau, ou encore, tourner la clef dans une serrure. Ils ressentent aussi des crampes ou des fasciculations musculaires « twitching » qui précèdent la perte musculaire [104, 105].

2.3 Étiologie de la neuropathologie

Le terme maladie est utilisé pour qualifier la SLA, cependant, l'appellation syndrome est de plus en plus utilisée. En effet, le spectre des symptômes neurodégénératifs de la maladie est varié et hétérogène. La perte progressive des motoneurones et la neuropathologie au niveau cellulaire et moléculaire sont tout ce que le syndrome a en commun [106, 107]. L'étiologie de cette dégénérescence motoneuronale dans la SLA est encore à découvrir.

Cependant, les données recueillies dans la recherche fondamentale basée sur des modèles d'animaux transgéniques, des modèles *in vivo* et sur des tissus de patients atteints de SLA, semblent indiquer que la SLA serait une maladie multifactorielle et multisystémique.

2.3.1 Pathogenèse motoneuronale

Toujours inconnue, la voie moléculaire exacte qui entraîne la perte progressive des motoneurones semble complexe et à contribution multiple. À laquelle s'ajoute, fort probablement, une influence par des facteurs environnementaux et/ou épigénétiques [108]. Il est admissible que plusieurs mécanismes cellulaires réciproques soient impliqués ayant comme résultante la perte sélective des motoneurones [109], en voici quelques-uns;

2.3.1.1 Génétique

Bien que la forme sporadique (sSLA) compte pour près de 90% des cas, c'est la forme familiale (fSLA), 10% des cas totaux, qui a permis l'étude de mutations génétiques reconnues pour plusieurs gènes intimement associés à la SLA [104, 110]. La plupart des cas présente une hérédité mendélienne, à pénétrance élevée, par transmission autosomique dominante [111]. À ce jour, plus d'une vingtaine de gènes ont été identifiés dans la fSLA et ces différentes mutations affectent différents mécanismes contributifs à la pathogénie motoneuronale [112-117] (Fig. 3).

Plus précisément, des mutations dans les gènes suivants sont plus intimement liées à la SLA; open reading frame 72 on chromosome 9 (*C9ORF72*), compte pour près de 40% des cas fSLA, Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*) compte pour 10 à 20% des fSLA, fused in sarcoma / translocated in sarcoma (*FUS*) compte pour 5% des fSLA et *TARDBP* pour environ 4% des fSLA. Ces mutations ayant la particularité de compter pour $\approx 1\%$ des sSLA et celles de *C9ORF72* pour $\approx 7\%$ de sSLA [118, 119].

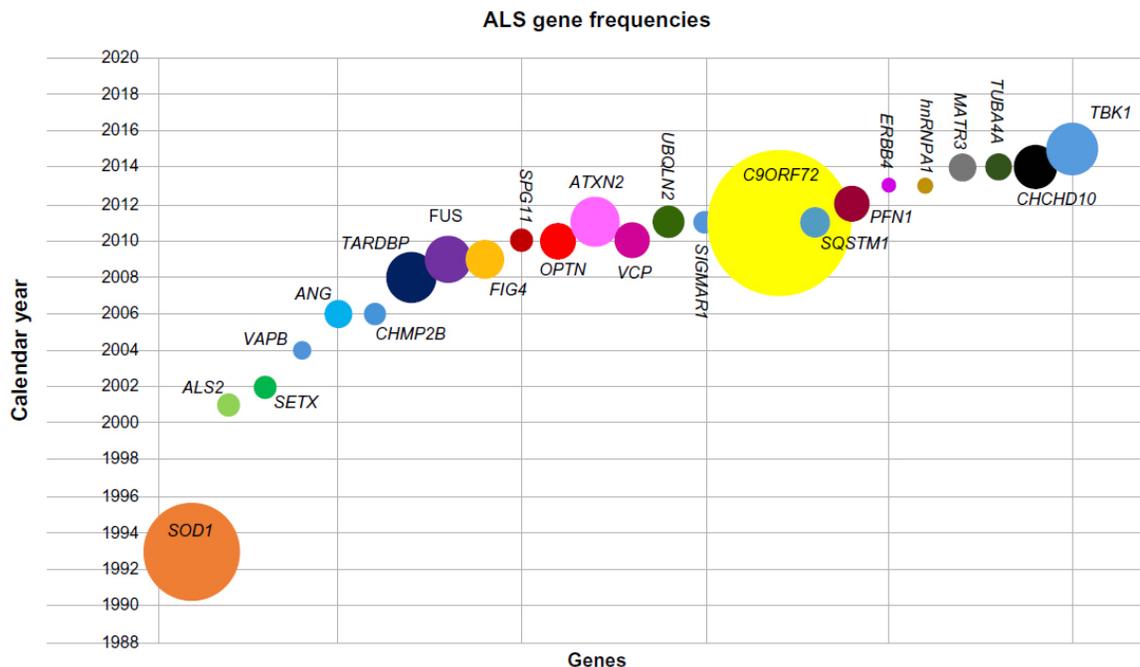


Figure 3. La découverte des gènes associés à la SLA. Inspirée de Sultan et coll. 2016 [3]. Chronologie de la découverte de gènes associés à la SLA. Cette représentation schématique indique l'année de découverte des gènes les plus importants impliqués et la taille des cercles représente la fréquence des mutations dans la fSLA et certains cas sSLA.

2.3.1.2 Stress oxydatif et dysfonctions mitochondriales

La balance entre les ROS et antioxydants doit être finement régulée et demeurer neutre. Les ROS, dans un contexte physiologique, servent de molécules impliquées dans des voies de signalisations cellulaires [120]. Un débalancement en faveur des ROS est toxique pour les cellules et par conséquent, entraîne la mort cellulaire. La viabilité cellulaire est mise en péril de différentes façons en présence de ROS, en voici deux; les membranes cellulaires étant majoritairement composées de phospholipides, la peroxydation lipidique par les ROS entraîne la mort cellulaire par la relâche de céramide qui active la voie apoptotique [121]; revue par [122].

Ou encore, l'oxydation des acides nucléiques entraînerait le vieillissement cellulaire prématuré et des bris oxydatifs de l'ADN, menant à la nécrose cellulaire ou à une apoptose déficiente [123]; revue par [124].

Le stress oxydatif et la neurodégénérescence ont longtemps été liés en raison des mutations dans le gène de *SOD1*. Cet enzyme antioxydant ubiquitaire est surtout présent dans le cytoplasme, mais aussi dans l'espace intermembranaire des mitochondries [125]. Les mutations dans le gène encodant SOD1, telles que précédemment mentionnées, sont connues pour être responsables de 20% des cas de fSLA [119]. Des fibroblastes en culture de patients atteints de SLA montrent une sensibilité accrue aux dommages oxydatifs [126]. Des formes mutées de SOD1 sont retrouvées dans la membrane externe de la mitochondrie [127]. De plus, les mutations entraînant des formes de SOD1 mal repliées perturberaient la régulation mitochondriale [128]. Il est à noter que les mutations de SOD1 n'affectent pas exclusivement les fonctions antioxydantes de l'enzyme. En effet, certaines formes mutantes de SOD1 ont des niveaux d'activités enzymatiques comparables à la forme sauvage alors que d'autres démontrent une activité grandement déficiente [129]. Des anomalies biochimiques et morphologiques ont été trouvées chez des patients SLA ainsi que dans des modèles d'études murins et cellulaires [130, 131]. Finalement, les mitochondries de patients montrent des taux élevés de calcium et une diminution de l'activité des complexes de chaînes respiratoires I et IV, indiquant des défauts dans le métabolisme énergétique et provoquant une augmentation des ROS [132]. L'ensemble de ces données suggère que le stress oxydatif et les dysfonctions mitochondriales sont des contributeurs importants à la pathologie amyotrophique (Fig. 4).

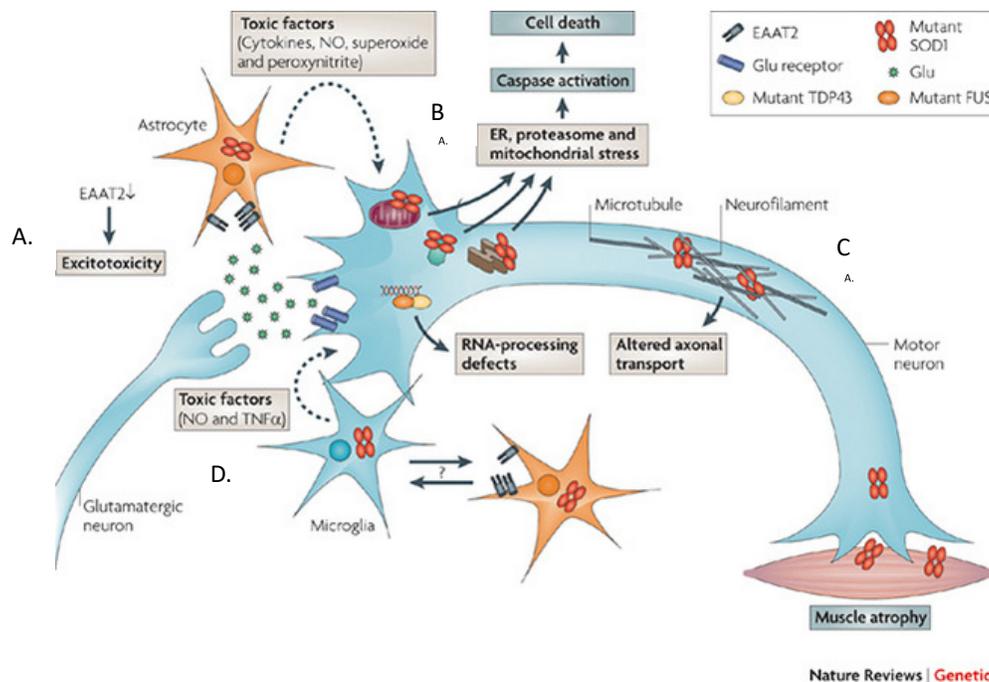


Figure 4. Les mutations de SOD1 affectent plusieurs voies de signalisation cellulaire, les rendant dysfonctionnelles. Inspirée et adaptée de Dion et coll., 2009 [4]. Ce schéma complexe fait la démonstration des différents mécanismes de la pathogénie qui sont touchés par les mutations de SOD1. A) Une réduction fonctionnelle des récepteurs de récupération du glutamate des astrocytes qui contribue à l'excitotoxicité. B) Les mutations de SOD1 causent du stress mitochondrial, au protéasome et au réticulum endoplasmique qui pourrait causer la mort motoneuronale. C) Le transport axonal est aussi perturbé par les mutations SOD1 et peut contribuer à l'atrophie musculaire. D) La surstimulation des récepteurs AMPA et NMDA cause l'entrée massive de calcium qui se traduit par une augmentation de la production d'oxyde nitrique qui pourrait avoir des effets délétères sur les neurones

2.3.1.3 Excitotoxicité

Ce phénomène se produit lorsqu'une stimulation excessive du glutamate sur les récepteurs post-synaptiques NMDA ou AMPA cause une lésion neuronale. Cette surstimulation provoque une entrée massive de calcium, causant une augmentation d'oxyde nitrique, avec des effets délétères pour les neurones [133, 134]. Les astrocytes participent à la récupération du glutamate pérисynaptique via leur récepteur EAAT2 [135]. Différentes équipes de recherche ont démontré que les fonctions du récepteur EAAT2 dans les tissus nerveux de patients fSLA et sSLA sont réduites [136]. Des niveaux augmentés de glutamate dans le liquide céphalo-rachidien ont été rapportés chez certains patients atteints de SLA [126]. Cependant cet aspect est encore très contesté car les résultats sont divergents [137]. L'argument le plus utilisé par les défenseurs de la thèse de l'excitotoxicité est que le premier médicament pour aider les patients atteints de SLA et le seul durant longtemps fut le Riluzole, un inhibiteur de la relâche de glutamate. Son action pharmaceutique est d'inhiber les canaux voltage-dépendant des terminaisons glutamatergiques [138]. Ces évidences considérées dans un ensemble soutiennent l'hypothèse que l'excitotoxicité puisse contribuer à la pathogenèse ou au développement dégénératif de la SLA.

2.3.1.4 Métabolisme des ARN

Les RBP, protéines de liaison aux ARNm, sont pour plusieurs multifonctionnelles. Elles jouent plusieurs rôles liés au métabolisme de l'ARN, incluant, mais de façon non exhaustive, le transport nucléo-cytoplasmique, la stabilité des ARNm, la régulation de l'épissage et la réponse au stress [139]. Des mutations dans les RBP ont des conséquences à plusieurs niveaux. Elles résultent en perte ou gain de fonction, et perturbent différents aspects du métabolisme de l'ARN. Bien souvent, pour une RBP en particulier, ce n'est pas uniquement la perte de fonctions ou uniquement le gain de fonctions qui contribue à la pathogenèse, mais plutôt une co-contribution de gain et de perte de fonction. TDP-43 en est un exemple et sera élaboré ultérieurement. Un autre exemple de la co-contribution de perte et de gain de fonctions peut être appréciée en étudiant FUS.

En effet, différentes équipes de chercheurs ont réussi à démontrer que les mutations de FUS, associées à la SLA, causaient, dans certains cas, des pertes et dans d'autres cas, des gains de fonctions. Ainsi, la mutation R521G de FUS résulte en gain de fonctions toxiques en perturbant l'homéostasie synaptique, au niveau des dendrites [140]. Ou encore, les mutations R495X, P525L qui causent la délocalisation de FUS au cytoplasme et R514G, R521G qui ne causent pas de délocalisation ont différents effets négatifs sur l'épissage, résultant en perte de fonctions partielles à totales [141]. Des altérations dans la transcription à la hausse comme à la baisse et des épissages aberrants sont observés en conditions pathologiques [142]. Il ne faut cependant pas oublier que, dans un cadre de recherche, ces RBP sont étudiées individuellement et que leurs multiples fonctions et leurs interactions sont difficilement dissociables. Par conséquent, il existe un chevauchement évident entre leurs fonctions physiologiques et leurs fonctions pathologiques, ce qui complique l'étude des RBP.

2.3.1.5 Agrégation protéique

L'étude histopathologique des tissus *post-mortem* des patients SLA révèle que plus de 97% des tissus montrent la présence d'inclusions cytoplasmiques ubiquitinées, immunoréactives pour TDP-43 [143, 144]. L'accumulation de protéines est une caractéristique importante de la SLA. Ce dysfonctionnement de l'homéostasie protéique peut être expliqué par les mutations, la délocalisation et la difficulté des protéines à être adéquatement repliées [145]. Ces perturbations de la protéostasie ajoutent un stress à la cellule qui peut se refléter à différents niveaux, mais particulièrement en perturbant la dynamique des granules de stress [53, 146].

Cela étant dit, il reste toujours à déterminer si l'agrégation protéique est une cause ou une conséquence et si cela joue un rôle dans la pathogenèse. Si cela entraîne un gain de fonction toxique cellulaire ou si la délocalisation des protéines aux agrégats génère une perte de fonction. Qui plus est, est-ce que les agrégats sont les résultats issus de la neurodégénérescence ou encore, un mécanisme de défense cellulaire destiné à réduire l'encombrement protéique cytoplasmique? Il s'agit là de questions encore sans réponse [147].

2.4 Démence fronto-temporale

Jusqu'à présent peu discutées, ce même s'il s'agit de la plus importante cause des fSLA, les mutations de C9ORF72 illustrent bien la convergence entre la SLA et la démence fronto-temporale de type non-Alzheimer (DFT). La SLA n'est pas seulement une maladie neurodégénérative du système moteur, mais doit être considérée comme une affection de dégénération multisystème. La DFT est une maladie, tout comme la SLA, affectant les gens tardivement. À la différence qu'elle est caractérisée par des phénotypes cognitifs affectifs comme des changements de personnalité, de l'apathie et de l'anxiété [148]. Les gens peuvent développer indépendamment, ou en association, les deux maladies dans un ordre aléatoire. Outre des mutations communes, la DFT et la SLA partagent des stigmates histopathologiques. Le schéma comparatif des deux syndromes peut être apprécié à la figure 5.

Bien que le dessein de ces inclusions soit toujours sous la loupe des scientifiques, il s'agit néanmoins d'une manifestation histologique remarquable. Ainsi, si une majorité des patients SLA (>95%) présente des inclusions cytoplasmiques immunoréactives pour TDP-43 ubiquitiné, ce sont près de la moitié des cas de DFT (\approx 45%) qui arborent ces mêmes inclusions [144, 149] (Fig. 5).

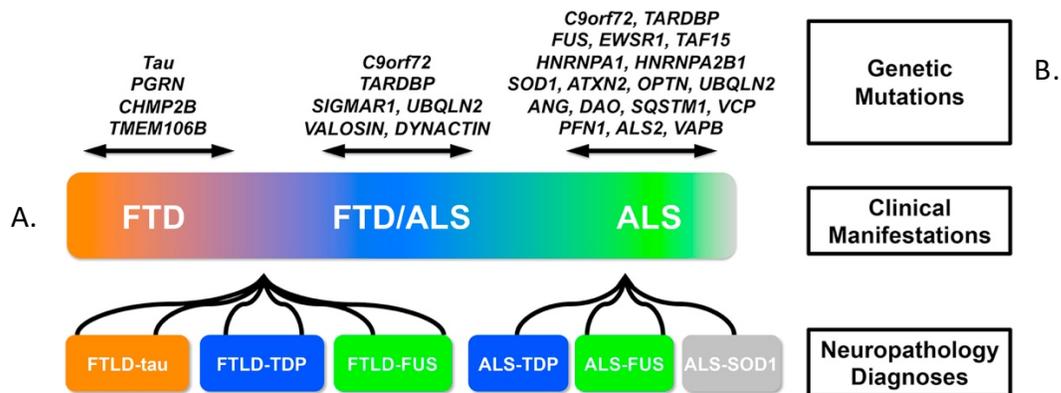


Figure 5. La SLA et la DFT peuvent être considérées dans un *continuum*. Inspirée et modifiée de Lee & Huang, 2015 [150]. A) La SLA et la DFT sont deux maladies neurodégénératives polarisées aux antipodes du spectre d’atteintes, mais qui peuvent doublement affecter les mêmes patients. En orange, les atteintes cognitives, en vert les atteintes motoneuronales, au centre la convergence des 2 neuropathologies. B) Les gènes responsables de chacune des maladies et au centre, les gènes qui peuvent causer les deux maladies. À noter que le génotype C9ORF72 peut représenter 10 à 50% des cas familiaux de la DFT alors qu’il représente près de 40 % de la fSLA et 5% des cas de sSLA.

3. Protéines de liaison à l'ARN

Cette grande famille de protéines de liaison à l'ARN s'associe avec les pré-ARNm néo-transcrits dans le noyau et le cytoplasme pour en médier le métabolisme de différentes manières et ces mécanismes sont très conservés au cours de l'évolution [151]. Que ce soit pour stabiliser l'ARNm, réguler la transcription et la traduction ou même induire un épissage alternatif, les protéines de liaison à l'ARN (RBP), incluant la famille des Ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires (hnRNP), sont des acteurs de premier ordre dans l'homéostasie cellulaire. Par leurs actions sur la régulation de l'expression génique, les RBP ont gagné l'intérêt dans la recherche sur les maladies et particulièrement dans la neurodégénérescence. La littérature abonde de mutations dans les RBP jouant divers rôles pathologiques, mais beaucoup reste encore à découvrir.

Est-ce que les RBP contribuent au déclenchement de la maladie, à l'évolution de la maladie ou même les deux à la fois? Un vaste champ de recherche encore à découvrir. Les RBP sont habituellement localisées dans le noyau et partagent un certain nombre de domaines uniques de liaison à l'ARN. Un ou des RRM « *RNA recognition motif* », une séquence qui permet la localisation nucléaire, NLS « *nuclear localisation sequence* », une séquence qui permet l'export nucléaire, NES « *nuclear export sequence* » et une région riche en glycine [152]; revue par [153]. Ici, l'attention sera portée plus particulièrement sur deux RBP qui sont d'actualité dans la recherche sur la SLA; TDP-43 et hnRNP A1.

3.1 TDP-43

3.1.1 Généralités

TDP-43 est une protéine multifonctionnelle ayant la capacité de lier autant l'ARN que l'ADN ainsi qu'à elle-même pour s'autoréguler. Impliquée dans le métabolisme de l'ARNm, TDP-43 joue un rôle dans l'épissage alternatif, le transport et la stabilité [154-157].

