

Université de Montréal

**TDP-43 régule la dynamique et la fonction des
Granules de Stress via G3BP1**

par

Anaïs Aulas

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Biochimie

Décembre 2014

© Anaïs Aulas, 2014

Université de Montréal

Cette thèse intitulée:

**TDP-43 régule la dynamique et la fonction des
Granules de Stress via G3BP1**

Présentée par

Anaïs Aulas

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Éric Lécuyer, Président rapporteur

Christine Vande Velde, Directrice de recherche

Richard Robitaille, Membre du jury

Craig McCormick, Examineur externe

Jean-Claude Labbé, Représentant du doyen

Résumé

Les Granule de Stress (GS) sont des inclusions cytoplasmiques contenant des protéines et des ARNm qui s'assemblent en réponse à l'exposition à un stress. Leur formation fait partie intégrante de la réponse cellulaire au stress et est considérée comme une étape déterminante pour la résistance au stress et la survie cellulaire. Actuellement, les GS sont reliés à divers pathologies allant des infections virales aux maladies neurovégétatives. L'une d'entre elle, la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est particulièrement agressive, caractérisée par une perte des neurones moteurs aboutissant à la paralysie et à la mort du patient en cinq ans en moyenne. Les mécanismes de déclenchement de la pathologie restent encore à déterminer. TDP-43 (TAR DNA binding protein 43) et FUS (Fused in liposarcoma) sont deux protéines reliées à la pathologie qui présentent des similarités de structure et de fonction, suggérant un mécanisme commun de toxicité. TDP-43 et FUS sont toutes les deux recrutées au niveau des GS en condition de stress.

Nous avons démontré pour la première fois que la fonction des GS est de protéger les ARNm de la dégradation induite par l'exposition au stress. Cette fonction n'était que suspectée jusqu'alors. De plus nous avons mis en évidence que G3BP1 (Ras GTPase-activating protein-binding protein 1) est l'effectrice de cette fonction via son implication dans la dynamique de formation des GS. TDP-43 étant un régulateur de G3BP1, nous prouvons ainsi que la perte de fonction de TDP-43/G3BP1 aboutit à un défaut de réponse au stress aboutissant à une vulnérabilisation cellulaire. Le mécanisme de toxicité emprunter par FUS diffère de celui de TDP-43 et ne semble pas passer par une perte de fonction dans le cadre de la réponse au stress.

Mots-clés : TDP-43, G3BP1, FUS, Granule de Stress, P-Body, Sclérose Latérale Amyotrophique, ARNm, Réponse au stress

Abstract

Stress Granule (SGs) are cytoplasmic inclusions sequestering proteins and mRNAs following a stress exposure. Their assembly is part of the cell stress response and is considered an important step for stress resistance and cell survival. SG are currently linked to different pathogenesis from viral infection to neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS). ALS is an aggressive disease, characterized by neuronal death leading to paralysis and death within five years. Pathogenesis mechanisms are still not fully understood. TDP-43 (TAR DNA binding protein 43) and FUS (Fused in liposarcoma) are two proteins linked to the disease that share many structural features and functions suggesting a common toxicity mechanism. TDP-43 and FUS are both recruited to SGs in stress conditions.

We demonstrate for the first time that SGs function to protect mRNA from degradation induced after stress exposure, a function that was only suspected until now. We also prove that G3BP1 (Ras GTPase-activating protein-binding protein 1) is the effector of this function via its implication in the dynamics of SG formation. As TDP-43 is a regulator of G3BP1, we prove that loss of TDP-43/G3BP1 function leads to a stress response defect yielding increased cellular vulnerability. Furthermore, we have discovered that the mechanism of toxicity for FUS is different from TDP-43, and does not implicate a loss of function mechanism during the cell stress response.

Keywords : TDP-43, G3BP1, FUS, Stress Granule, P-Body, Amyotrophic Lateral Sclerosis, mRNA, Stress response

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Remerciements.....	xi
Introduction.....	1
1. La réponse cellulaire au stress	1
1.1. Découverte	1
1.2. Les Granules de Stress	3
1.2.1. Généralités	3
1.2.2. Définition	4
1.2.3. Composition protéique.....	4
1.2.4. Modifications post-traductionnelles.....	6
1.2.4.1. Phosphorylation	6
1.2.4.2. Méthylation.....	7
1.2.4.3. Autres modifications post-traductionnelles	8
1.2.5. La formation de GS et la survie cellulaire	9
1.2.6. Granules de Stress dans un organisme complet.....	9
1.2.7. Cinétique de formation des GS.....	10
1.2.7.1. Assemblage des GS.....	10
1.2.7.2. Désassemblage des GS	12
1.2.8. Les GS et les ARNm.....	14
1.3. Processing Bodies	14
1.3.1. Découvertes / généralités	14
1.3.2. Formation / inhibition	16
1.3.3. La dégradation des ARNm dans les PB.....	16
1.3.4. Interaction entre les PB et les GS	17