C'est en 2006 qu'un groupe de recherche du Japon et un autre des États-Unis découvrent, à l'aide de spectrométrie de masse, que TDP-43 est la composante principale de 45 % des inclusions prélevées chez les patients atteints de DFT et de 97 % des inclusions retrouvées dans les cas atteints de SLA [144, 158].

3.1.2 Implication dans la SLA

Il faudra attendre 2008 pour que les premières mutations de TDP-43, impliquées dans la SLA, soient identifiées [159, 160]. En 2010, une trentaine de mutations avaient été répertoriées pour TDP-43. Pour la plupart, il s'agit de mutations faux sens et sont surtout concentrées dans la région du C-terminale, dans le DRG [142, 161]. En 2012, un total de 44 mutations de TDP-43 avaient été répertoriées dont seulement 10% situées à l'extérieur du DRG [162]. Cela étant, la contribution fonctionnelle pathologique de ces mutations reste encore à élucider. Les mutations de TDP-43 ne sont certes pas celles qui affectent le plus de cas de fSLA, cependant, comme TDP-43 est majoritairement délocalisé dans le cytoplasme et que la présence d'agrégats cytoplasmiques immunoréactifs pour TDP-43 est observée chez la quasi-totalité des patients, cela maintient l'intérêt pour élucider les mystères entourant la toxicité de TDP-43. De plus, de nombreuses études cliniques ont montré des niveaux plus élevés de TDP-43 dans le plasma, le liquide céphalo-rachidien et la peau des patients atteints de SLA [163-165]. De plus, TDP-43 possède la capacité de s'autoréguler pour diminuer sa transcription [154].

Une équipe a démontré, en étudiant des tissus *post-mortem* de patients, que lorsque déplété du noyau, TDP-43 perdait sa fonction d'autorégulation, ceci appuyant la théorie de la perte de fonction nucléaire [166]. Quoi qu'il en soit, sommes-nous en présence d'un gain de fonction cytoplasmique, une perte de fonction nucléaire ou une co-contribution [167] revue par [142]? La question est encore débattue.

3.2 hnRNP A1

3.2.1 Généralités

L'heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) est une protéine tout aussi multifonctionnelle que TDP-43. Jouant plusieurs rôles dans l'expression génique, allant de l'exportation de l'ARNm, l'épissage et la stabilité de l'ARN en favorisant le maintien des télomères, hnRNP A1 est une protéine dont la fine régulation est nécessaire [139].

Cette protéine de 34 kDa est ubiquitaire et compte parmi les plus abondantes dans le noyau, en nombre quasi égal avec les histones [168]. Il n'est pas étonnant que hnRNP A1 devienne, elle aussi, un centre d'intérêt dans la recherche sur la SLA.

3.2.2 Épissage alternatif

Dans sa forme la plus longue, l'ARNm de *hnRNPA1* compte 52 acides aminés de plus, incorporés entre les positions 250 et 302, ayant pour conséquence d'allonger le DRG. L'inclusion de l'exon cassette 7B, lors de l'épissage du transcrit de *hnRNPA1*, mène à l'expression de l'isoforme protéique de 38 kDa, nommée *hnRNPA1^B*, dont l'abondance oscille autour de 5% [169] (Fig. 6). L'étude des séquences introniques, de part et d'autre de l'exon 7B, a permis d'expliquer comment cet épissage alternatif était si peu exprimé. Ainsi, il a été démontré, d'une part, que l'élément conservé 9 (EC9) agissait comme répresseur de la traduction en empêchant de se servir, en aval, du site d'épissage en 3' [170].

D'autres parts, expliqué par sa grande affinité avec ces EC, hnRNP A1 peut se lier à ses propres ARNm néo-transcrits. Ainsi, l'EC1a, situé entre les exons 7 et 7B et l'EC4, situé entre les exons 7B et 8, tous deux liés à hnRNP A1, se voient rapprocher de façon à favoriser l'excision de l'exon 7B [171].

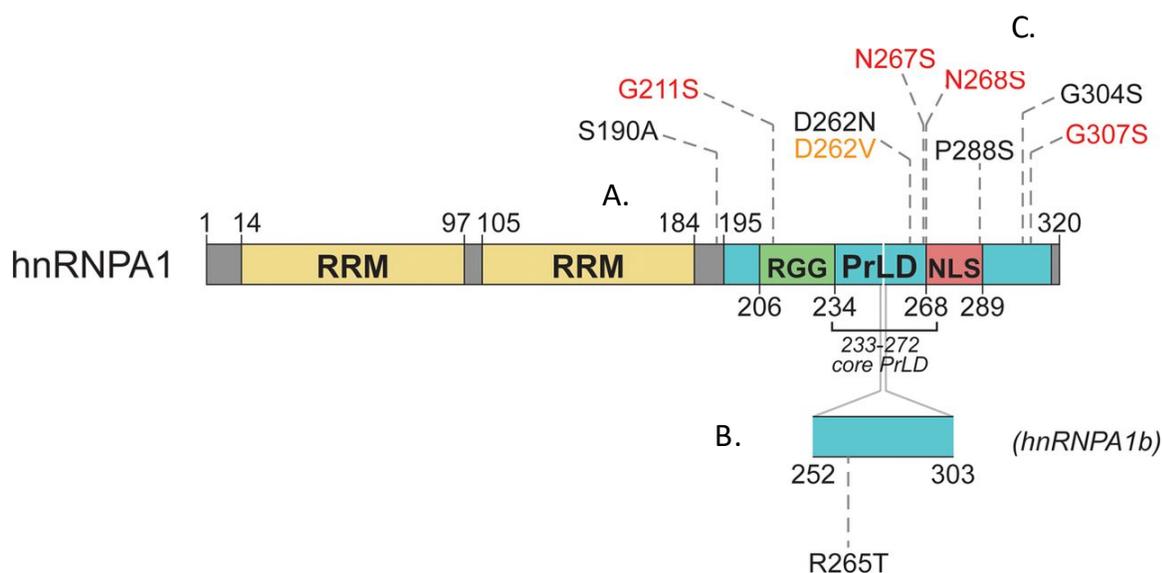


Figure 6. Schématisation des domaines fonctionnels de *hnRNPA1*. Inspirée et modifiée de Harrison et Shorter, 2017[1]. Le domaine RRM est le domaine, liant l'ARN, le plus commun chez les grands vertébrés. Il a aussi la capacité de lier l'ADN et d'autres protéines [2]. A) Outre ses deux RRM, *hnRNPA1* possède, sur son carboxy-terminale, une région riche en glycine, un domaine apparenté aux prions (PrLD) qui inclut une séquence d'importation nucléaire (NLS). B) Bien inséré au milieu du PrLD, les 52 acides aminés de l'exon cassette 7B qui donne naissance à l'épissage alternatif hnRNP A1^B. C) La très grande majorité des mutations identifiées dans les maladies neurodégénératives se retrouvent dans le PrLD.

3.2.3 Fonctions

Étant donné la grande polyvalence de cette protéine, ses fonctions sont multiples, en voici quelques-unes;

3.2.3.1 Transcription

L'ARN polymérase II (POL II) est un complexe enzymatique qui est responsable de faire la transcription en ARN messager à partir de la matrice ADN et ce processus peut être couplé avec l'épissage et certaines étapes dans la maturation de l'ARN [172, 173]. La POL II est composée de 11 sous-unités et le domaine CTD est essentiel à ses différentes activités [172, 174, 175]. P-TEFb est un facteur d'élongation de la transcription qui favorise une élongation efficace par la POL II de nombreux gènes dépendants de P-TEFb [176, 177]. Lorsque P-TEFb est lié à HEXIM1 et à la ribonucléoprotéine 7SK, cela forme un complexe répresseur de la transcription efficace (P-TEFb-HEXIM1-7SK) où P-TEFb est inactif et c'est la dissociation du complexe P-TEFb-HEXIM1-7SK qui permet l'activation de P-TEFb [178-180]. Il fut trouvé que hnRNP A1 est un partenaire de liaison de 7SK [181-183] et que l'expression de hnRNP A1 joue un rôle dans la régulation de la transcription des gènes dépendant de P-TEFb [181, 182]. Il fut démontré qu'en réduisant l'expression de hnRNP A1, des défauts dans l'élongation de la transcription des gènes dépendants de P-TEFb étaient observés et que cela favorisait, par conséquent, l'expression des gènes indépendants de P-TEFb [184].

La transcription peut être modulée à la hausse, voire être activée ou, modulée à la baisse, voire la réprimer et hnRNP A1 peut influencer la transcription de différentes façons, en voici deux; des données présentées démontrent que lorsque hnRNP A1 se lie au promoteur codant pour le gène de l'apolipoprotéine E, dans ce cas, cela active la transcription [185]. Alors que la liaison de hnRNP A1 au promoteur codant pour le gène des récepteurs de la vitamine D, cela module la transcription à la baisse [186].

En interagissant avec la région du C-terminale de I κ B α , la sous-unité inhibitrice de hnRNP A1 participe à l'activation de la transcription du facteur nucléaire NF- κ B, via des interactions protéine-protéine avec son inhibiteur I κ B α [187]. C'est la région N-terminale de hnRNP A1 qui se lie au C-terminale de I κ B α .

Plus précisément, c'est la région située entre le résidu 95 et le résidu 207 de I κ B α qui est nécessaire pour la liaison à hnRNP A1 et qui permet d'activer la transcription de NF- κ B [187]. Le motif ATTT semble être la séquence de haute affinité afin que hnRNP A1 ou la protéine paralogue, hnRNP A/B, puissent réprimer de la transcription de certains gènes [188-191]. La pleine compréhension de la mécanistique derrière la régulation de la transcription reste encore à découvrir. Toutefois, ces preuves démontrent bien la grande polyvalence de la protéine à moduler la transcription.

3.2.3.2 Épissage

Plusieurs protéines peuvent émerger d'un même transcrit en fonction de l'épissage du de celui-ci, et cela se fait au niveau du noyau. Le retrait des introns des néo-transcrits est assuré par un complexe multiprotéique nommé spliceosome [192]. Des analyses protéomiques du complexe d'épissage ont permis de révéler que hnRNP A1 aurait un rôle à jouer tout au long de l'épissage, que ce soit pour l'excision des introns ou de l'adhésion des exons, hnRNP A1 participe à toutes les étapes de l'assemblage du spliceosome [193, 194].

3.2.3.3 Maintenance des télomères

Afin de prévenir la sénescence ou l'apoptose, les télomères doivent être préservés. Situés à l'extrémité des chromosomes, les télomères sont des régions hautement répétitives (TTAGGG) et vraisemblablement non codantes [195]. Ce rôle que hnRNP A1 joue dans le métabolisme de l'ADN n'est pas encore complètement élucidé. Cependant plusieurs études ont confirmé que hnRNP A1 contribuerait à la maintenance de l'élongation des télomères de deux façons; en supportant la télomérase et prévenant la dégradation par les exo et endonucléases [196-198].

3.2.4 Implication dans la SLA

Peu de mutations de hnRNP A1 sont, jusqu'à présent, répertoriées et associées avec la SLA. Ces mutations sont, tout comme TDP-43, concentrées dans la DRG. L'exon 7B, à lui seul, contient deux mutations : Q277K, identifiée chez un patient ayant reçu le diagnostic à l'âge de 20 ans et la mutation G283R, identifiée chez un patient âgé (>60 ans) [199].

La mutation P288/340S, à la position 288 dans hnRNP A1 et à la position 340 dans l'isoforme hnRNP A1^B, est quant à elle, située dans le domaine de localisation nucléaire nommé M9 qui, selon les auteurs, serait à potentiel hautement contributif au déclenchement de la pathologie. Toutefois, cette mutation est aussi très rare [199]. La mutation la plus connue D262/314V est incluse dans le DRG et il a été démontré que, non seulement elle faisait en sorte de s'autoagréger, mais avait aussi la capacité de favoriser la fibrillation, de concert avec la forme sauvage de hnRNP A1. Finalement, sur le même résidu aspartate hautement conservé, une mutation a été identifiée chez un patient où toutes les autres mutations de protéines associées à la SLA ont été exclues, D262/314N [200].

De façon similaire avec TDP-43, l'analyse de neurones provenant de tissus prélevés chez des patients SLA, comparée à un groupe témoin sain a démontré que les neurones des patients présentaient une déplétion nucléaire de hnRNP A1. Cette déplétion est corrélée avec la présence d'inclusions immunoréactives pour TDP-43. Cependant la perte de hnRNP A1 nucléaire ne présente pas une délocalisation au cytoplasme, comme c'est le cas pour TDP-43 [201]. Par sa nature multifonctionnelle, il n'est pas surprenant que les évidences de défauts d'interactions, de recrutements et de colocalisations entre hnRNP A1 et différentes protéines associées à la SLA, commencent à abonder [202-204]. Ceci, considéré dans un ensemble, positionne hnRNP A1 comme une protéine d'intérêt dans l'étude des mécanismes pathogéniques de la SLA.

3.3 TDP-43 et hnRNP A1 dans le contexte de la SLA

Le dogme central de la biologie se lit comme suit : toutes les cellules ont, en leur noyau, l'ADN qui constitue la matrice à transcrire en ARNm qui sera exporté du noyau vers le cytoplasme afin d'y être traduit en protéines. Les différentes étapes permettant le passage de l'ADN à une protéine font partie du métabolisme de l'ARN et les RBP y sont des acteurs principaux. Il fut précédemment exposé de quelles façons les mutations, les interactions, les délocalisations peuvent résulter en conséquence pathogéniques pour la cellule.

Ces deux RBP sont intensément impliquées dans tous les aspects du métabolisme de l'ARN et tout récemment, à l'aide d'approches combinées *in vivo* et *in vitro*, il fut démontré que la délocalisation de TDP-43 au cytoplasme, ce qui est représentatif de la condition cellulaire des patients SLA, induit l'accumulation significative de hnRNP A1^B. De plus, des évidences à l'effet que l'augmentation hnRNP A1^B induit un effet délétère sur la survie cellulaire en raison de sa propension s'agrèger a été aussi établi [205]. Ces résultats sont appuyés par l'analyse de tissu nerveux *post-mortem* de patients SLA qui démontrait un enrichissement de hnRNP A1^B et arboraient des inclusions cytoplasmiques immunoréactives pour cet épissage alternatif de hnRNP A1. L'ensemble de ces données supporte l'idée que la délocalisation de TDP-43 aurait la capacité de contribuer à la vulnérabilité neuronale en se liant au pré-ARNm de hnRNPA1 et d'influencer l'expression et l'accumulation de l'isoforme toxique [205].

Hypothèses et objectifs

Dans cette étude, nous avons exploré l'effet que l'expression augmentée de hnRNP A1^B peut avoir sur la dynamique des granules de stress. Nous avons émis l'hypothèse que l'épissage alternatif augmenté de hnRNP A1^B contribue à accroître la toxicité cellulaire de deux façons. D'abord en perturbant la dynamique des granules de stress, et ensuite, en favorisant la formation d'inclusions cytoplasmiques. Afin de valider les hypothèses, nous avons déterminé trois objectifs. D'abord de vérifier l'effet de l'expression accrue de hnRNP A1^B sur la taille et le nombre de granules de ribonucléoprotéines (les granules de stress et les *processing bodies*) par cellule suite à un stress oxydatif à l'arsénite de sodium. Ensuite, le deuxième objectif est de déterminer si l'amarrage entre les granules de stress et les *processing bodies* est perturbé par l'expression augmentée de hnRNP A1^B. Finalement, en raison de l'aptitude intrinsèque de la protéine à faire des fibrilles, vérifier si l'isoforme longue a une propension augmentée à former des agrégats protéiques.

Matériel et méthodes

1. Constructions

pCMV-Myc-A1 et pCMV-Myc-A1B ont été clonés subséquentement à partir de pIND-A1-Myc et pIND-A1B-Myc, respectivement (Yang et al 1994) et insérés entre les sites EcoRI et HindIII dans pCMV (SV40) préalablement modifié afin d'inclure Myc. La mutation D262V a été introduite via le kit de mutagenèse QuickChange II Site-Directed (Agilent Technologies) avec les amorces suivantes : sens, 5'-GGTGGTGGGAAGCTACAATGTTTTGGGAATTACAACAATC-3' et antisens, 5'-GATTGTTGTAATTCCCAAAAACATTGTAGCTTCCACCACC-3'. Le plasmide pCMV (SV40) sert de contrôle Mock.

2. Culture cellulaire et transfection

Les cellules HeLa ont été cultivées dans du milieu modifié à haute teneur en glycémie de Dulbecco (Dulbecco's High Glucose Modified Eagles Medium, DMEM, GE Healthcare) supplémenté avec du sérum de bovin foetal 10% (SBF, Wisent) et de la 2mM L-glutamine (Sigma). 24 heures avant la transfection, 3×10^5 cellules HeLa avec un nombre de passages inférieur à huit ont été déposés dans des pétri de six centimètres afin d'avoir une confluence entre 30-50% au moment de la transfection. Les cellules ont été collectées 24 heures après la transfection de 0,4 µg d'ADNc ainsi qu'un contrôle d'ADNc Myc à l'aide de la lipofectamine LTX (Invitrogen) et le plus reagent (Invitrogen), selon les instructions du fabricant. Afin de maximiser la transfection, dans l'éppendorf A, 187,5 µl d'Optimem chauffé ont été mélangé avec 3,75 µl de lipofectamine LTX puis incubé 5 minutes à température ambiante. Durant ce temps, dans l'éppendorf B, 187,5 µl d'Optimem chauffé ont été mélangé avec 1,6 µl de plus reagent et 0,4 µg d'ADNc. L'éppendorf A a été ajouté à l'éppendorf B et mélangé par inversion. Suite à une incubation à température ambiante de 20 minutes, la solution a été ajoutée aux pétris par fines gouttelettes dispersées.

3. Stress oxydatif à l'arsénite de sodium

Les lamelles (coverslips) avec cellules ont été transférées dans une plaque à 24 puits, dans du DMEM préalablement chauffé à 37 °C et remis dans l'incubateur pour une période de 30 minutes. La séquence suivante a été respectée afin de fixer toutes les lamelles au même moment. Toutes les lamelles ont été stressées pour une période de 30 minutes et le temps de récupération varie de 0 à 150 minutes.

4. Immuno- buvardage

Les lysats cellulaires ont été préparés avec du tampon de dosage de radio-immunoprécipitation (RIPA), soumis à une électrophorèse sur gel de 10 % polyacrylamide de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE), transférés sur une membrane de nitrocellulose et bloqués avec une solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate-buffered saline, PBS) Tween-20 (PBS-T) avec 5% de lait en poudre. Les membranes ont été incubées avec les anticorps suivants : souris anti-hnRNP A1 (9H10- Cat. # AB 5832, Abcam), souris anti-Actine (Cat. # 69100, MP Biomedicals), lapin anti-c-Myc (Cat. # C 3956-2MG, Sigma), souris anti-tubuline alpha (Cat. # 24610, Abcam), lapin anti-TDP-43 (Cat. # 10782-2-AP, Proteintech), lapin anti-GAPDH (Cat. # 5174, Cell Signaling) et lapin anti-HuR Cat. # 07-468, Millipore) dans le tampon de blocage. Les membranes ont ensuite été incubées avec des anticorps secondaires conjugués aux enzymes peroxydase de raifort (enzyme horseradish peroxidase, HRP); HRP AffiniPure âne Anti-souris IgG (H+L) (Cat. # 715-035-151, Cederlane), HRP AffiniPure âne Anti-lapin IgG (H+L) (Cat. # 711-035-152, Cederlane). Pour être ensuite révélées avec de l'ECL chimioluminescence (ThermoFisher Scientific). Les films ont été quantifiés par densitométrie avec Photoshop.

5. Immunofluorescence

Les lamelles (coverslips) ont été fixées dans une solution de 1% formaldéhyde/PBS, lavées au PBS, perméabilisées dans une solution de 0.1% triton X-100/PBS et bloquées dans une solution de 0.1% d'albumine de sérum de bovin(ASB)/PBS. Les lamelles ont été incubées avec les anticorps primaires : souris anti-c-Myc (Cat. # M4439, Sigma), chèvre anti-TIA-1 (Cat. # sc-1751, Santa Cruz), lapin anti-DDX6 (Cat. # A300-461A, Cedarlane) dilués dans le 0.1% ASB/PBS, lavées une fois avec le 0.1% triton X-100/PBS et 2 fois avec le 0.1% ASB/PBS.

Les lamelles ont ensuite été incubées avec les anticorps secondaires : âne anti-souris FITC (Cat. # 715-095-151, Cedarlane), âne anti-chèvre Alexa 633 (Cat. # A21082, Invitrogen) et âne anti-lapin Cy3 (Cat. # 711-165-152, Jackson immunology) dilués dans 0.1% ASB/PBS, puis rincées trois fois au PBS avant d'être montées sur les lames en utilisant le ProLong Antifade (ThermoFisher Scientific). Les Images ont été collectées sur le microscope confocal Leica TCS SP5 équipé avec un objectif 40X (1.25 N.A.) et 60X à l'huile et le logiciel d'imagerie Leica Application Suite.

6. Quantification de la taille et du nombre de GS et PB

Les paramètres GS et PB ont été quantifiés avec ImageJ. Les GS et PB ont été identifiés par coloration TIA-1 et DDX6, respectivement, et les cellules ont été notées comme positives quand elles avaient au moins deux foyers cytoplasmiques avec une taille minimale de 0,75 μm^2 pour les GS et de 0,15 μm^2 pour les PB. La reconnaissance semi-automatique par ImageJ utilisait les paramètres suivants : Les GS ayant des tailles comprises entre 0,75 à 5 μm^2 , et pour les PB des tailles comprises de 0,15 à 5 μm^2 , quantifiés pour un minimum de 10 cellules sélectionnées au hasard pour chaque condition.

7. Imagerie confocale

Les images ont été collectées à l'aide d'un microscope confocal inversé Leica TCS-SP5 avec un objectif HCX PL APO 63x/1.4 à huile. Pour l'excitation des différents fluorophores, ont été utilisés : la ligne 488nm d'un laser Argon pour FITC simultanément avec un laser HeNe 633 nm pour le A633; suivi, en mode séquentiel, d'une diode laser 561 nm pour le Cy3. Une vitesse d'acquisition finale de 400 Hz a été utilisée. Les bandes de détections ont été paramétrées selon les fluorophores : de 495 nm à 527 nm pour FITC, de 571 nm à 595 nm pour le Cy3 et de 647 nm à 697 nm pour A633. Les images finales sont au format 8bit en 1024x1024 ou 2048x2048 pixels. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH).

8. Analyse statistique

La significativité statistique des expériences a été déterminée à l'aide du test de Student (test t) à deux sens avec le logiciel GraphPad Prism. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme étant statistiquement significative. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (ESM).

Résultats

1. HnRNP A1^B perturbe la dynamique des granules de stress en retardant l'assemblage.

L'ensemble des données présenté dans ce mémoire a pour objectif de comprendre l'effet de l'épissage de hnRNP A1^B sur les GS. En effet, très peu de données démontrent le rôle de A1 et de ses variants dans leur cinétique de formation. Les GS sont des entités dynamiques qui peuvent être perturbées et observées de différentes façons, soit par leur taille et leur nombre, aux différentes périodes. La littérature abonde d'évidences à l'effet que suite à la formation initiale des GS, leur nombre diminue progressivement et leur taille augmente avant de disparaître [18, 22, 53].

Lorsque les cellules sont exposées à un stress oxydatif, la phosphorylation de la sous unité α du facteur initiation eIF2 provoque le désassemblage des polysomes est l'élément déclencheur pour la formation des GS canoniques [18]. Afin d'évaluer l'effet de hnRNP A1^B sur la dynamique des GS, nous avons étudié leur cinétique de formation, de fusion et de dissolution par immunofluorescence indirecte pour TIA-1 dans des cellules où l'expression de hnRNP A1^B a été augmentée puis soumis à un stress oxydatif (avec 0,5 mM de SA durant 30 minutes) suivi d'une résolution du stress en changeant le milieu. Les cellules ont été fixées à 30 minutes (formation), 60 minutes (assemblage) et 90 minutes (désassemblage). Pour l'ensemble des données, seules les cellules comptant un minimum de deux foyers marqués par TIA-1 avec une surface minimale de $0,75 \mu\text{m}^2$ ont été analysées et quantifiées.

En période de formation, la surexpression de hnRNP A1^B provoque une légère hausse du nombre de GS par cellules comparée à hnRNP A1 et le mutant hnRNP A1^{D262V} (hnRNP A1^B 12 ± 2 GS par cellule; hnRNP A1 11 ± 1 GS par cellule; hnRNP A1^{D262V} 8 ± 2 GS par cellule) (Fig. 7A-B). Lors de l'assemblage, les cellules hnRNP A1^B comptent une moyenne de GS par cellule légèrement supérieure à hnRNP A1 (hnRNP A1^B 10 ± 1 GS par cellule; hnRNP A1 8 ± 1 GS par cellule), mais semblable à hnRNP A1^{D262V} (hnRNP A1^B 10 ± 1 GS par cellule; hnRNP A1^{D262V} 11 ± 2 GS par cellules) (Fig. 7A-B). Ces résultats permettent de confirmer que les cellules transfectées avec le variant hnRNP A1^B conservent leur capacité à former des GS, ce qui en fait un modèle d'étude valable. Afin de clarifier si la dynamique est, oui ou non, perturbée, l'analyse de la taille a été faite.

Lors de la formation, à 30 minutes, les cellules transfectées avec hnRNP A1^B ont une taille moyenne des GS significativement diminuée de 10% ($1,57 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$, $p < 0,005$) par rapport à l'ensemble des autres conditions (hnRNP A1 $1,75 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$; hnRNP A1^{D262V} $1,81 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$; Mock $1,72 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$) (Fig. 7A,C). De la même façon, lors de l'assemblage, à 60 minutes, la taille moyenne des GS dans les cellules hnRNP A1^B est aussi significativement plus petite de 8 %, comparée à hnRNP A1 (hnRNP A1^B $1,76 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$; hnRNP A1 $1,90 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$; hnRNP A1^{D262V} $2,01 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$; Mock $2,03 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$) (Fig. 7A,C). De façon intéressante, à 90 minutes, en les comparant à hnRNP A1, les GS de hnRNP A1^B sont significativement plus grande de 14% (hnRNP A1^B $1,91 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$; hnRNP A1 $1,67 \pm 0,002 \mu\text{m}^2$; hnRNP A1^{D262V} $1,54 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$; Mock $1,71 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$, $p < 0,005$) (Fig. 7A,C). L'ensemble de ces données suggère que l'expression de hnRNP A1^B retarde la coalescence des GS, puisqu'elles sont plus petites à 30 minutes et 60 minutes et plus grosses à 90 minutes.

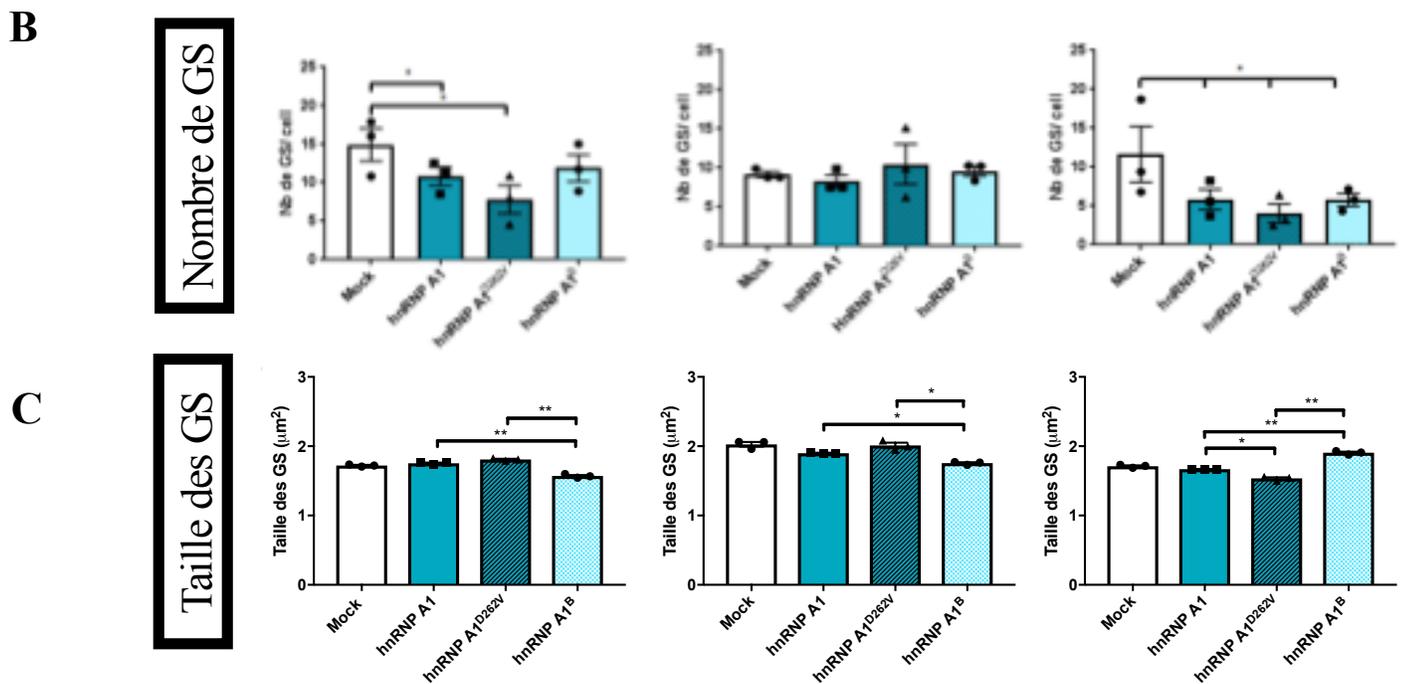
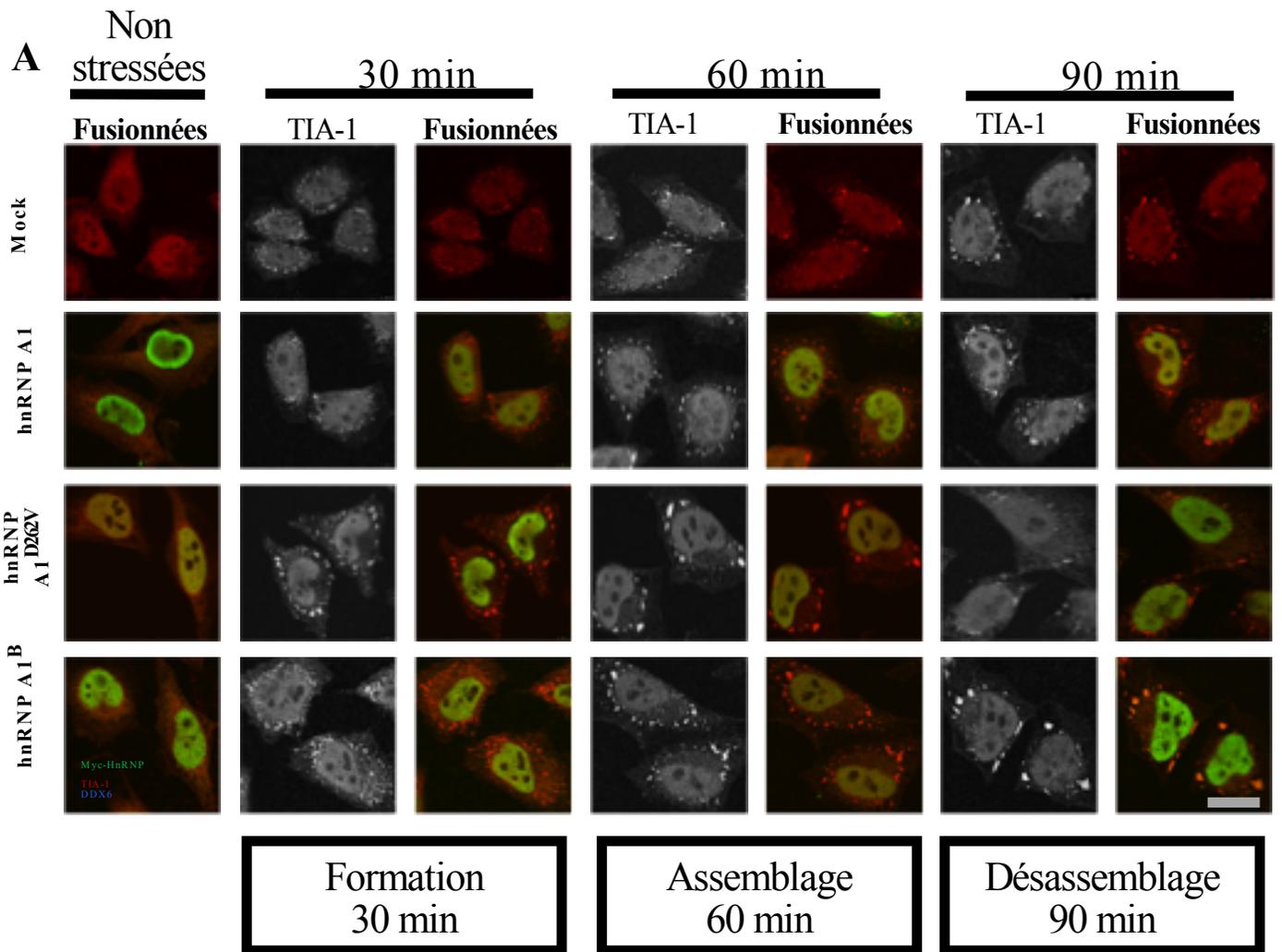


Figure 7. L'expression de hnRNP A1^B modifie la cinétique en terme de taille mais non de nombre des GS. (A-C). Les cellules HeLa ont été transfectées avec les l'ADNc et leur rapporteur Myc (en vert) indiqué, subséquentment stressées avec du SA, puis immunomarquées pour Myc. Barre d'échelle 10 µm. (A) Images représentatives de GS aux différentes périodes choisies pour la cinétique. (B,C) Quantification de la taille et du nombre des GS via une analyse semi-automatique avec ImageJ à 30-60 et 90 min après le traitement au SA. La moyenne de trois expérimentations indépendantes ± SEM a été mis en graphique. * p< 0,05
** p<0,005

En raison du rôle connu dans l'épissage de hnRNP A1/B, et en constatant que la dynamique des GS était altérée, nous nous sommes demandé si le fait d'augmenter l'expression de hnRNP A1^B avait un effet sur l'expression d'autres protéines de GS. L'immuno-buvardage des lysats cellulaires entiers HeLa montre que le niveau protéique de G3BP1, une protéine de nucléation importante des GS, est réduit significativement (p<0,05) (Fig. 8). L'expression de quatre autres protéines a été quantifiée mais aucune variation significative n'a été observée (données non présentées).

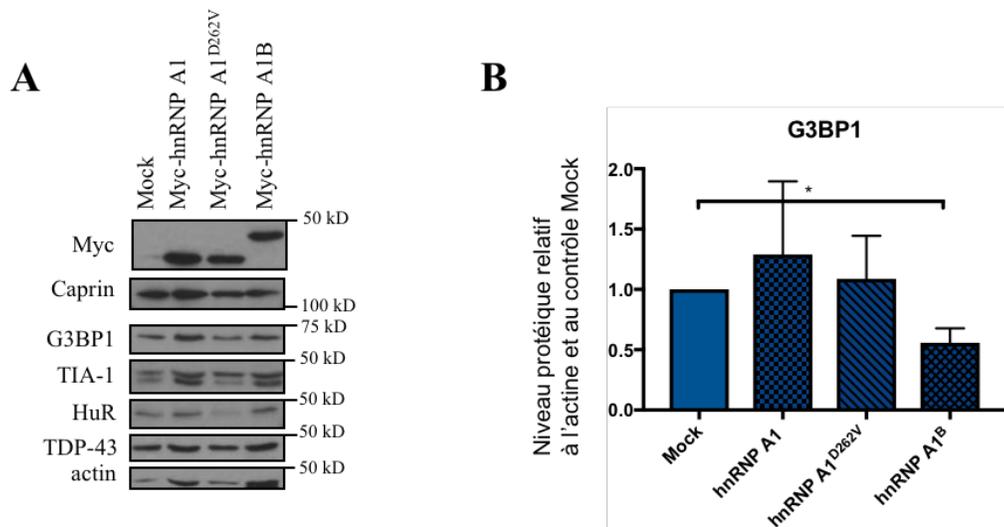


Figure 8. La surexpression de hnRNP A1^B réduit le niveau protéique de G3BP1. (A-B) Les cellules HeLa, ont été transfectées avec les l'ADNc et leur rapporteur Myc et les lysats protéiques ont subi un immunobuvardage de type Western avant d'être quantifiés par densitométrie. L'actine sert de contrôle pour le chargement. La moyenne de trois expérimentations indépendantes ± SEM a été mis en graphique. * p< 0,05

Lors de l'acquisition d'images, des inclusions sphériques, distinguable des GS et des PB ont été remarqués. Ces inclusions cytoplasmiques sont immunoréactives pour l'étiquette Myc et sont aussi présentes dans les cellules non stressées. Nous avons voulu exclure la possibilité qu'il puisse s'agir de granules de stress non canoniques. Il a été précédemment démontré que le prétraitement des cellules au cycloheximide, un inhibiteur d'élongation de la traduction, bloque à la fois la formation du GS et le désassemblage du polysome [27]. Pour y arriver, nous avons exposé les cellules à 50 µg/ml de cycloheximide durant 30 minutes avant le stress oxydatif au SA. La persistance de ces inclusions cytoplasmiques immuno-positif pour Myc après un traitement cycloheximide (Fig. 9) suggère que ces agrégats ne sont pas des GS canoniques et nous avons voulu vérifier si l'expression de hnRNP A1^B augmentait la probabilité de former des inclusions.

2. L'expression de hnRNP A1^B favorise l'agrégation *in vitro*

Afin de déterminer si l'inclusion de l'exon 7B dans la région riche en glycine, augmente la propension de hnRNP A1^B à former de agrégats, nous avons effectué une immunofluorescence sur des cellules HeLa transfectées avec des ADNc étiquetés Myc pour hnRNP A1, hnRNP A1^{D262V} et hnRNP A1^B, stressées et fixées selon les mêmes conditions précédemment décrites. Les agrégats cytoplasmiques de différentes tailles sont facilement observables dans chacune des conditions et les flèches rouges indiquent leur présence (Fig. 9A-B).

La quantification a révélé que les cellules transfectées avec hnRNP A1^B formaient 50% plus d'agrégats cytoplasmiques que les cellules transfectées avec hnRNP A1 et deux fois plus d'agrégats que hnRNP A1^{D262V} en condition non stressées (hnRNP A1^B 15 ± 3%; hnRNP A1 10 ± 3%; hnRNP A1^{D262V} 7 ± 2% de cellules avec agrégats, p<0,05) (Fig. 9C). Après 30 minutes de stress, les cellules hnRNP A1^B forment deux fois plus d'agrégats que hnRNP A1 et étonnamment, près de trois fois plus que le mutant favorisant l'agrégation hnRNP A1^{D262V} (hnRNP A1^B 14 ± 3%; hnRNP A1 7 ± 0,5%, p<0,05; hnRNP A1^{D262V} 5 ± 1%, p<0,005, de cellules avec agrégats) (Fig. 9C). À 60 minutes et 90 minutes, une augmentation soutenue du nombre de cellules avec agrégats est observée pour les cellules hnRNP A1^B (15 ± 2% et 20 ± 4% respectivement, p<0,05) en comparatif avec la forme sauvage hnRNP A1 (9 ± 2% et 11 ± 2% respectivement) (Fig. 9C). Remarquablement, hnRNP A1^{D262V} forme légèrement plus d'agrégats que la forme sauvage hnRNP A1, mais moins que hnRNP A1^B (11 ± 2% à 60 minutes et 15 ± 3% de cellule avec agrégats à 90 minutes, p<0,05) (Fig. 9C). Tel qu'attendu, l'ajout de 52 acides aminés dans le domaine apparenté aux prions augmente la propension de hnRNP A1^B à former des agrégats cytoplasmiques.