1.4.	Implication des microtubules dans l'assemblage des GS et des PB	18
1.5.	La réponse au stress dans un contexte pathologique	19
1.5.1.	Infections virales.....	19
1.5.2.	Cancers.....	20
1.5.3.	Maladies neurodégénératives.....	21
2.	La Sclérose Latérale Amyotrophique	22
2.1.	Les maladies neurodégénératives, généralités	22
2.2.	Dénominations	23
2.3.	La SLA en quelques chiffres.....	24
2.4.	Quel(s) élément(s) déclenche(nt) la pathologie ?	25
2.5.	Diagnostic	25
2.6.	Lien avec la Démence Fronto-Temporale.....	27
2.6.1.	Des cas communs Sclérose Latérale Amyotrophique et Démence Fronto-Temporale	27
2.6.2.	Les inclusions pathologiques	27
2.6.3.	Les causes de la pathologie.....	28
2.6.3.1.	TDP-43 ; généralités	29
2.6.3.2.	FUS ; généralités.....	30
3.	TDP-43 et FUS	30
3.1.	Les modèles d'étude	30
3.1.1.	TDP-43.....	31
3.1.1.1.	Modèles de surexpression.....	31
3.1.1.2.	Modèles de déplétion de TDP-43	33
3.1.2.	FUS	34
3.1.2.1.	Modèles de surexpression.....	34
3.1.2.2.	Modèles de déplétion	35
3.1.3.	Les modèles cellulaires.....	36
3.2.	TDP-43 & FUS : Propriétés générales.....	36
3.2.1.	Structure et localisation.....	36
3.2.2.	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP).....	38
3.2.3.	Autorégulation	39

3.2.4.	Liaison aux acides nucléiques.....	40
3.2.5.	L'épissage	42
3.2.6.	Stabilité des ARNm	44
3.2.7.	Transcription.....	44
3.2.8.	Drosha et les microARN.....	46
3.2.9.	Recrutement de TDP-43 et de FUS au niveau des GS.....	47
3.2.9.1.	Recrutement des protéines endogènes	47
3.2.9.2.	Les mutants et la réponse au stress	49
4.	Introduction de l'étude.....	51
	Aulas <i>et al</i> ,	53
	« Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP ».....	53
	Molecular Neurodegeneration 2012	53
	Aulas <i>et al</i> ,	69
	“A functional interaction between stress granules and processing bodies is defined by G3BP1”	69
	soumis à Nature Communication.....	69
	Discussion.....	117
1.	G3BP1 régule la dynamique et la fonction des GS.....	117
1.1.	TDP-43 est un régulateur de l'expression de TIA-1 et de G3BP1	117
1.2.	TDP-43 et G3BP1 régule la cinétique de formation et de désassemblage des GS 118	
1.3.	TDP-43 régule l'agrégation secondaire via G3BP1.....	119
1.4.	L'agrégation secondaire est déterminante pour la fonction de préservation des ARNm pendant l'exposition au stress.....	120
1.5.	TDP-43 régule aussi l'interaction entre GS et PB via G3BP1.....	121
1.6.	G3BP1 essentielle à la survie cellulaire après stress dans les cellules de type neuronal.....	123
2.	La perte de fonction de FUS n'agit ni sur la formation ni sur la fonction des GS	124
2.1.	La déplétion de FUS n'entrave pas la formation des GS.....	124
2.2.	La déplétion de FUS n'altère pas la fonction des GS	125
2.3.	Mécanisme potentiel de toxicité de FUS	126