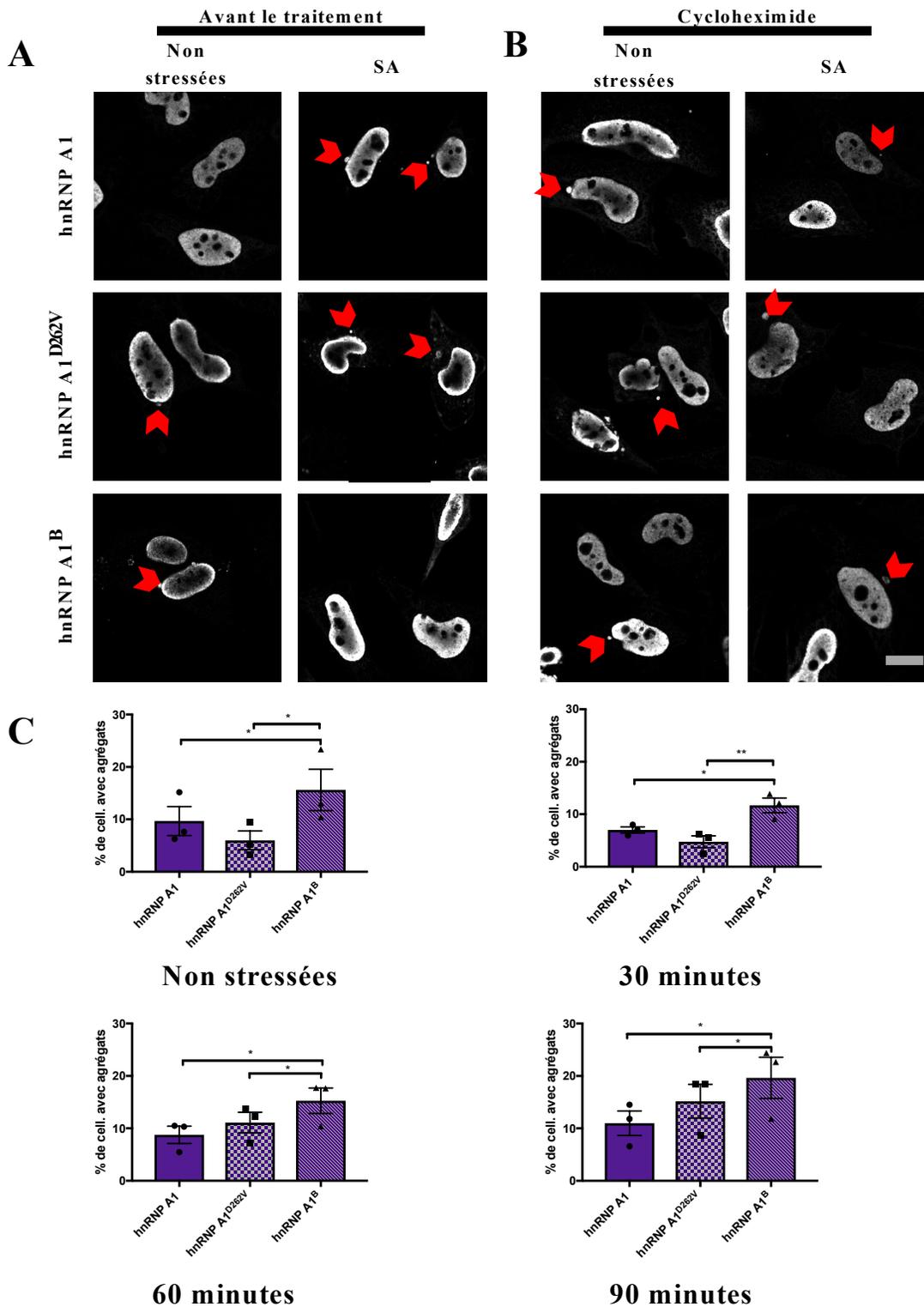


Figure 9. L'ajout de l'exon 7B dans la DRG favorise l'agrégation protéique. (A-C) Les cellules HeLa, ont été transfectées avec les ADNc et leur rapporteur Myc indiqué, puis immunomarquées pour Myc. Barre d'échelle 10 μm . (A) Les cellules *HeLa* ont été traitées, si indiqué, avec 0,5mM de SA pour 30 minutes puis fixées. (B) Les cellules ont d'abord été incubées avec 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de cycloheximide suivi, si indiqué, d'un stress avec 0,5mM de SA pour 30 minutes puis fixées. (A,B) Images représentatives d'agrégats Myc selon les conditions indiquées, les flèches rouges montrent les agrégats (C) Quantification du % d'agrégats observés dans le cytoplasme des cellules. La moyenne de trois expérimentations indépendantes \pm SEM a été mise en graphique. * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$.

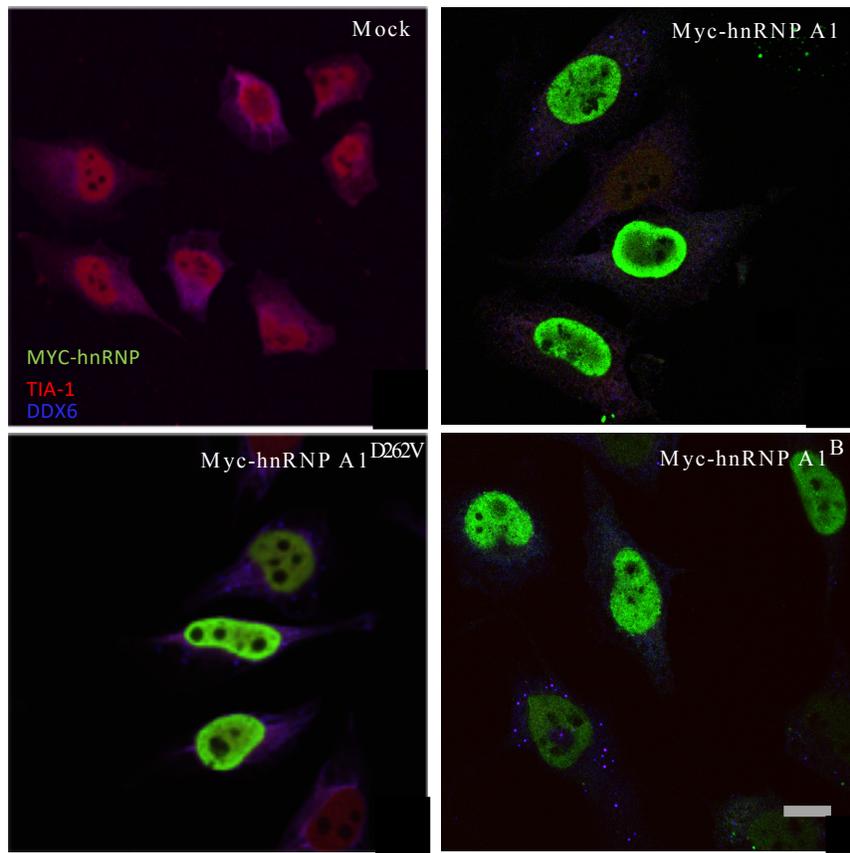
3. HnRNP A1^B retarde l'assemblage des PB

Les « *processing bodies* » (PB), bien que présents dans les cellules quiescentes et prolifératives, sont induits en plus grand nombre suite à l'exposition au SA (N. Kedersha et al., 2005). Les mêmes paramètres de détection et reconnaissance de GS ont été appliqués et seules les cellules avec un minimum de deux PB avec une taille minimale de $0,15 \mu\text{m}^2$ et une circularité entre 0,2 et 1 ont été quantifiées. Pour détecter les PB, le marqueur DDX6 a été utilisé (Fig. 10A). L'analyse a débuté par l'évaluation de l'impact de l'expression de hnRNP A1^B en condition basale, et compter le nombre de cellules ayant des PB, dans cette condition. Seulement $28 \pm 0,9\%$ ($p < 0,0005$) des cellules hnRNP A1^B ont des PB en comparaison avec hnRNP A1 et Mock qui ont, tous deux, $40 \pm 0,8\%$ et hnRNP A1^{D262V}, $35 \pm 0,8\%$ ($p < 0,05$) de cellules comptant des PB en condition non stressée (Fig. 10B). Ensuite, c'est la taille des PB qui a été quantifiée et étonnamment, alors que Mock, hnRNP A1 et le mutant hnRNP A1^{D262V} ont une taille similaire ($0,35 \pm 0,4 \mu\text{m}^2$, $0,34 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ et $0,32 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$), les PB de hnRNP A1^B sont significativement plus gros ($0,40 \pm 0,003 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$) (Fig. 10C). Il y a moins de cellules transfectées avec hnRNP A1^B qui ont des PB et ces PB sont plus gros en condition basale, cela est surprenant et nous nous sommes intéressés à ce qu'il en était en condition de stress oxydatif puisque les PB sont aussi induits dans ces conditions.

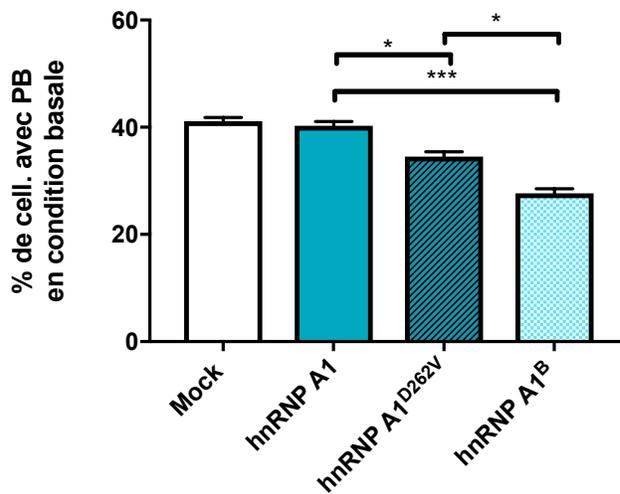
Comme les GS, les PB s'assemblent, mais la machinerie derrière cet assemblage demande encore à être élucidée [206]. Pour évaluer s'il existait une dérégulation dans l'assemblage des PB, en condition de stress, leur taille a été quantifiée.

Alors que la taille de PB augmente progressivement pour les cellules Mock et hnRNP A1 à 30, 60 et 90 minutes, les PB inclus dans les cellules hnRNP A1^B tardent à s'assembler (hnRNP A1^B $0,34 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$, $0,35 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$, $0,37 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$; hnRNP A1 $0,39 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$, $0,40 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ et $0,43 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$ à 30 et 60 minutes et $p < 0,005$ à 90 minutes) (Fig. 11B,E,H). Ce retard dans la fusion des PB ressemble au retard observé dans les GS et ce défaut dans l'assemblage de ces deux structures laisse à croire que l'amarrage pourrait aussi, être perturbé. La quantification du nombre de PB n'a rien révélé de significatif (Fig. 11C,F,I)

A



B



C

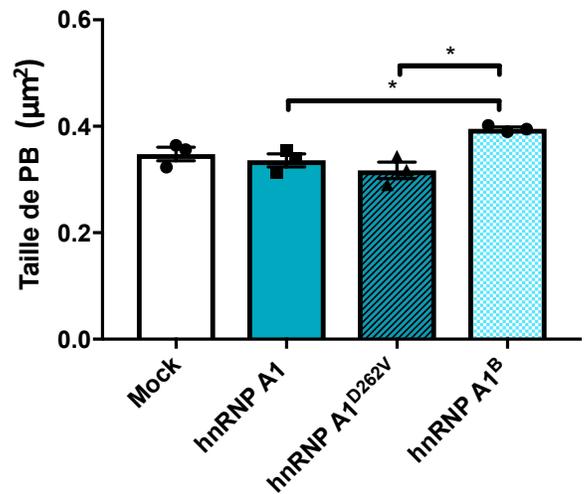


Figure 10. L'expression de hnRNP A1^B perturbe la dynamique des PB en condition basale. (A,B) Les cellules HeLa, non stressées, ont été transfectées avec les ADNc et leur rapporteur Myc indiqué. Barre d'échelle 10 μm. (A) Images représentatives de PB en condition basale, immuno-marqués avec DDX6 pour visualiser les PB et TIA-1 comme marqueur de noyau. (B,C) Quantification du (B) % de cellules qui comptent au moins deux PB et (C) de la taille des PB via une analyse semi-automatique avec ImageJ. La moyenne de trois expérimentations indépendantes ± SEM a été mise en graphiques. * p< 0,05 *** p<0,0005.

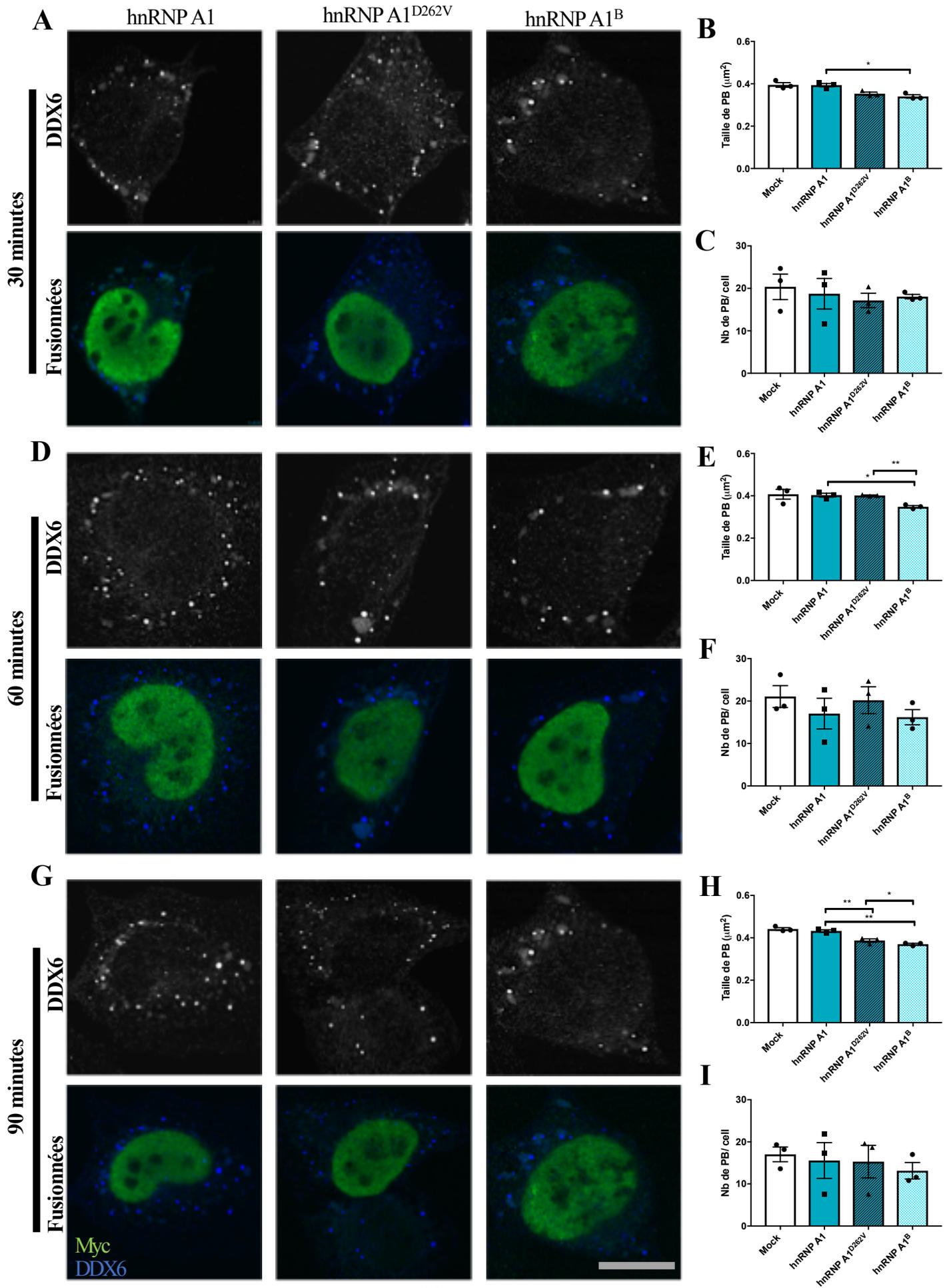


Figure 11. L'expression de hnRNP A1^B résulte en une taille inférieure pour les PB, en condition stressée. (A-E) Les cellules HeLa ont été transfectées avec les l'ADNc et leur rapporteur Myc indiqué, subséquemment stressées avec 0,5 mM SA, puis immuno-marquées pour Myc. Barre d'échelle 10 μ m. (A-C-E) Images représentatives de PB, après 30-60 et 90 minutes après le traitement au SA. (B-D-F) Quantification de la taille et du nombre des PB via une analyse semi-automatique avec ImageJ. La moyenne de trois expérimentations indépendantes \pm SEM a été mis en graphique. * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$.

4. HnRNP A1^B interfère dans l'amarrage avec les GS

L'observation des GS et des PB, après un stress, a mis à jour un phénomène appelé amarrage qui se produit entre les deux granules à ARN. Cette liaison est pensée servir de lieu d'échange de composants [10, 45]. Afin de déterminer si l'amarrage entre les GS et les PB est influencé par l'expression de hnRNP A1^B, grâce aux mêmes méthodes expérimentales, nous avons observé par immunofluorescence le phénomène en utilisant des marqueurs spécifiques pour ces deux structures. L'amarrage GS-PB a été défini comme la zone de chevauchement entre le signal de TIA-1 (GS) et de DDX6 (PB). Cette zone doit être clairement superposée, mais partielle (Fig. 12A-B). De façon cohérente avec les dérégulations observées dans l'assemblage des GS et PB, l'amarrage entre ces deux granules à ARN est lui aussi, perturbé. Ainsi à 60 et 90 minutes, dans les cellules hnRNP A1^B l'amarrage est réduit significativement de 35% et 38% comparativement aux cellules hnRNP A1 (hnRNP A1^B $24 \pm 2,6\%$ et $19 \pm 2,4\%$ PB amarrés; hnRNP A1 $38 \pm 2,3\%$ et $30 \pm 1,2\%$ PB amarrés, $p < 0,005$) (Fig. 12C). Les cellules exprimant hnRNP A1^{D262V}, à 60 et à 90 minutes, se comportent comme les cellules hnRNP A1 (hnRNP A1^{D262V} $37 \pm 1,5\%$ et $32 \pm 3\%$ PB amarrés) (Fig. 12C).

Les cellules transfectées avec l'épissage alternatif hnRNP A1^B font moins d'amarrage entre les PB et les GS. Ces résultats, considérés dans un ensemble, suggèrent que l'inclusion de l'exon 7B, inséré dans la région riche en glycine, induit un retard dans l'assemblage des GS et des PB et que ce retard empêche l'amarrage efficace entre les GS et les PB.

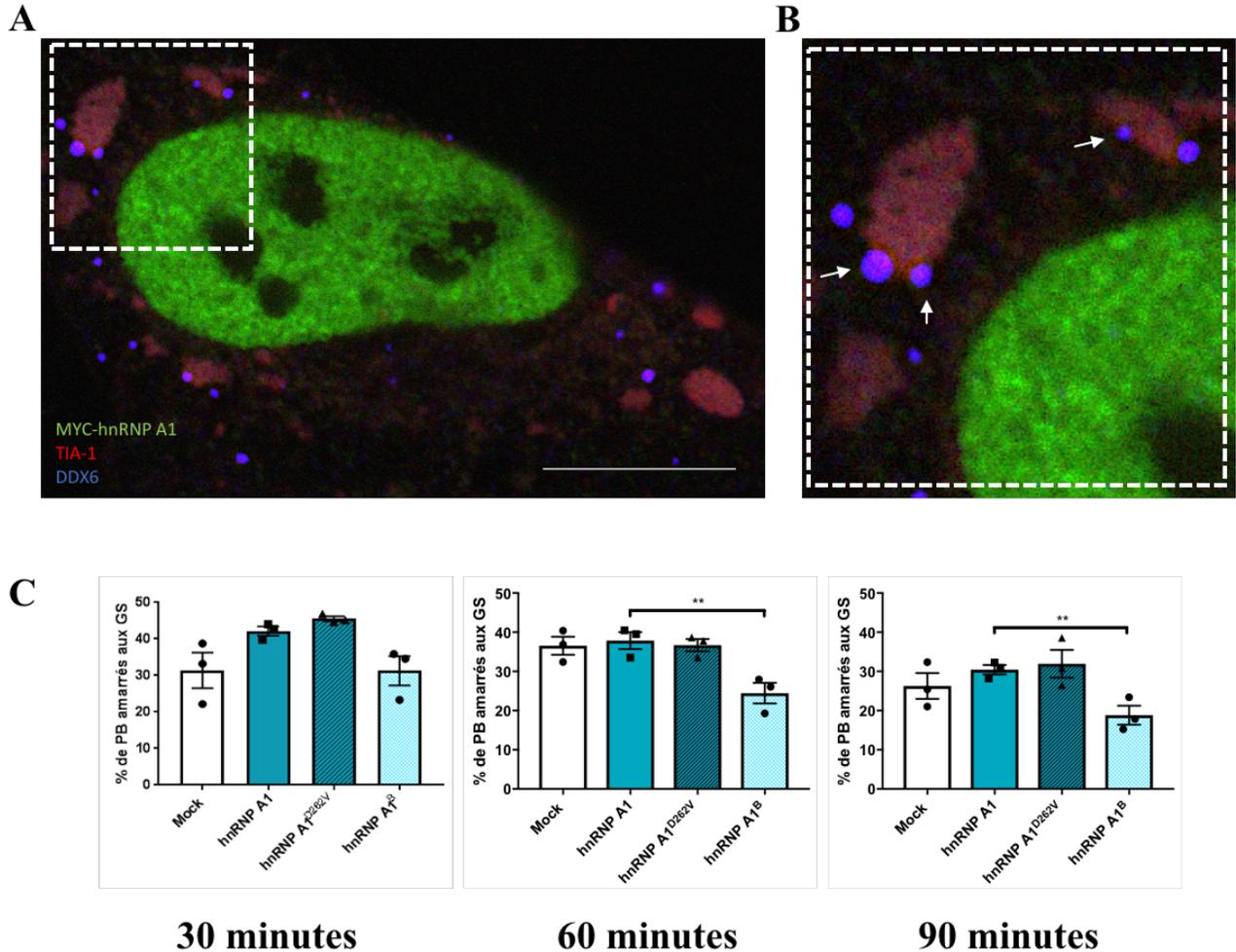


Figure 12. L'amarrage entre les GS et les PB est réduit dans les cellules exprimant hnRNP A1^B (A-C) Les cellules HeLa, stressées, ont été transfectées avec les l'ADNc et leur rapporteur Myc indiqué. Barre d'échelle 10 μ m. (A) Image représentative de PB amarrés avec des GS en condition stressée et (B) Zoom 2X pour visualiser le chevauchement partiel entre les PB et les GS, immuno-marquées avec DDX6 (bleu) pour visualiser les PB et avec TIA-1 (rouge) comme marqueur de GS. (C) Quantification du % d'amarrage entre les PB et les GS. La moyenne de trois expérimentations indépendantes \pm SEM a été mis en graphiques. * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$.

Discussion

Ce projet a pour objectif de caractériser un aspect fonctionnel de la réponse cellulaire au stress oxydatif, reflété dans la dynamique des granules de stress lors de l'expression de la forme variante de hnRNP A1; hnRNP A1^B. Cette étude a permis, pour la première fois, de visualiser l'effet de l'expression augmentée de l'isoforme plus longue. HnRNP A1 est une protéine navette nucléo-cytoplasmique qui est impliquée à différents niveaux dans le métabolisme ARN, dans la régulation génique et la biogenèse des miARN [139, 168]. HnRNP A1 est ubiquitaire et hautement exprimée dans les tissus nerveux, son isoforme, au DRG augmenté, hnRNP A1^B est largement sous-exprimée [169]. Cependant, très peu est connu sur l'effet de l'expression augmentée de l'isoforme longue dans la cellule. Ceci s'explique en partie en raison de l'indisponibilité d'un anticorps spécifique pour hnRNP A1^B. Depuis peu, un nouvel anticorps est disponible et sa spécificité a été démontrée [205]. Les cinq dernières années ont été prolifiques en études dédiées aux hnRNP, comme TDP-43, FUS ou encore hnRNP A1, et leurs implications dans la pathogenèse de la SLA. Des inclusions cytoplasmiques de ces protéines, qui de surcroît sont aussi des protéines retrouvées dans les GS, sont trouvées dans les tissus de patients SLA [144, 201]. De plus, des mutations liées à la SLA dans des protéines composantes des GS sont associées à l'accumulation de GS persistants. À titre d'exemple, FUS, VCP et hnRNP A1 ont été étudiées en ce sens [66, 200, 207]. Ces nouvelles preuves génétiques et moléculaires suggèrent qu'une dynamique déficiente des GS joue un rôle dans la pathogenèse de la SLA et la DFT.

Nous avons donc posé l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de hnRNP A1^B a un effet délétère sur la cellule, et ce, de deux façons. La première, en perturbant la dynamique des granules de stress, et deuxièmement, en favorisant la formation de corps d'inclusions cytoplasmiques.

hnRNP A1^B retarde l'assemblage des GS et des PB

L'isoforme hnRNP A1^B se distingue par l'inclusion de 52 acides aminés supplémentaires dans le domaine apparenté aux prions. Le PrLD est important pour l'assemblage et le recrutement aux GS et cela a été démontré pour différentes protéines comme TIA-1, TDP-43 et hnRNP A1 [32, 42, 208]. De ce fait, nous nous sommes demandé si cette insertion dans le PrLD de hnRNP A1^B pouvait avoir un effet sur la dynamique des granules de stress. L'analyse quantitative des GS a révélé que l'expression de hnRNP A1^B retarde l'assemblage de ces dernières. Les cellules transfectées avec l'ADNc de hnRNP A1 et ses variants ont été soumises à un stress oxydatif (0,5 mM de SA pendant 30 minutes) puis les cellules avec GS ont été comptabilisées aux différents temps de la cinétique. En établissant que les cellules contrôles Mock et celles de l'expression de la forme courte, hnRNP A1, avaient des cinétiques semblables et comparables, hnRNP A1^B et hnRNP^{D262V} ont dès lors été comparées avec hnRNP A1. Nous avons apporté la preuve que la dynamique des GS est perturbée dans les cellules où l'isoforme longue est surexprimée. Ainsi les GS ont une taille significativement inférieure à 30 minutes et à 60 minutes en comparant aux cellules exprimant hnRNP A1. Ce résultat est surprenant puis qu'il était attendu que les cellules hnRNP A1^B aient les mêmes capacités de formation de GS, arborant des tailles semblables.

Cependant, l'hypothèse était que des lacunes seraient observées au niveau du désassemblage, expliquées par un PrLD amplifié. Les GS de hnRNP A1^B sont effectivement plus gros à 90 minutes, mais le fait qu'ils étaient plus petits à 30 et 60 minutes suggère plutôt un retard dans l'assemblage. De plus, à 120 minutes, moins de 10% des cellules, toutes conditions de transfections, ont encore des GS (Fig. S1, en annexe). Les cellules où le mutant hnRNP A1^{D262V} est exprimé montre un assemblage légèrement plus rapide que la forme sauvage, ce qui est conforme ce qui a déjà été démontré, suggérant que le mutant hnRNP A1^{D262V} accélère la formation des GS [200].

En ce qui concerne le nombre de GS par cellules, les résultats n'ont rien révélé de significatif si ce n'est que les cellules transfectées avec hnRNP A1 et ses variants ont moins de GS comparés aux cellules Mock et que cette différence est vraiment observable à 90 minutes. Cela laisse penser que la surexpression en elle-même modifie la capacité des cellules à former un nombre de GS comparable à Mock. Afin d'évaluer si l'ajout des 52 acides aminés dans le PrLD pouvait avoir un impact sur l'expression d'autres protéines de GS, nous avons analysé, par immunobuvardage le niveau protéique de cinq protéines associées aux GS et il apparaît que l'expression d'une seule d'entre elles semble affectée, celle de G3BP1, une protéine de nucléation. Cependant nous restons sceptiques sur cette conclusion, une augmentation du n est donc nécessaire. Si toutefois, augmenter le n de l'expérience confirme ce résultat, que l'expression augmentée de hnRNP A1^B réduit l'expression de G3BP1, un acteur incontournable pour l'assemblage des GS [53, 209], cela pourrait expliquer le nombre réduit de GS par cellule.

Suivant l'observation de la dynamique altérée des GS, la cinétique d'assemblage des PB a aussi été étudiée. Les PB peuvent être présents dans les cellules non stressées [45], alors l'analyse a débuté par l'étude des PB dans cette condition. De façon étonnante, avant même l'ajout de stress, les PB dans les cellules hnRNP A1^B comptent 31 % moins de PB que hnRNP A1, mais ces PB sont près de 20% plus gros. En condition de stress au SA, la forme courte montre une croissance dans la taille des PB entre 30 et 90 minutes, reflétant une cinétique adéquate [45, 53]. Les PB des cellules hnRNP A1^B affichent, non seulement une taille significativement inférieure tout au long de la cinétique, mais alors que les PB de la condition contrôle montrent une croissance dans la taille de 14%, ceux de hnRNP A1^B croissent d'à peine 4%. Ceci suggérant que, tout comme dans les GS, l'expression de l'isoforme longue, non seulement retarde, mais empêche l'assemblage des PB. De façon similaire au GS, le nombre de PB par cellule ne montre aucune différence significative et dans ce cas précis, l'ensemble des conditions montre un nombre de PB par cellule comparable. Le rôle et la contribution de hnRNP A1 à la cinétique des GS ont été peu étudiés et demandent à être définis.

Dans la même famille de RBP, hnRNPA2/B1 sont des protéines qui ressemblent à hnRNPA1/B. En effet, tout comme nos protéines d'intérêts, hnRNPA2/B1 sont épissées alternativement en court (hnRNPA2) et en isoforme plus longue de 12 acides aminés (hnRNPB1) [210, 211]. L'isoforme courte est, elle aussi, à plus forte expression (90%) et les mutations concernant ces protéines sont, elles aussi, dans le PrLD [92, 153, 200, 211, 212].

Ces RBPs ont plutôt été caractérisées dans la protéinopathie multi-systèmes (MSP), toutefois, leur association avec la SLA est de plus en plus fréquente [200, 212, 213]. Néanmoins, leur implication dans la cinétique des GS est, une fois de plus, peu étudiée. Ce sont surtout l'effet des mutants de hnRNPA2/B1 qui a été clarifié, sans distinction à l'isoforme longue.

Il fut alors démontré qu'en utilisant des cellules souches pluripotentes dérivées de patients, la mutation D290V accélérerait le recrutement de hnRNPA2/B1 dans les GS induits avec le puromycine [213]. Le rôle moléculaire des isoformes longues, dans un contexte physiologique comme pathologique demande encore à être élucidé.

HnRNP A1 est une protéine nouvellement à l'étude dans la SLA et beaucoup reste encore à être découvert. Dans le cas présent il s'agit d'un modèle de surexpression et ce modèle semble adapté pour deux raisons, d'abord parce que la surexpression n'inhibe pas la capacité des cellules à former des GS et des PB, ensuite, parce des nouvelles données suggèrent que c'est un phénotype observable chez les patients SLA [205]. Une limite de mes expérimentations est l'utilisation de lignées cellulaires immortelles comme modèle. Quoique l'utilisation de cellules HeLa était le choix à faire pour d'abord explorer si des changements étaient notables. Elles sont faciles à transfecter et leur cytoplasme est grand, ce qui permet de bien étudier les GS et les PB. De plus, ce sont les cellules les plus utilisées dans la littérature pour l'étude des GS [53]. De fait, pour comparer les résultats, c'est l'idéal. Cependant, ces lignées éternelles ne sont ni de type neuronal, ni un modèle qui permet d'induire la sénescence. Ces deux caractéristiques sont requises pour en faire un modèle plus réaliste des cellules de patients SLA.

Pour remédier à cette limitation, il serait donc intéressant d'utiliser des cellules souches pluripotentes dérivées de patients et différenciées en cellules neuronales pour observer si l'expression augmentée de hnRNP A1^B interfère dans la cinétique des GS [214]. Ce modèle serait plus représentatif de la maladie puisqu'il s'agirait d'une cellule nerveuse affectée par la SLA au lieu d'une cellule immortelle.

hnRNP A1^B favorise l'agrégation cytoplasmique

Il fut démontré que hnRNP A1 subit la séparation par interface liquide-liquide et que ceci est médié par le DRG. De plus, la protéine a aussi la capacité intrinsèque de s'autoagréger en fibrilles de type amyloïde et l'ajout de l'exon supplémentaire, qui insère 52 acides aminés au DRG de l'isoforme longue, augmente cette propension [200, 205]. Nos résultats vont dans ce sens. Nous rapportons dans cette étude que l'expression de hnRNP A1^B favorise l'agrégation protéique. À 0, 30, 60 et 90 minutes, les cellules à l'expression augmentée de hnRNP A1^B forment de 60% à 77% plus d'agrégats protéiques. De façon intrigante, les cellules qui expriment le mutant hnRNP A1^{D262V} forment moins d'agrégats cytoplasmiques que la forme sauvage hnRNP A1 en condition basale et après 30 minutes de stress. Cette tendance, toutefois, disparaît par la suite et le mutant hnRNP A1^{D262V} forment plus d'agrégats que hnRNP A1 mais moins que hnRNP A1^B, ce qui est conforme à ce qui a déjà été démontré [205]. Comme il fut démontré que cette mutation accélérât la formation de fibrilles [42, 200], cela suggère que l'ajout de l'exon 7B amplifie cette propension à l'agrégation. Il reste à déterminer si augmenter l'expression de hnRNP A1^B, augmente l'encombrement protéique et si cette formation d'agrégats est pathologique.

Afin de confirmer biochimiquement cette propension, il faudrait faire une microfiltration avec acétate de cellulose, qui n'a pas d'affinité pour les protéines et qui retient les agrégats supérieurs à 0,2 µm. Les résultats pourront confirmer ou infirmer la propension à l'agrégation.

L'expression de hnRNP A1^B interfère dans l'amarrage entre les GS et les PB

Ce lien entre les GS et les PB s'observe en imagerie confocale. La superposition partielle et la composition différentielle de ces deux granules de ribonucléoprotéides favoriseraient les échanges, à deux directions, de composantes [45], mais la venue de la protéomique ébranle ce dogme [75]. Des études supplémentaires sauront venir appuyer ou réfuter cette nouvelle vision.

Bien que peu étudié, il fut démontré qu'à un certain moment dans la cinétique, il apparaît que l'amarrage entre les GS et les PB est favorisé quand les GS sont plus gros [53]. Nos données démontrent que l'amarrage est réduit de plus de 35% à 60 et 90 minutes. Ces résultats vont dans le sens de la littérature, quoique ténue, à l'effet que l'assemblage adéquat des GS et PB favorise l'amarrage entre les deux structures.

Ce travail ne fait qu'effleurer le rôle de hnRNP A1^B dans le mécanisme de réponse au stress. Considérées dans un ensemble, les données présentées dans ce mémoire soulèvent une question importante sur la composition extensive de ces cytoagrégats favorisés par la surexpression de hnRNP A1^B. Séquestrent-ils des éléments constitutifs des PB et des GS qui perturbent, conséquemment, la réponse au stress? Un co-immunomarquage avec des protéines associées aux GS et PB et myc-hnRNP A1^B saurait apporter un complément d'informations utiles.

La figure 13 propose un modèle qui pourrait expliquer la séquence événementielle qui se produit dans les motoneurons des patients atteints de la SLA ou même de la DFT. Dans ces deux cas, TDP-43 n'est plus nucléaire et sa délocalisation dans le cytoplasme favorise son agrégation [114, 149].

TDP-43 et hnRNP A1/A1^B sont des RBP multifonctions dans le métabolisme des ARN et les nouvelles évidences présentées par notre laboratoire suggèrent que leurs contributions dans la pathogenèse et l'évolution de la SLA est peut-être liée l'une à l'autre.

Ce modèle, présenté à la figure 13, débute par la délocalisation de TDP-43 dans le cytoplasme, le dépouillant de sa fonction d'autorégulation. Ceci ayant pour conséquence d'augmenter l'expression de hnRNP A1 et son isoforme longue, hnRNP A1^B. Ces RBP, maintenant cytoplasmiques, augmentent l'encombrement et forment des agrégats, ce qui est toxique pour la cellule. L'augmentation de l'expression de hnRNP A1^B affecte la dynamique de GS et de PB, qui tardent à s'assembler et qui, par conséquent, ont moins la capacité à s'amarrer ensemble. En diminuant l'amarrage entre les deux granules de ribonucléoprotéines, ces dernières ne peuvent s'échanger adéquatement les ARNm destinés, de part et d'autre, à la traduction et à la dégradation. La cellule peine donc à rétablir l'homéostasie et en meurt. Il est nécessaire de continuer ce projet afin de déterminer si l'expression augmentée de l'isoforme longue contribue à la pathogenèse de la SLA et si cette augmentation est spécifique aux tissus nerveux. Ainsi, hnRNP A1^B pourrait être une cible thérapeutique potentielle qui, un jour, pourrait améliorer les conditions de vie des patients souffrant de la SLA.

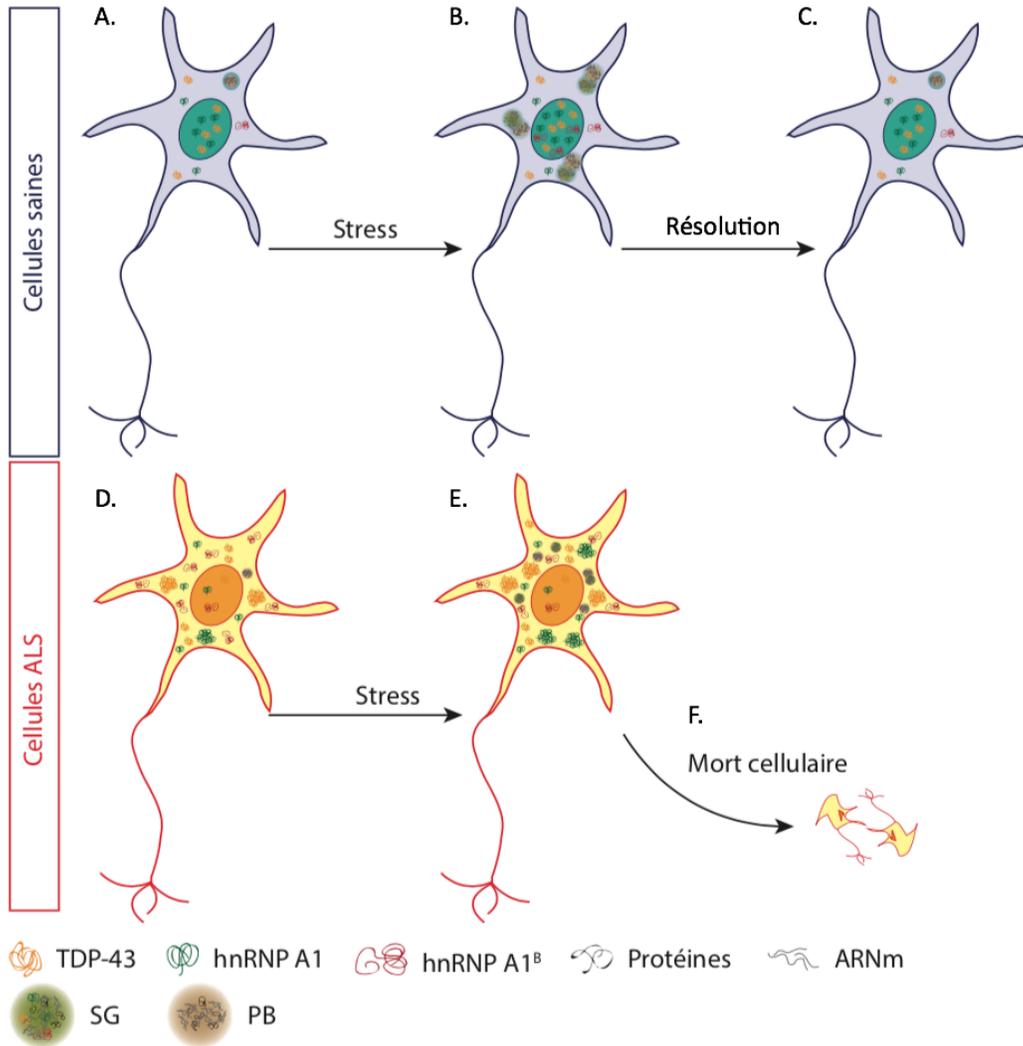


Figure 1. L'expression augmentée de hnRNP A1^B est potentiellement nocive pour la cellule. Modèle proposé pour expliquer la vulnérabilité neuronale. A) Neurone sain où TDP-43 et hnRNP A1 sont nucléaires. B) Suite à un stress oxydatif, il y a formation de GS et induction de PB. TDP-43 et hnRNP A1 sont recrutés aux GS. L'amarrage se fait entre les GS et les PB. C) Une fois le stress résolu, la cellule reprend le cours normal de ses activités. D) Neurone affecté par la SLA. TDP-43 et hnRNP A1 sont délocalisés dans le cytoplasme. La délocalisation de TDP-43 provoque une augmentation de l'expression de hnRNP A1^B et de hnRNP A1. On note la formation d'agrégats protéiques de TDP-43 et des agrégats protéiques de hnRNP A1/hnRNP A1^B. E) L'augmentation de l'expression de hnRNP A1^B induit des GS et des PB plus petits. L'amarrage est réduit, limitant la cellule dans sa capacité à réguler les ARNm destinés à reprendre la traduction et ceux destinés à la dégradation. Ce manque de régulation, couplé à l'encombrement protéique est délétère pour la cellule et contribue à la vulnérabilité cellulaire, entraînant la mort du neurone. HnRNP A1^B est une cible thérapeutique potentielle contre laquelle des oligonucléotides anti-sens pourraient être dirigés afin de limiter l'expression de l'isoforme longue. Image générée par Sophie Rolland et Sandra Joppé.