3.	Dérégulation du niveau d'ARNm et traduction	126
4.	Implications des microtubules ?.....	128
4.1.	La déplétion de TDP-43 ne perturbe pas le réseau de microtubule	128
4.2.	Lien fonctionnel entre TDP-43 et les protéines motrices et adaptatrices	128
5.	Inclusions pathologiques / granules d'ARNm	129
5.1.	Co-localisation avec des marqueurs des GS	129
5.2.	Manque d'évidence de « non désassemblage »	131
5.3.	Stress chronique et formation d'inclusions positives pour TDP-43	132
5.4.	Définition de Granule de Stress / agrégat non-spécifique	133
	Bibliographie.....	138
	Annexe 1 : TDP-43 lie l'ARNm de G3BP1 mais pas celui de TIA-1.	i
	Annexe 2 : L'absence de G3BP1 induit un retard dans l'assemblage des GS et un désassemblage accéléré.....	ii
	Annexe 3 : La déplétion de FUS n'a aucun impact sur la cinétique de formation des GS.....	iii
	Annexe 4 : La déplétion de TDP-43 ne semble pas affecter le réseau de microtubule	iv
	Annexe 5 : Le rôle de la méthylation dans le désassemblage des GS.	v
	Annexe 6 : Détermination du niveau d'expression de certains marqueurs des GS dans différentes lignées cellulaires.....	viii
	Toutes les cellules n'ont pas forcément la même faculté à répondre à l'exposition au stress. Nous nous sommes demandé si cette différence de réponse pouvait être attribuée au niveau d'expression de certaines protéines recrutée au niveau des GS. Nous avons ainsi étudié l'expression de TDP-43, FUS, G3BP, TIA-1, HuR, eIF3a, eIF4g et HSP70 dans différentes lignées cellulaires humaines (HeLa, SK-N-SH), murine (NIH 3T3, U251) et en lignées primaires de souris (astrocyte et fibroblastes).	
	Annexe 7 : Protéine recrutées au GS en culture primaire de neurones.....	x
	Annexe 8 : Protéine recrutées au GS	xii

Liste des tableaux

Tableau 1 : Localisation de TDP-43 aux Granules de Stress

Tableau 2 : Localisation de FUS aux Granules de Stress

Tableau 3 : Récapitulatif des marqueurs des GS et PB retrouvés dans les inclusions pathologiques

Tableaux 4 : Protéines recrutées au niveau des GS (Annexe 8)

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1 : Formant des GS en réponse à l'exposition cellulaire au stress

Figure 2 : Diagramme représentatif de protéines étant recrutées au niveau des GS

Figure 3 : Cinétique de formation / désassemblage des GS

Figure 4 : Les GS et les PB sont des sites de triage des ARNm

Figure 5 : La Sclérose Latérale Amyotrophique; symptômes

Figure 6 : Lien clinique et génétiques entre la SLA et la DFT

Figure 7 : Structure protéique de TDP-43 et de FUS

Schéma 1 : Modèle récapitulatif

ANNEXES

Figure 8 : TDP-43 lie l'ARNm de G3BP1 mais pas celui de TIA-1

Figure 9 : L'absence de G3BP1 induit un retard dans l'assemblage des GS et un désassemblage accéléré

Figure 10 : L'absence de FUS n'a pas d'effet sur l'assemblage des GS

Figure 11 : La déplétion de TDP-43 ne semble pas affecter le réseau de microtubules

Figure 12 : Rôle de la méthylation de HSP70 dans le maintien des GS

Figure 13 : Les marqueurs des GS ne présentent pas le même niveau d'expression en fonction du type cellulaire étudié

Figure 14 : Protéines recrutées au niveau des GS en culture primaire de neurones corticaux

*A mes grands-parents qui ne sont plus là pour
voir que j'y suis arrivé!*

Remerciements

Alors, ça y est ! J'y suis ! Je fini mon doc ! Je pense que tout le monde sera d'accord avec moi pour dire qu'on ne finit pas son PhD sans l'aide de son entourage. Alors je me lance... Promis je vais essayer d'être brève et concise.

Premièrement, je voudrais remercier Christine, ma directrice de recherche (bizarre de le dire en Français, je ne sais pas pourquoi). Tout d'abord parce que tu as cru en mon CV de Française championne de France de tir à l'arc. Ensuite parce que tu m'as poussé à donner le meilleur de moi-même, même si je t'en ai parfois voulu. Merci aussi de m'avoir permis d'assister à de prestigieux congrès dans des destinations qui resteront gravés dans ma mémoire (mais attention ce n'était que pour le travail, bien entendu) ! Et merci de m'avoir fait confiance dans mon projet !

Ensuite je voudrais remercier les membres du labo. Sarah Peyrard et Laurie, nos deux fantastiques techniciennes de choc. Karli, pour avoir initié ce projet. Sarah Pickles, si seulement je pouvais avoir un quart de ta maîtrise de soi. Stéphanie, qui m'a secondé pour mon premier papier. Guillaume, pour ton caractère facile à vivre et pour ton aide pour mon deuxième papier. Yousra pour ta bonne humeur et Sabrina ma « bench-mate » pendant quelque mois... Merci encore à Laurie et Guillaume pour le futures reviews de mon deuxième papier.