Conclusion

La SLA est une maladie mortelle et complexe, où les cellules motoneuronales des patients SLA montrent de nombreuses défaillances cellulaires. Aucune cure n'existe, malheureusement, pour cette maladie qui condamne les patients à mourir sur une période entre deux et cinq ans. Comprendre la sélectivité d'atteinte des motoneurons dans la SLA est essentiel pour trouver une cible thérapeutique efficace qui freinera la progression létale de la maladie. TDP-43, une hnRNP grandement impliquée dans le métabolisme des ARN, est le stigmate le plus remarquable des cellules de patients SLA. Notre laboratoire a récemment observé que lorsque cette protéine est délocalisée dans le cytoplasme, un phénotype bien reconnu dans la SLA, cela influe sur l'épissage de *HNRNPA1* et par conséquent, l'expression de la protéine, hnRNP A1 et son isoforme longue, hnRNP A1^B est augmentée. Cette augmentation de hnRNP A1^B se traduit, selon les expérimentations effectuées, par un effet toxique entraînant la mort cellulaire. De plus, l'analyse de tissus *post-mortem* de patients SLA a aussi montré que les tissus du SNC des patients sSLA sont enrichis en hnRNP A1^B et arborent des inclusions cytoplasmiques dans les motoneurons, immunoréactives pour l'isoforme longue [205]. À la lumière de ces résultats et de ceux qui pointent la dérégulation de la cinétique des GS comme facteur contributif à la pathogenèse de la SLA [42, 146, 202, 215], l'étude de l'impact de hnRNP A1^B se voulait la suite logique.

Nous avons déjà démontré que l'expression augmentée de hnRNP A1^B est toxique pour la cellule. Les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent que l'ajout des 52 acides aminés dans le PrLD résulte en une dynamique des GS altérée, les GS et PB montrent des défauts d'assemblage et cela se reflète sur la capacité de ces deux granules ribonucléoprotéines à s'amarrer ensemble. La vulnérabilité cellulaire pourrait être expliquée, du moins en partie, par ce défaut d'amarrage GS-PB. Cela, entraînant la dégradation d'ARNm destinés à la traduction, mais n'ayant pas pu être transféré aux GS. La surexpression de hnRNP A1^B provoque, de plus, l'accumulation en agrégats cytoplasmiques de hnRNP A1^B observés et quantifiés à l'aide du rapporteur Myc. Mes résultats permettent d'améliorer la compréhension de la fonction du variant de hnRNP A1 dans la réponse au stress et de mettre en lumière un élément supplémentaire de la conséquence de la délocalisation de TDP-43 dans le cytoplasme. Considérant ces résultats, le modèle proposé à la figure 13 tente d'expliquer la cascade d'évènements qui contribue à l'effet délétère sur la cellule. À partir de ce modèle, il est possible de penser que limiter l'expression de l'isoforme longue, à l'aide oligonucléotides antisens, permettrait de limiter le stress cellulaire induit par la surexpression de hnRNP A1^B et par conséquent, avoir un effet positif favorisant la survie neuronale. Néanmoins, quoique prometteurs, les résultats présentés dans ce mémoire laissent plusieurs questions en suspens.

Les évidences recueillies pour ce mémoire pourront servir de base pour améliorer la compréhension du rôle et de la conséquence de l'expression augmentée de l'épissage alternatif, hnRNP A1^B. Ensuite, il serait intéressant d'évaluer l'impact des mutants de hnRNP A1^B, identifiés dans les patients SLA, sur la dynamique GS-PB. Pour y arriver, l'utilisation de cellules CB3 serait l'idéal, car elle n'exprime pas de façon endogène, hnRNP A1 [216].

À partir de ces cellules, créer des lignées cellulaires stables et inductibles, avec différents niveaux d'expression protéique qui pourront aider à déterminer quelle concentration de la protéine est nécessaire pour devenir toxique. De plus, étant donné leur particularité, les CB3 permettront de comparer des cellules dépourvues de hnRNP A1, avec celles qui l'expriment, l'isoforme longue ainsi que leurs formes mutantes. De fait, les fonctions d'épissages, de navette nucléo-cytoplasmique, du potentiel rôle dans la dynamique des GS et PB pourront être étudiés. Cela dans le but d'approfondir les connaissances concernant ces protéines. Il serait aussi souhaitable d'utiliser des lignées neuronales, un modèle cellulaire plus représentatif pour étudier les mécanismes physiopathologiques, comme les NSC-34. Ces cellules, transfectées avec hnRNP A1^B, pourront être observées en imagerie en temps réel « *Live cell imaging* » afin d'établir la séquence de formation de GS et d'agrégats et déterminer si ces deux événements sont liés. Si ces événements sont dépendants l'un de l'autre, ou encore, si le niveau d'expression de la protéine est un facteur déterminant.

Les souris transgéniques sont des modèles largement utilisés pour étudier tous les aspects qui influent sur la pathogenèse et le développement de la SLA. Il existe de nombreux modèles murins transgéniques pour TDP-43, SOD1 et, en 2015, une équipe de chercheurs a mis au point la première souris transgénique C9ORF72 [217-220]. Ces modèles sont imparfaits car ils présentent souvent qu'un aspect ou un phénotype de la maladie. De plus, l'expression du phénotype à l'étude est souvent inconstante. Ces modèles permettent néanmoins, de mieux comprendre certains aspects de la pathogenèse de la SLA et peuvent servir de tremplin vers les études précliniques. À ce jour il n'existe pas de modèles murins qui n'expriment ni la forme humaine sauvage de hnRNP A1, ni ses mutations associées à la SLA et encore moins son isoforme longue, hnRNP A1^B.

La création de ces modèles permettrait d'étudier, *in vivo*, l'effet de l'expression augmentée de hnRNP A1^B sur l'agrégation cytoplasmique de la protéine. De plus, cela pourrait servir à déterminer quel niveau d'expression est requis pour que l'agrégation résulte en inclusions pathologiques. Ces modèles permettraient de déterminer si l'expression augmentée du variant de hnRNP A1 influe sur l'épissage d'autres protéines et si cela menace l'espérance de vie.

Les résultats présentés dans ce mémoire ainsi que les perspectives d'avenir qui peuvent en découler pourront permettre d'élucider des aspects très actuels de la recherche, non seulement de la SLA, mais aussi de la DFT ou encore, pour mieux comprendre l'atrophie multisystème. Ces ajouts de connaissances sont essentiels à l'élaboration de traitements pour enfin limiter le dessein mortel de la SLA.

Bibliographie

- [1] A.F. Harrison, J. Shorter, RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease, *Biochem J*, 474 (2017) 1417-1438.
- [2] J.C. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, M. Yandell, C.A. Evans, R.A. Holt, J.D. Gocayne, P. Amanatides, R.M. Ballew, D.H. Huson, J.R. Wortman, Q. Zhang, C.D. Kodira, X.H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P.D. Thomas, J. Zhang, G.L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A.G. Clark, J. Nadeau, V.A. McKusick, N. Zinder, A.J. Levine, R.J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A.E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T.J. Heiman, M.E. Higgins, R.R. Ji, Z. Ke, K.A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G.V. Merkulov, N. Milshina, H.M. Moore, A.K. Naik, V.A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D.B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M.L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferreira, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y.H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N.N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J.F. Abril, R. Guigo, M.J. Campbell, K.V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y.H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh, X. Zhu, The sequence of the human genome, *Science*, 291 (2001) 1304-1351.

- [3] W.R. Al Sultan A, Heath P, Kirby J, The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights, Dovepress, 2016:6 (2016) 49-64.
- [4] P.A. Dion, H. Daoud, G.A. Rouleau, Genetics of motor neuron disorders : new insights into pathogenic mechanisms, *Nat Rev Genet*, 10 (2009) 769-782.
- [5] H.P. Harding, Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P.D. Lu, M. Calton, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D.F. Stojdl, J.C. Bell, T. Hettmann, J.M. Leiden, D. Ron, An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Mol Cell*, 11 (2003) 619-633.
- [6] C.O. Brostrom, C.R. Prostko, R.J. Kaufman, M.A. Brostrom, Inhibition of translational initiation by activators of the glucose-regulated stress protein and heat shock protein stress response systems. Role of the interferon-inducible double-stranded RNA-activated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase, *J Biol Chem*, 271 (1996) 24995-25002.
- [7] P. Anderson, N. Kedersha, RNA granules : post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (2009) 430-436.
- [8] J.P. White, A.M. Cardenas, W.E. Marissen, R.E. Lloyd, Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase, *Cell Host Microbe*, 2 (2007) 295-305.
- [9] J.R. Buchan, R. Parker, Eukaryotic stress granules : the ins and outs of translation, *Mol Cell*, 36 (2009) 932-941.
- [10] G. Stoecklin, N. Kedersha, Relationship of GW/P-bodies with stress granules, *Adv Exp Med Biol*, 768 (2013) 197-211.
- [11] S. Fulda, A.M. Gorman, O. Hori, A. Samali, Cellular stress responses : cell survival and cell death, *Int J Cell Biol*, 2010 (2010) 214074.
- [12] K.D. Sarge, O.K. Park-Sarge, J.D. Kirby, K.E. Mayo, R.I. Morimoto, Expression of heat shock factor 2 in mouse testis : potential role as a regulator of heat-shock protein gene expression during spermatogenesis, *Biol Reprod*, 50 (1994) 1334-1343.
- [13] U. Feige, W. van Eden, Infection, autoimmunity and autoimmune disease, *EXS*, 77 (1996) 359-373.
- [14] T.E. Dever, L. Feng, R.C. Wek, A.M. Cigan, T.F. Donahue, A.G. Hinnebusch, Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast, *Cell*, 68 (1992) 585-596.
- [15] T. Rzymiski, M. Milani, L. Pike, F. Buffa, H.R. Mellor, L. Winchester, I. Pires, E. Hammond, I. Ragoussis, A.L. Harris, Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia, *Oncogene*, 29 (2010) 4424-4435.
- [16] N. Donnelly, A.M. Gorman, S. Gupta, A. Samali, The eIF2alpha kinases : their structures and functions, *Cell Mol Life Sci*, 70 (2013) 3493-3511.
- [17] D. Ron, Translational control in the endoplasmic reticulum stress response, *J Clin Invest*, 110 (2002) 1383-1388.
- [18] N.L. Kedersha, M. Gupta, W. Li, I. Miller, P. Anderson, RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules, *J Cell Biol*, 147 (1999) 1431-1442.
- [19] C.M. Dewey, B. Cenik, C.F. Sephton, D.R. Dries, P. Mayer, 3 rd, S.K. Good, B.A. Johnson, J. Herz, G. Yu, TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor, *Mol Cell Biol*, 31 (2011) 1098-1108.
- [20] I. Goulet, S. Boisvenue, S. Mokus, R. Mazroui, J. Cote, TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules, *Hum Mol Genet*, 17 (2008) 3055-3074.

- [21] L. Nover, K.D. Scharf, D. Neumann, Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves, *Mol Cell Biol*, 3 (1983) 1648-1655.
- [22] K.K. McDonald, A. Aulas, L. Destroismaisons, S. Pickles, E. Beleac, W. Camu, G.A. Rouleau, C. Vande Velde, TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1, *Hum Mol Genet*, 20 (2011) 1400-1410.
- [23] J. Pothof, N.S. Verkaik, J.H. Hoeijmakers, D.C. van Gent, MicroRNA responses and stress granule formation modulate the DNA damage response, *Cell Cycle*, 8 (2009) 3462-3468.
- [24] S. Kwon, Y. Zhang, P. Matthias, The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response, *Genes Dev*, 21 (2007) 3381-3394.
- [25] J.A. Smith, S.C. Schmechel, A. Raghavan, M. Abelson, C. Reilly, M.G. Katze, R.J. Kaufman, P.R. Bohjanen, L.A. Schiff, Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response, *J Virol*, 80 (2006) 2019-2033.
- [26] A. Aulas, M.M. Fay, S.M. Lyons, C.A. Achorn, N. Kedersha, P. Anderson, P. Ivanov, Stress-specific differences in assembly and composition of stress granules and related foci, *J Cell Sci*, 130 (2017) 927-937.
- [27] N. Kedersha, M.R. Cho, W. Li, P.W. Yacono, S. Chen, N. Gilks, D.E. Golan, P. Anderson, Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules, *J Cell Biol*, 151 (2000) 1257-1268.
- [28] N. Kedersha, P. Anderson, Stress granules : sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability, *Biochem Soc Trans*, 30 (2002) 963-969.
- [29] A. Khong, T. Matheny, S. Jain, S.F. Mitchell, J.R. Wheeler, R. Parker, The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules, *Mol Cell*, 68 (2017) 808-820 e805.
- [30] S. Solomon, Y. Xu, B. Wang, M.D. David, P. Schubert, D. Kennedy, J.W. Schrader, Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha, entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs, *Mol Cell Biol*, 27 (2007) 2324-2342.
- [31] W.J. Kim, S.H. Back, V. Kim, I. Ryu, S.K. Jang, Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions, *Mol Cell Biol*, 25 (2005) 2450-2462.
- [32] N. Gilks, N. Kedersha, M. Ayodele, L. Shen, G. Stoecklin, L.M. Dember, P. Anderson, Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1, *Mol Biol Cell*, 15 (2004) 5383-5398.
- [33] H. Tourriere, K. Chebli, L. Zekri, B. Courselaud, J.M. Blanchard, E. Bertrand, J. Tazi, The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules, *J Cell Biol*, 160 (2003) 823-831.
- [34] O. Moujaber, H. Mahboubi, M. Kodiha, M. Bouttier, K. Bednarz, R. Bakshi, J. White, L. Larose, I. Colmegna, U. Stochaj, Dissecting the molecular mechanisms that impair stress granule formation in aging cells, *Biochim Biophys Acta*, 1864 (2017) 475-486.
- [35] S. Di Marco, A. Cammas, X.J. Lian, E.N. Kovacs, J.F. Ma, D.T. Hall, R. Mazroui, J. Richardson, J. Pelletier, I.E. Gallouzi, The translation inhibitor pateamine A prevents cachexia-induced muscle wasting in mice, *Nat Commun*, 3 (2012) 896.
- [36] H. Mahboubi, R. Barise, U. Stochaj, 5'-AMP-activated protein kinase alpha regulates stress granule biogenesis, *Biochim Biophys Acta*, 1853 (2015) 1725-1737.

- [37] A. Aulas, M.M. Fay, W. Szaflarski, N. Kedersha, P. Anderson, P. Ivanov, Methods to Classify Cytoplasmic Foci as Mammalian Stress Granules, *J Vis Exp*, DOI 10.3791/55656(2017).
- [38] F.M. Boisvert, S. van Koningsbruggen, J. Navascues, A.I. Lamond, The multifunctional nucleolus, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (2007) 574-585.
- [39] N. Wolf, J. Priess, D. Hirsh, Segregation of germline granules in early embryos of *Caenorhabditis elegans*: an electron microscopic analysis, *J Embryol Exp Morphol*, 73 (1983) 297-306.
- [40] C.P. Brangwynne, C.R. Eckmann, D.S. Courson, A. Rybarska, C. Hoege, J. Gharakhani, F. Julicher, A.A. Hyman, Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation, *Science*, 324 (2009) 1729-1732.
- [41] A.A. Hyman, C.A. Weber, F. Julicher, Liquid-liquid phase separation in biology, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30 (2014) 39-58.
- [42] A. Molliex, J. Temirov, J. Lee, M. Coughlin, A.P. Kanagaraj, H.J. Kim, T. Mittag, J.P. Taylor, Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization, *Cell*, 163 (2015) 123-133.
- [43] A. Patel, H.O. Lee, L. Jawerth, S. Maharana, M. Jahnel, M.Y. Hein, S. Stoyanov, J. Mahamid, S. Saha, T.M. Franzmann, A. Pozniakovski, I. Poser, N. Maghelli, L.A. Royer, M. Weigert, E.W. Myers, S. Grill, D. Drechsel, A.A. Hyman, S. Alberti, A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation, *Cell*, 162 (2015) 1066-1077.
- [44] S. Jain, J.R. Wheeler, R.W. Walters, A. Agrawal, A. Barsic, R. Parker, ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure, *Cell*, 164 (2016) 487-498.
- [45] N. Kedersha, G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M.J. Fritzler, D. Scheuner, R.J. Kaufman, D.E. Golan, P. Anderson, Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling, *J Cell Biol*, 169 (2005) 871-884.
- [46] O.V. Galzitskaya, Repeats are one of the main characteristics of RNA-binding proteins with prion-like domains, *Mol Biosyst*, 11 (2015) 2210-2218.
- [47] C. Soncini, I. Berdo, G. Draetta, Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) is a modulator of USP10, a novel human ubiquitin specific protease, *Oncogene*, 20 (2001) 3869-3879.
- [48] N. Kedersha, M.D. Panas, C.A. Achorn, S. Lyons, S. Tisdale, T. Hickman, M. Thomas, J. Lieberman, G.M. McInerney, P. Ivanov, P. Anderson, G3BP-Caprin1-USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits, *J Cell Biol*, 212 (2016) 845-860.
- [49] N. Kedersha, P. Anderson, Regulation of translation by stress granules and processing bodies, *Prog Mol Biol Transl Sci*, 90 (2009) 155-185.
- [50] E.S. Nadezhdina, A.J. Lomakin, A.A. Shpilman, E.M. Chudinova, P.A. Ivanov, Microtubules govern stress granule mobility and dynamics, *Biochim Biophys Acta*, 1803 (2010) 361-371.
- [51] P.A. Ivanov, E.M. Chudinova, E.S. Nadezhdina, Disruption of microtubules inhibits cytoplasmic ribonucleoprotein stress granule formation, *Exp Cell Res*, 290 (2003) 227-233.
- [52] M. Loschi, C.C. Leishman, N. Berardone, G.L. Boccaccio, Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics, *J Cell Sci*, 122 (2009) 3973-3982.

- [53] A. Aulas, G. Caron, C.G. Gkogkas, N.V. Mohamed, L. Destroismaisons, N. Sonenberg, N. Leclerc, J.A. Parker, C. Vande Velde, G3BP1 promotes stress-induced RNA granule interactions to preserve polyadenylated mRNA, *J Cell Biol*, 209 (2015) 73-84.
- [54] J. Tsai, J.T. Lee, W. Wang, J. Zhang, H. Cho, S. Mamo, R. Bremer, S. Gillette, J. Kong, N.K. Haass, K. Sproesser, L. Li, K.S. Smalley, D. Fong, Y.L. Zhu, A. Marimuthu, H. Nguyen, B. Lam, J. Liu, I. Cheung, J. Rice, Y. Suzuki, C. Luu, C. Settachatgul, R. Shellooe, J. Cantwell, S.H. Kim, J. Schlessinger, K.Y. Zhang, B.L. West, B. Powell, G. Habets, C. Zhang, P.N. Ibrahim, P. Hirth, D.R. Artis, M. Herlyn, G. Bollag, Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (2008) 3041-3046.
- [55] J.R. Wheeler, T. Matheny, S. Jain, R. Abrisch, R. Parker, Distinct stages in stress granule assembly and disassembly, *Elife*, 5 (2016).
- [56] S.N. Chan, B.L. Tang, Location and membrane sources for autophagosome formation - from ER-mitochondria contact sites to Golgi-endosome-derived carriers, *Mol Membr Biol*, 30 (2013) 394-402.
- [57] N. Mizushima, [The role of autophagy in quality control inside neural cells], *Rinsho Shinkeigaku*, 46 (2006) 885-886.
- [58] N. Mizushima, T. Hara, Intracellular quality control by autophagy: how does autophagy prevent neurodegeneration?, *Autophagy*, 2 (2006) 302-304.
- [59] A. Mleczak, S. Millar, S.A. Tooze, M.F. Olson, E.Y. Chan, Regulation of autophagosome formation by Rho kinase, *Cell Signal*, 25 (2013) 1-11.
- [60] H. Meyer, M. Bug, S. Bremer, Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system, *Nat Cell Biol*, 14 (2012) 117-123.
- [61] A. Stolz, W. Hilt, A. Buchberger, D.H. Wolf, Cdc48 : a power machine in protein degradation, *Trends Biochem Sci*, 36 (2011) 515-523.
- [62] P. Gonzalez-Perez, E.T. Cirulli, V.E. Drory, R. Dabby, P. Nisipeanu, R.L. Carasso, M. Sadeh, A. Fox, B.W. Festoff, P.C. Sapp, D. McKenna-Yasek, D.B. Goldstein, R.H. Brown, Jr., S.C. Blumen, Novel mutation in VCP gene causes atypical amyotrophic lateral sclerosis, *Neurology*, 79 (2012) 2201-2208.
- [63] J.O. Johnson, J. Mandrioli, M. Benatar, Y. Abramzon, V.M. Van Deerlin, J.Q. Trojanowski, J.R. Gibbs, M. Brunetti, S. Gronka, J. Wu, J. Ding, L. McCluskey, M. Martinez-Lage, D. Falcone, D.G. Hernandez, S. Arepalli, S. Chong, J.C. Schymick, J. Rothstein, F. Landi, Y.D. Wang, A. Calvo, G. Mora, M. Sabatelli, M.R. Monsurro, S. Battistini, F. Salvi, R. Spataro, P. Sola, G. Borghero, I. Consortium, G. Galassi, S.W. Scholz, J.P. Taylor, G. Restagno, A. Chio, B.J. Traynor, Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS, *Neuron*, 68 (2010) 857-864.
- [64] M. Koppers, M.M. van Blitterswijk, L. Vlam, P.A. Rowicka, P.W. van Vught, E.J. Groen, W.G. Spliet, J. Engelen-Lee, H.J. Schelhaas, M. de Visser, A.J. van der Kooi, W.L. van der Pol, R.J. Pasterkamp, J.H. Veldink, L.H. van den Berg, VCP mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Neurobiol Aging*, 33 (2012) 837 e837-813.
- [65] T. Wang, W. Xu, M. Qin, Y. Yang, P. Bao, F. Shen, Z. Zhang, J. Xu, Pathogenic Mutations in the Valosin-containing Protein/p97(VCP) N-domain Inhibit the SUMOylation of VCP and Lead to Impaired Stress Response, *J Biol Chem*, 291 (2016) 14373-14384.
- [66] J.R. Buchan, R.M. Kolaitis, J.P. Taylor, R. Parker, Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function, *Cell*, 153 (2013) 1461-1474.

- [67] M.W. Harding, A. Galat, D.E. Uehling, S.L. Schreiber, A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase, *Nature*, 341 (1989) 758-760.
- [68] S. Paglin, N.Y. Lee, C. Nakar, M. Fitzgerald, J. Plotkin, B. Deuel, N. Hackett, M. McMahon, E. Sphicas, N. Lampen, J. Yahalom, Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells, *Cancer Res*, 65 (2005) 11061-11070.
- [69] T. Fujita, N. Fujino, R. Anan, C. Tei, T. Kubo, Y. Doi, S. Kinugawa, H. Tsutsui, S. Kobayashi, M. Yano, M. Asakura, M. Kitakaze, I. Komuro, T. Konno, K. Hayashi, M.A. Kawashiri, H. Ino, M. Yamagishi, Sarcomere gene mutations are associated with increased cardiovascular events in left ventricular hypertrophy: results from multicenter registration in Japan, *JACC Heart Fail*, 1 (2013) 459-466.
- [70] M. Takahashi, M. Higuchi, H. Matsuki, M. Yoshita, T. Ohsawa, M. Oie, M. Fujii, Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production, *Mol Cell Biol*, 33 (2013) 815-829.
- [71] H.Y. Jiang, S.A. Wek, B.C. McGrath, D. Scheuner, R.J. Kaufman, D.R. Cavener, R.C. Wek, Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses, *Mol Cell Biol*, 23 (2003) 5651-5663.
- [72] J.D. Boyd, P. Lee, M.S. Feiler, N. Zaur, M. Liu, J. Concannon, A. Ebata, B. Wolozin, M.A. Glicksman, A high-content screen identifies novel compounds that inhibit stress-induced TDP-43 cellular aggregation and associated cytotoxicity, *J Biomol Screen*, 19 (2014) 44-56.
- [73] K. Arimoto, H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi, H. Saito, M. Takekawa, Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways, *Nat Cell Biol*, 10 (2008) 1324-1332.
- [74] B.S. Johnson, D. Snead, J.J. Lee, J.M. McCaffery, J. Shorter, A.D. Gitler, TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity, *J Biol Chem*, 284 (2009) 20329-20339.
- [75] A. Hubstenberger, M. Courel, M. Benard, S. Souquere, M. Ernoult-Lange, R. Chouaib, Z. Yi, J.B. Morlot, A. Munier, M. Fradet, M. Daunesse, E. Bertrand, G. Pierron, J. Mozziconacci, M. Kress, D. Weil, P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons, *Mol Cell*, 68 (2017) 144-157 e145.
- [76] A. Aizer, A. Kalo, P. Kafri, A. Shraga, R. Ben-Yishay, A. Jacob, N. Kinor, Y. Shav-Tal, Quantifying mRNA targeting to P-bodies in living human cells reveals their dual role in mRNA decay and storage, *J Cell Sci*, 127 (2014) 4443-4456.
- [77] R. Parker, U. Sheth, P bodies and the control of mRNA translation and degradation, *Mol Cell*, 25 (2007) 635-646.
- [78] P. Anderson, N. Kedersha, RNA granules, *J Cell Biol*, 172 (2006) 803-808.
- [79] E. Zlotorynski, The fates of mRNAs in P bodies, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15 (2014) 632.
- [80] N. Cougot, S. Babajko, B. Seraphin, Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells, *J Cell Biol*, 165 (2004) 31-40.
- [81] M.A. Andrei, D. Ingelfinger, R. Heintzmann, T. Achsel, R. Rivera-Pomar, R. Luhrmann, A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies, *RNA*, 11 (2005) 717-727.

- [82] J.S. Anderson, R.P. Parker, The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex, *EMBO J*, 17 (1998) 1497-1506.
- [83] M. Steiger, A. Carr-Schmid, D.C. Schwartz, M. Kiledjian, R. Parker, Analysis of recombinant yeast decapping enzyme, *RNA*, 9 (2003) 231-238.
- [84] J.R. Buchan, D. Muhlrad, R. Parker, P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol*, 183 (2008) 441-455.
- [85] P. Fafournoux, J. Averous, A. Bruhat, V. Carraro, C. Jousse, A.C. Maurin, F. Mesclon, L. Parry, [Adaptation to the availability of essential amino-acids: role of GCN2/eIF2alpha/ATF4 pathway], *Biol Aujourd'hui*, 209 (2015) 317-323.
- [86] H.Y. Jiang, R.C. Wek, GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation, *Biochem J*, 385 (2005) 371-380.
- [87] S. Anda, R. Zach, B. Grallert, Activation of Gcn2 in response to different stresses, *PLoS One*, 12 (2017) e0182143.
- [88] H.P. Harding, M. Calton, F. Urano, I. Novoa, D. Ron, Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18 (2002) 575-599.
- [89] A. Pindel, A. Sadler, The role of protein kinase R in the interferon response, *J Interferon Cytokine Res*, 31 (2011) 59-70.
- [90] J. Chen, J. Ni, J.Y. Chen, Molecular Cloning of MAPK Gene Family Using Degenerate PCR, *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 32 (2000) 305-311.
- [91] H.X. Deng, H. Zhai, E.H. Bigio, J. Yan, F. Fecto, K. Ajroud, M. Mishra, S. Ajroud-Driss, S. Heller, R. Sufit, N. Siddique, E. Mugnaini, T. Siddique, FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis, *Ann Neurol*, 67 (2010) 739-748.
- [92] O.D. King, A.D. Gitler, J. Shorter, The tip of the iceberg : RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease, *Brain Res*, 1462 (2012) 61-80.
- [93] M. Holcik, N. Sonenberg, Translational control in stress and apoptosis, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (2005) 318-327.
- [94] S.Y. Tan, D. Shigaki, Jean-Martin Charcot (1825-1893) : pathologist who shaped modern neurology, *Singapore Med J*, 48 (2007) 383-384.
- [95] C.J. Harper, E.J. Sorenson, J. Mandrekar, Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Minnesota: a year-long population based study, *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 16 (2015) 520-523.
- [96] A. Chio, A. Calvo, L. Mazzini, R. Cantello, G. Mora, C. Moglia, L. Corrado, S. D'Alfonso, E. Majounie, A. Renton, F. Pisano, I. Ossola, M. Brunetti, B.J. Traynor, G. Restagno, Parals, Extensive genetics of ALS: a population-based study in Italy, *Neurology*, 79 (2012) 1983-1989.
- [97] G. Logroscino, B.J. Traynor, O. Hardiman, A. Chio, D. Mitchell, R.J. Swingler, A. Millul, E. Benn, E. Beghi, Eurals, Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81 (2010) 385-390.
- [98] A. Chio, G. Logroscino, B.J. Traynor, J. Collins, J.C. Simeone, L.A. Goldstein, L.A. White, Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis : a systematic review of the published literature, *Neuroepidemiology*, 41 (2013) 118-130.
- [99] J.H. van den Berg, R. Gomez-Eerland, B. van de Wiel, L. Hulshoff, D. van den Broek, A. Bins, H.L. Tan, J.V. Harper, N.J. Hassan, B.K. Jakobsen, A. Jorritsma, C.U. Blank, T.N. Schumacher, J.B. Haanen, Case Report of a Fatal Serious Adverse Event Upon Administration

- of T Cells Transduced With a MART-1-specific T-cell Receptor, *Mol Ther*, 23 (2015) 1541-1550.
- [100] A. Al-Chalabi, O. Hardiman, The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time, *Nat Rev Neurol*, 9 (2013) 617-628.
- [101] J.J. Sejvar, R.J. Labutta, L.E. Chapman, J.D. Grabenstein, J. Iskander, J.M. Lane, Neurologic adverse events associated with smallpox vaccination in the United States, 2002-2004, *JAMA*, 294 (2005) 2744-2750.
- [102] L.J. Haverkamp, V. Appel, S.H. Appel, Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction, *Brain*, 118 (Pt 3) (1995) 707-719.
- [103] R.B. Forbes, S. Colville, R.J. Swingler, A.L.S.M.N.D.R. Scottish, The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS/MND) in people aged 80 or over, *Age Ageing*, 33 (2004) 131-134.
- [104] M.J. Strong, S. Abrahams, L.H. Goldstein, S. Woolley, P. McLaughlin, J. Snowden, E. Mioshi, A. Roberts-South, M. Benatar, T. HortobaGyi, J. Rosenfeld, V. Silani, P.G. Ince, M.R. Turner, Amyotrophic lateral sclerosis - frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD): Revised diagnostic criteria, *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 18 (2017) 153-174.
- [105] A.C. Calvo, R. Manzano, D.M. Mendonca, M.J. Munoz, P. Zaragoza, R. Osta, Amyotrophic lateral sclerosis : a focus on disease progression, *Biomed Res Int*, 2014 (2014) 925101.
- [106] P.N. Leigh, B.H. Anderton, A. Dodson, J.M. Gallo, M. Swash, D.M. Power, Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease, *Neurosci Lett*, 93 (1988) 197-203.
- [107] L.C. Wijesekera, P.N. Leigh, Amyotrophic lateral sclerosis, *Orphanet J Rare Dis*, 4 (2009) 3.
- [108] V. Bozzoni, O. Pansarasa, L. Diamanti, G. Nosari, C. Cereda, M. Ceroni, Amyotrophic lateral sclerosis and environmental factors, *Funct Neurol*, 31 (2016) 7-19.
- [109] M. Cozzolino, A. Ferri, M.T. Carri, Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications, *Antioxid Redox Signal*, 10 (2008) 405-443.
- [110] L.P. Rowland, N.A. Shneider, Amyotrophic lateral sclerosis, *N Engl J Med*, 344 (2001) 1688-1700.
- [111] F. Gros-Louis, C. Gaspar, G.A. Rouleau, Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Biochim Biophys Acta*, 1762 (2006) 956-972.
- [112] S. Chen, P. Sayana, X. Zhang, W. Le, Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update, *Mol Neurodegener*, 8 (2013) 28.
- [113] W.R. Al Sultan A, Heath P, Kirby J, The genetics of amyotrophic lateral sclerosis : current insights, Dovepress, DOI 10.2147/DNND.S84956(2016).
- [114] J.P. Taylor, R.H. Brown, Jr., D.W. Cleveland, Decoding ALS : from genes to mechanism, *Nature*, 539 (2016) 197-206.
- [115] B. Bakthavachalu, J. Huelsmeier, I.P. Sudhakaran, J. Hillebrand, A. Singh, A. Petrauskas, D. Thiagarajan, M. Sankaranarayanan, L. Mizoue, E.N. Anderson, U.B. Pandey, E. Ross, K. VijayRaghavan, R. Parker, M. Ramaswami, RNP-Granule Assembly via Ataxin-2 Disordered Domains Is Required for Long-Term Memory and Neurodegeneration, *Neuron*, 98 (2018) 754-766 e754.

- [116] J. Higelin, A. Catanese, L.L. Semelink-Sedlacek, S. Oeztuerk, A.K. Lutz, J. Bausinger, G. Barbi, G. Speit, P.M. Andersen, A.C. Ludolph, M. Demestre, T.M. Boeckers, NEK1 loss-of-function mutation induces DNA damage accumulation in ALS patient-derived motoneurons, *Stem Cell Res*, 30 (2018) 150-162.
- [117] A. Pattamatta, J.D. Cleary, L.P.W. Ranum, All in the Family : Repeats and ALS/FTD, *Trends Neurosci*, 41 (2018) 247-250.
- [118] K. Boylan, Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Neurol Clin*, 33 (2015) 807-830.
- [119] A. Al Sultan, Waller, R., Heath, P. & Kirby, J., The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights, *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease* 2016 (6) (2016) pp. 49-64. .
- [120] L. Covarrubias, D. Hernandez-Garcia, D. Schnabel, E. Salas-Vidal, S. Castro-Obregon, Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active?, *Dev Biol*, 320 (2008) 1-11.
- [121] G.O. Fruhwirth, A. Hermetter, Mediation of apoptosis by oxidized phospholipids, *Subcell Biochem*, 49 (2008) 351-367.
- [122] H. Yin, L. Xu, N.A. Porter, Free radical lipid peroxidation : mechanisms and analysis, *Chem Rev*, 111 (2011) 5944-5972.
- [123] R.L. Auten, M.H. Whorton, S. Nicholas Mason, Blocking neutrophil influx reduces DNA damage in hyperoxia-exposed newborn rat lung, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26 (2002) 391-397.
- [124] W.L. Lee, J.Y. Huang, L.F. Shyur, Phytoagents for cancer management : regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms, *Oxid Med Cell Longev*, 2013 (2013) 925804.
- [125] A. Okado-Matsumoto, I. Fridovich, Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria, *J Biol Chem*, 276 (2001) 38388-38393.
- [126] T. Aguirre, L. Van Den Bosch, K. Goetschalckx, P. Tilkin, G. Mathijs, J.J. Cassiman, W. Robberecht, Increased sensitivity of fibroblasts from amyotrophic lateral sclerosis patients to oxidative stress, *Ann Neurol*, 43 (1998) 452-457.
- [127] C. Vande Velde, T.M. Miller, N.R. Cashman, D.W. Cleveland, Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (2008) 4022-4027.
- [128] S. Pickles, L. Destroismaisons, S.L. Peyrard, S. Cadot, G.A. Rouleau, R.H. Brown, Jr., J.P. Julien, N. Arbour, C. Vande Velde, Mitochondrial damage revealed by immunoselection for ALS-linked misfolded SOD1, *Hum Mol Genet*, 22 (2013) 3947-3959.
- [129] D.R. Borchelt, M.K. Lee, H.S. Slunt, M. Guarnieri, Z.S. Xu, P.C. Wong, R.H. Brown, Jr., D.L. Price, S.S. Sisodia, D.W. Cleveland, Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (1994) 8292-8296.
- [130] S. Sasaki, M. Iwata, Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Neurosci Lett*, 204 (1996) 53-56.
- [131] C. Vande Velde, K.K. McDonald, Y. Boukhedimi, M. McAlonis-Downes, C.S. Lobsiger, S. Bel Hadj, A. Zandona, J.P. Julien, S.B. Shah, D.W. Cleveland, Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset, *PLoS One*, 6 (2011) e22031.

- [132] F.R. Wiedemann, K. Winkler, A.V. Kuznetsov, C. Bartels, S. Vielhaber, H. Feistner, W.S. Kunz, Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis, *J Neurol Sci*, 156 (1998) 65-72.
- [133] T. Nakamura, S. Tu, M.W. Akhtar, C.R. Sunico, S. Okamoto, S.A. Lipton, Aberrant protein s-nitrosylation in neurodegenerative diseases, *Neuron*, 78 (2013) 596-614.
- [134] J. Van den Bossche, J. Baardman, N.A. Otto, S. van der Velden, A.E. Neele, S.M. van den Berg, R. Luque-Martin, H.J. Chen, M.C. Boshuizen, M. Ahmed, M.A. Hoeksema, A.F. de Vos, M.P. de Winther, Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages, *Cell Rep*, 17 (2016) 684-696.
- [135] F.A. Chaudhry, K.P. Lehre, M. van Lookeren Campagne, O.P. Ottersen, N.C. Danbolt, J. Storm-Mathisen, Glutamate transporters in glial plasma membranes : highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry, *Neuron*, 15 (1995) 711-720.
- [136] J.D. Rothstein, M. Van Kammen, A.I. Levey, L.J. Martin, R.W. Kuncl, Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis, *Ann Neurol*, 38 (1995) 73-84.
- [137] M. Yanez, L. Galan, J. Matias-Guiu, A. Vela, A. Guerrero, A.G. Garcia, CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients produces glutamate independent death of rat motor brain cortical neurons : protection by resveratrol but not riluzole, *Brain Res*, 1423 (2011) 77-86.
- [138] A. Doble, The pharmacology and mechanism of action of riluzole, *Neurology*, 47 (1996) S233-241.
- [139] U. Bekenstein, H. Soreq, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in health and neurodegenerative disease: from structural insights to post-transcriptional regulatory roles, *Mol Cell Neurosci*, 56 (2013) 436-446.
- [140] C.F. Sephton, A.A. Tang, A. Kulkarni, J. West, M. Brooks, J.J. Stubblefield, Y. Liu, M.Q. Zhang, C.B. Green, K.M. Huber, E.J. Huang, J. Herz, G. Yu, Activity-dependent FUS dysregulation disrupts synaptic homeostasis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (2014) E4769-4778.
- [141] S. Sun, S.C. Ling, J. Qiu, C.P. Albuquerque, Y. Zhou, S. Tokunaga, H. Li, H. Qiu, A. Bui, G.W. Yeo, E.J. Huang, K. Eggan, H. Zhou, X.D. Fu, C. Lagier-Tourenne, D.W. Cleveland, ALS-causative mutations in FUS/TLS confer gain and loss of function by altered association with SMN and U1-snRNP, *Nat Commun*, 6 (2015) 6171.
- [142] E.L. Scotter, H.J. Chen, C.E. Shaw, TDP-43 Proteinopathy and ALS : Insights into Disease Mechanisms and Therapeutic Targets, *Neurotherapeutics*, 12 (2015) 352-363.
- [143] I.R. Mackenzie, M. Neumann, A. Baborie, D.M. Sampathu, D. Du Plessis, E. Jaros, R.H. Perry, J.Q. Trojanowski, D.M. Mann, V.M. Lee, A harmonized classification system for FTL-D-TDP pathology, *Acta Neuropathol*, 122 (2011) 111-113.
- [144] M. Neumann, D.M. Sampathu, L.K. Kwong, A.C. Truax, M.C. Micsenyi, T.T. Chou, J. Bruce, T. Schuck, M. Grossman, C.M. Clark, L.F. McCluskey, B.L. Miller, E. Masliah, I.R. Mackenzie, H. Feldman, W. Feiden, H.A. Kretzschmar, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, *Science*, 314 (2006) 130-133.
- [145] O.M. Peters, M. Ghasemi, R.H. Brown, Jr., Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS, *J Clin Invest*, 125 (2015) 2548.
- [146] Y.R. Li, O.D. King, J. Shorter, A.D. Gitler, Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis, *J Cell Biol*, 201 (2013) 361-372.

- [147] P.J. Shaw, Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76 (2005) 1046-1057.
- [148] O.L. Lopez, M.P. Gonzalez, J.T. Becker, C.F. Reynolds, 3rd, A. Sudilovsky, S.T. DeKosky, Symptoms of depression in Alzheimer's disease, frontal lobe-type dementia, and subcortical dementia, *Ann N Y Acad Sci*, 769 (1995) 389-392.
- [149] S.C. Ling, M. Polymenidou, D.W. Cleveland, Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis, *Neuron*, 79 (2013) 416-438.
- [150] S. Lee, E.J. Huang, Modeling ALS and FTD with iPSC-derived neurons, *Brain Res*, 1656 (2017) 88-97.
- [151] G. Dreyfuss, Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles, *Annu Rev Cell Biol*, 2 (1986) 459-498.
- [152] G. Dreyfuss, M.J. Matunis, S. Pinol-Roma, C.G. Burd, hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA, *Annu Rev Biochem*, 62 (1993) 289-321.
- [153] S.P. Han, Y.H. Tang, R. Smith, Functional diversity of the hnRNPs : past, present and perspectives, *Biochem J*, 430 (2010) 379-392.
- [154] Y.M. Ayala, L. De Conti, S.E. Avendano-Vazquez, A. Dhir, M. Romano, A. D'Ambrogio, J. Tollervey, J. Ule, M. Baralle, E. Buratti, F.E. Baralle, TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop, *EMBO J*, 30 (2011) 277-288.
- [155] P. Anderson, N. Kedersha, Stress granules, *Curr Biol*, 19 (2009) R397-398.
- [156] E. Buratti, F.E. Baralle, Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease, *Front Biosci*, 13 (2008) 867-878.
- [157] A. D'Ambrogio, E. Buratti, C. Stuani, C. Guarnaccia, M. Romano, Y.M. Ayala, F.E. Baralle, Functional mapping of the interaction between TDP-43 and hnRNP A2 in vivo, *Nucleic Acids Res*, 37 (2009) 4116-4126.
- [158] T. Arai, M. Hasegawa, H. Akiyama, K. Ikeda, T. Nonaka, H. Mori, D. Mann, K. Tsuchiya, M. Yoshida, Y. Hashizume, T. Oda, TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, *Biochem Biophys Res Commun*, 351 (2006) 602-611.
- [159] J. Sreedharan, I.P. Blair, V.B. Tripathi, X. Hu, C. Vance, B. Rogelj, S. Ackerley, J.C. Durnall, K.L. Williams, E. Buratti, F. Baralle, J. de Belleruche, J.D. Mitchell, P.N. Leigh, A. Al-Chalabi, C.C. Miller, G. Nicholson, C.E. Shaw, TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Science*, 319 (2008) 1668-1672.
- [160] E. Kabashi, P.N. Valdmanis, P. Dion, D. Spiegelman, B.J. McConkey, C. Vande Velde, J.P. Bouchard, L. Lacomblez, K. Pochigaeva, F. Salachas, P.F. Pradat, W. Camu, V. Meininger, N. Dupre, G.A. Rouleau, TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis, *Nat Genet*, 40 (2008) 572-574.
- [161] I.R. Mackenzie, R. Rademakers, M. Neumann, TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, *Lancet Neurol*, 9 (2010) 995-1007.
- [162] S. Da Cruz, D.W. Cleveland, Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond, *Curr Opin Neurobiol*, 21 (2011) 904-919.
- [163] E. Verstraete, H.B. Kuiperij, M.M. van Blitterswijk, J.H. Veldink, H.J. Schelhaas, L.H. van den Berg, M.M. Verbeek, TDP-43 plasma levels are higher in amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotroph Lateral Scler*, 13 (2012) 446-451.
- [164] M. Suzuki, H. Mikami, T. Watanabe, T. Yamano, T. Yamazaki, M. Nomura, K. Yasui, H. Ishikawa, S. Ono, Increased expression of TDP-43 in the skin of amyotrophic lateral sclerosis, *Acta Neurol Scand*, 122 (2010) 367-372.

- [165] T. Kasai, T. Tokuda, N. Ishigami, H. Sasayama, P. Foulds, D.J. Mitchell, D.M. Mann, D. Allsop, M. Nakagawa, Increased TDP-43 protein in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Acta Neuropathol*, 117 (2009) 55-62.
- [166] A. Koyama, A. Sugai, T. Kato, T. Ishihara, A. Shiga, Y. Toyoshima, M. Koyama, T. Konno, S. Hirokawa, A. Yokoseki, M. Nishizawa, A. Kakita, H. Takahashi, O. Onodera, Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43, *Nucleic Acids Res*, 44 (2016) 5820-5836.
- [167] E.B. Lee, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, Gains or losses : molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration, *Nat Rev Neurosci*, 13 (2011) 38-50.
- [168] J. Jean-Philippe, S. Paz, M. Caputi, hnRNP A1 : the Swiss army knife of gene expression, *Int J Mol Sci*, 14 (2013) 18999-19024.
- [169] M. Buvoli, F. Cobianchi, G. Biamonti, S. Riva, Recombinant hnRNP protein A1 and its N-terminal domain show preferential affinity for oligodeoxynucleotides homologous to intron/exon acceptor sites, *Nucleic Acids Res*, 18 (1990) 6595-6600.
- [170] M.J. Simard, B. Chabot, Control of hnRNP A1 alternative splicing : an intron element represses use of the common 3' splice site, *Mol Cell Biol*, 20 (2000) 7353-7362.
- [171] M. Blanchette, B. Chabot, Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization, *EMBO J*, 18 (1999) 1939-1952.
- [172] D.L. Bentley, Rules of engagement : co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors, *Curr Opin Cell Biol*, 17 (2005) 251-256.
- [173] T. Maniatis, R. Reed, An extensive network of coupling among gene expression machines, *Nature*, 416 (2002) 499-506.
- [174] S. Buratowski, The CTD code, *Nat Struct Biol*, 10 (2003) 679-680.
- [175] N.J. Krogan, M. Kim, A. Tong, A. Golshani, G. Cagney, V. Canadien, D.P. Richards, B.K. Beattie, A. Emili, C. Boone, A. Shilatifard, S. Buratowski, J. Greenblatt, Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II, *Mol Cell Biol*, 23 (2003) 4207-4218.
- [176] N.F. Marshall, D.H. Price, Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation, *J Biol Chem*, 270 (1995) 12335-12338.
- [177] N.F. Marshall, J. Peng, Z. Xie, D.H. Price, Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase, *J Biol Chem*, 271 (1996) 27176-27183.
- [178] S.A. Byers, J.P. Price, J.J. Cooper, Q. Li, D.H. Price, HEXIM2, a HEXIM1-related protein, regulates positive transcription elongation factor b through association with 7SK, *J Biol Chem*, 280 (2005) 16360-16367.
- [179] R. Chen, Z. Yang, Q. Zhou, Phosphorylated positive transcription elongation factor b (P-TEFb) is tagged for inhibition through association with 7SK snRNA, *J Biol Chem*, 279 (2004) 4153-4160.
- [180] Q. Li, J.P. Price, S.A. Byers, D. Cheng, J. Peng, D.H. Price, Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186, *J Biol Chem*, 280 (2005) 28819-28826.
- [181] C. Barrandon, F. Bonnet, V.T. Nguyen, V. Labas, O. Bensaude, The transcription-dependent dissociation of P-TEFb-HEXIM1-7SK RNA relies upon formation of hnRNP-7SK RNA complexes, *Mol Cell Biol*, 27 (2007) 6996-7006.

- [182] B.J. Krueger, C. Jeronimo, B.B. Roy, A. Bouchard, C. Barrandon, S.A. Byers, C.E. Searcey, J.J. Cooper, O. Bensaude, E.A. Cohen, B. Coulombe, D.H. Price, LARP7 is a stable component of the 7SK snRNP while P-TEFb, HEXIM1 and hnRNP A1 are reversibly associated, *Nucleic Acids Res*, 36 (2008) 2219-2229.
- [183] E. Van Herreweghe, S. Egloff, I. Goiffon, B.E. Jady, C. Froment, B. Monsarrat, T. Kiss, Dynamic remodelling of human 7SK snRNP controls the nuclear level of active P-TEFb, *EMBO J*, 26 (2007) 3570-3580.
- [184] B. Lemieux, M. Blanchette, A. Monette, A.J. Mouland, R.J. Wellinger, B. Chabot, A Function for the hnRNP A1/A2 Proteins in Transcription Elongation, *PLoS One*, 10 (2015) e0126654.
- [185] M. Campillos, J.R. Lamas, M.A. Garcia, M.J. Bullido, F. Valdivieso, J. Vazquez, Specific interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 with the -219T allelic form modulates APOE promoter activity, *Nucleic Acids Res*, 31 (2003) 3063-3070.
- [186] H. Chen, M. Hewison, B. Hu, J.S. Adams, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) binding to hormone response elements: a cause of vitamin D resistance, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (2003) 6109-6114.
- [187] D.C. Hay, G.D. Kemp, C. Dargemont, R.T. Hay, Interaction between hnRNPA1 and IkappaBalpha is required for maximal activation of NF-kappaB-dependent transcription, *Mol Cell Biol*, 21 (2001) 3482-3490.
- [188] J.S. Lau, P. Baumeister, E. Kim, B. Roy, T.Y. Hsieh, M. Lai, A.S. Lee, Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as regulators of gene expression through interactions with the human thymidine kinase promoter, *J Cell Biochem*, 79 (2000) 395-406.
- [189] C. Gao, H. Guo, J. Wei, Z. Mi, P.Y. Wai, P.C. Kuo, Identification of S-nitrosylated proteins in endotoxin-stimulated RAW264.7 murine macrophages, *Nitric Oxide*, 12 (2005) 121-126.
- [190] M.P. Smidt, B. Russchen, L. Snippe, J. Wijnholds, G. Ab, Cloning and characterisation of a nuclear, site specific ssDNA binding protein, *Nucleic Acids Res*, 23 (1995) 2389-2395.
- [191] T.T. Zhao, T.E. Graber, L.E. Jordan, M. Cloutier, S.M. Lewis, I. Goulet, J. Cote, M. Holcik, hnRNP A1 regulates UV-induced NF-kappaB signalling through destabilization of cIAP1 mRNA, *Cell Death Differ*, 16 (2009) 244-252.
- [192] M.J. Moore, P.A. Sharp, Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing, *Nature*, 365 (1993) 364-368.
- [193] M.S. Jurica, L.J. Licklider, S.R. Gygi, N. Grigorieff, M.J. Moore, Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis, *RNA*, 8 (2002) 426-439.
- [194] Z. Zhou, L.J. Licklider, S.P. Gygi, R. Reed, Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome, *Nature*, 419 (2002) 182-185.
- [195] E.H. Blackburn, Switching and signaling at the telomere, *Cell*, 106 (2001) 661-673.
- [196] J. Ding, M.K. Hayashi, Y. Zhang, L. Manche, A.R. Krainer, R.M. Xu, Crystal structure of the two-RRM domain of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA, *Genes Dev*, 13 (1999) 1102-1115.
- [197] Q.S. Zhang, L. Manche, R.M. Xu, A.R. Krainer, hnRNP A1 associates with telomere ends and stimulates telomerase activity, *RNA*, 12 (2006) 1116-1128.
- [198] F. Dallaire, S. Dupuis, S. Fiset, B. Chabot, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and UP1 protect mammalian telomeric repeats and modulate telomere replication in vitro, *J Biol Chem*, 275 (2000) 14509-14516.

- [199] Q. Liu, S. Shu, R.R. Wang, F. Liu, B. Cui, X.N. Guo, C.X. Lu, X.G. Li, M.S. Liu, B. Peng, L.Y. Cui, X. Zhang, Whole-exome sequencing identifies a missense mutation in hnRNPA1 in a family with flail arm ALS, *Neurology*, 87 (2016) 1763-1769.
- [200] H.J. Kim, N.C. Kim, Y.D. Wang, E.A. Scarborough, J. Moore, Z. Diaz, K.S. MacLea, B. Freibaum, S. Li, A. Molliex, A.P. Kanagaraj, R. Carter, K.B. Boylan, A.M. Wojtas, R. Rademakers, J.L. Pinkus, S.A. Greenberg, J.Q. Trojanowski, B.J. Traynor, B.N. Smith, S. Topp, A.S. Gkazi, J. Miller, C.E. Shaw, M. Kottlors, J. Kirschner, A. Pestronk, Y.R. Li, A.F. Ford, A.D. Gitler, M. Benatar, O.D. King, V.E. Kimonis, E.D. Ross, C.C. Weihl, J. Shorter, J.P. Taylor, Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS, *Nature*, 495 (2013) 467-473.
- [201] H. Honda, H. Hamasaki, T. Wakamiya, S. Koyama, S.O. Suzuki, N. Fujii, T. Iwaki, Loss of hnRNPA1 in ALS spinal cord motor neurons with TDP-43-positive inclusions, *Neuropathology*, 35 (2015) 37-43.
- [202] Y. Li, M. Collins, J. An, R. Geiser, T. Tegeler, K. Tsantilas, K. Garcia, P. Pirrotte, R. Bowser, Immunoprecipitation and mass spectrometry defines an extensive RBM45 protein-protein interaction network, *Brain Res*, 1647 (2016) 79-93.
- [203] K. Takanashi, A. Yamaguchi, Aggregation of ALS-linked FUS mutant sequesters RNA binding proteins and impairs RNA granules formation, *Biochem Biophys Res Commun*, 452 (2014) 600-607.
- [204] K.M. Gilpin, L. Chang, M.J. Monteiro, ALS-linked mutations in ubiquilin-2 or hnRNPA1 reduce interaction between ubiquilin-2 and hnRNPA1, *Hum Mol Genet*, 24 (2015) 2565-2577.
- [205] J.E. Deshaies, L. Shkreta, A.J. Moczczynski, H. Sidibe, S. Semmler, A. Fouillen, E.R. Bennett, U. Bekenstein, L. Destroismaisons, J. Toutant, Q. Delmotte, K. Volkening, S. Stabile, A. Aulas, Y. Khalfallah, H. Soreq, A. Nanci, M.J. Strong, B. Chabot, C. Vande Velde, TDP-43 regulates the alternative splicing of hnRNP A1 to yield an aggregation-prone variant in amyotrophic lateral sclerosis, *Brain*, DOI 10.1093/brain/awy062(2018).
- [206] T. Ohn, N. Kedersha, T. Hickman, S. Tisdale, P. Anderson, A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly, *Nat Cell Biol*, 10 (2008) 1224-1231.
- [207] D.A. Bosco, N. Lemay, H.K. Ko, H. Zhou, C. Burke, T.J. Kwiatkowski, Jr., P. Sapp, D. McKenna-Yasek, R.H. Brown, Jr., L.J. Hayward, Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules, *Hum Mol Genet*, 19 (2010) 4160-4175.
- [208] E. Bentmann, M. Neumann, S. Tahirovic, R. Rodde, D. Dormann, C. Haass, Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43), *J Biol Chem*, 287 (2012) 23079-23094.
- [209] W.C. Tsai, S. Gayatri, L.C. Reineke, G. Sbardella, M.T. Bedford, R.E. Lloyd, Arginine Demethylation of G3BP1 Promotes Stress Granule Assembly, *J Biol Chem*, 291 (2016) 22671-22685.
- [210] C.G. Burd, M.S. Swanson, M. Grolach, G. Dreyfuss, Primary structures of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, B1, and C2 proteins: a diversity of RNA binding proteins is generated by small peptide inserts, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (1989) 9788-9792.
- [211] H. Kamma, H. Horiguchi, L. Wan, M. Matsui, M. Fujiwara, M. Fujimoto, T. Yazawa, G. Dreyfuss, Molecular characterization of the hnRNP A2/B1 proteins : tissue-specific expression and novel isoforms, *Exp Cell Res*, 246 (1999) 399-411.

- [212] J. Shorter, J.P. Taylor, Disease mutations in the prion-like domains of hnRNPA1 and hnRNPA2/B1 introduce potent steric zippers that drive excess RNP granule assembly, *Rare Dis*, 1 (2013) e25200.
- [213] F.J. Martinez, G.A. Pratt, E.L. Van Nostrand, R. Batra, S.C. Huelga, K. Kapeli, P. Freese, S.J. Chun, K. Ling, C. Gelboin-Burkhart, L. Fijany, H.C. Wang, J.K. Nussbacher, S.M. Broski, H.J. Kim, R. Lardelli, B. Sundararaman, J.P. Donohue, A. Javaherian, J. Lykke-Andersen, S. Finkbeiner, C.F. Bennett, M. Ares, Jr., C.B. Burge, J.P. Taylor, F. Rigo, G.W. Yeo, Protein-RNA Networks Regulated by Normal and ALS-Associated Mutant HNRNPA2B1 in the Nervous System, *Neuron*, 92 (2016) 780-795.
- [214] J.P. Richard, N.J. Maragakis, Induced pluripotent stem cells from ALS patients for disease modeling, *Brain Res*, 1607 (2015) 15-25.
- [215] M. Ramaswami, J.P. Taylor, R. Parker, Altered ribostasis : RNA-protein granules in degenerative disorders, *Cell*, 154 (2013) 727-736.
- [216] S.T. Shi, G.Y. Yu, M.M. Lai, Multiple type A/B heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) can replace hnRNP A1 in mouse hepatitis virus RNA synthesis, *J Virol*, 77 (2003) 10584-10593.
- [217] J.G. O'Rourke, L. Bogdanik, A. Muhammad, T.F. Gendron, K.J. Kim, A. Austin, J. Cady, E.Y. Liu, J. Zarrow, S. Grant, R. Ho, S. Bell, S. Carmona, M. Simpkinson, D. Lall, K. Wu, L. Daugherty, D.W. Dickson, M.B. Harms, L. Petrucelli, E.B. Lee, C.M. Lutz, R.H. Baloh, C9orf72 BAC Transgenic Mice Display Typical Pathologic Features of ALS/FTD, *Neuron*, 88 (2015) 892-901.
- [218] V. Swarup, J.P. Julien, ALS pathogenesis : recent insights from genetics and mouse models, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35 (2011) 363-369.
- [219] V. Swarup, D. Phaneuf, C. Bareil, J. Robertson, G.A. Rouleau, J. Kriz, J.P. Julien, Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments, *Brain*, 134 (2011) 2610-2626.
- [220] C. Lutz, Mouse models of ALS : Past, present and future, *Brain Res*, DOI 10.1016/j.brainres.2018.03.024(2018).

Annexe

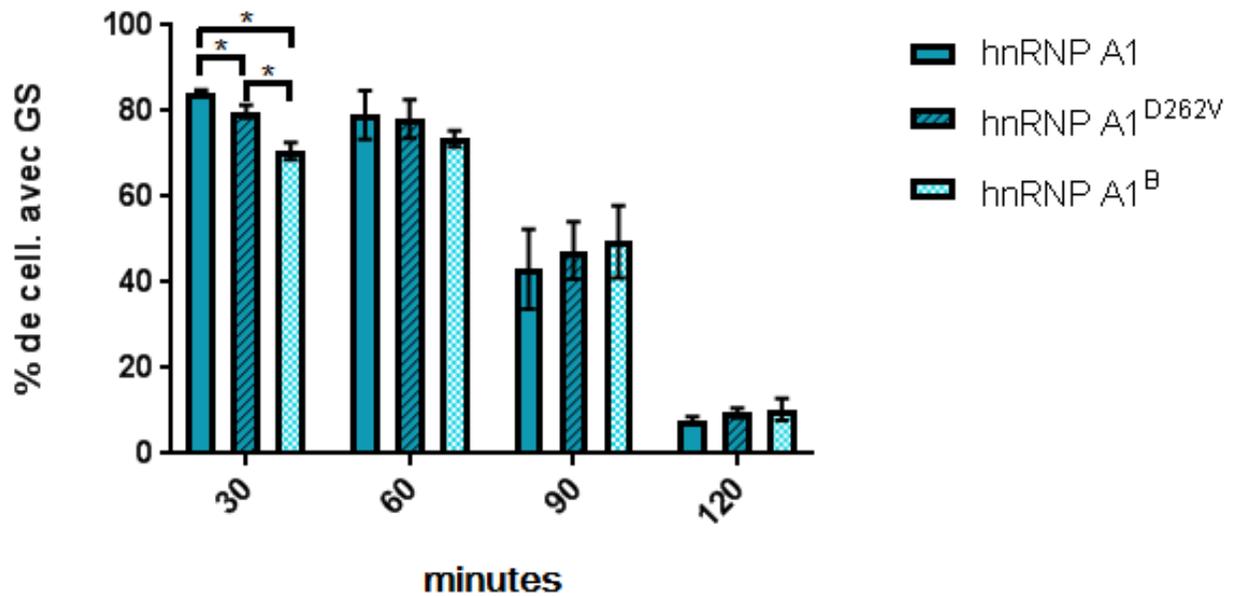


Figure S1. Représentation de la cinétique des granules de stress. Les cellules HeLa, stressées, ont été transfectées avec les l'ADNc et leur rapporteur Myc indiqué. Quantification du % de cellules transfectées qui ont des GS. La moyenne de trois expérimentations indépendantes \pm SEM a été mis en graphiques. * $p < 0,05$