Je ne peux pas passer à côté de mes collègues du « lab next door » (qui n'est plus « next door » d'ailleurs depuis le nouveau CHUM). Merci à vous Alex (la brune) et Arnaud (A³) pour tous ces moments de complicité que je n'oublierais pas. Alex, pour nos séances de « Gossips » transatlantiques. Arnaud, pour mon joli surnom et pour tout l'apprentissage du ver. J'ai essayé d'être une bonne élève ! Merci à Alex Parker de m'avoir « adopté » un temps dans son lab pour faire du ver !

Merci à Janet, pour ton aide précieuse. Sans toi je n'aurais peut-être pas sympathisé aussi facilement avec mon ami le confocal. Merci à Guillaume qui a pris la relève au nouveau CHUM. Merci aussi aux membres de mon comité de thèse pour m'avoir botté les fesses la première année, et mon comité de prédoc pour leurs remarques constructives. Merci à tous les

labos voisins Rouleau, Prat, Arbour, Leclerc qui m'ont dépanné au besoin. Un grand merci spécial à Vi et Nicole pour les neurones corticaux !!!

Parce que pendant la thèse le moral a ses hauts et ses bas, merci, en plus de ceux que j'ai déjà cités, à Alex (la blonde), Vi, Fred, Martine, Simon, Max, Kathleen, Catherine, Loïc, Marc-André, Déborah, le labo de biomatériaux ; Marion, Audrey, Matthieu pour tous les moments passés en dehors du labo « juste pour une bière »... Merci à toi, Farah, ancienne coloc, confidente, amie, sœur de cœur pour ton soutien, ton écoute et bien plus encore...

Papa, Maman, Issou, je sais que ça a été aussi dur pour vous, mais merci de d'avoir soutenu la fille de 22 ans qui voulait partir faire son Doc à Montréal en 2009. Merci d'avoir continué pendant 5 ans. Merci d'avoir répondu présents à chaque fois que j'en ai eu besoin. Merci de m'avoir accueilli à chacun de mes retours en France avec les mets bien de chez nous qui me manquent tant ici... Bon les kilos en plus, c'est bonus ! Ne perdez surtout pas cette habitude quand je serai à Boston !

Merci à la boulangerie « Chez Fred » dont l'accueil et les croissants m'ont aidé dans la motivation d'écrire ma thèse. Merci à tous ceux qui ont participé à la relecture de mon prédoc, mes papiers et mon mémoire...

Merci à vous tous avec qui j'ai passé de si bons moments à Montréal. Merci d'avoir écouté la plainte de la française chialeuse à maintes reprises, pour les délires, les rires, les confidences, les célébrations et j'en passe... Voilà, maintenant, j'en ai les larmes aux yeux...

MERCI!

Introduction

1. La réponse cellulaire au stress

1.1. Découverte

La réponse cellulaire au stress (RCS) est un terme général désignant les réactions d'un organisme face à une exposition à des conditions modifiant son homéostasie cellulaire. Le stress peut prendre différentes formes : thermique, osmotique, chimique, exposition aux UV, aux agents chimio-thérapeutiques, infection virale, etc... En fonction de la force du stress rencontré par la cellule, celle-ci va déclencher une RCS afin d'éliminer les dommages engendrés par l'exposition au stress, et/ou entrer en apoptose. De nombreux mécanismes sont mis en place par la cellule lors de la RCS et ils sont grandement conservés au cours de l'évolution [1, 2].

La « Cell Stress Society International », considère Ferruccio Ritossa (1936-2014) comme le premier scientifique à avoir observé une RCS. En 1962 il découvre la réponse cellulaire au choc thermique en plaçant des drosophiles à 30 °C et observant des changements au niveau des « boucles chromosomiques » [3, 4]. Quelques années après, Alfred Tissières confirme ces travaux et lie l'apparition de ces boucles chromosomiques à la synthèse de nouvelles protéines [5]. Aujourd'hui, ces protéines sont bien connues comme étant les « Heat Shock Proteins » (protéines de choc thermique), HSP, et sont regroupées en sous-famille de 110, 90, 70, 40 et 15-30 KDa. Elles ont été conservées au cours de l'évolution, démontrant leur importance dans la survie des organismes [2].

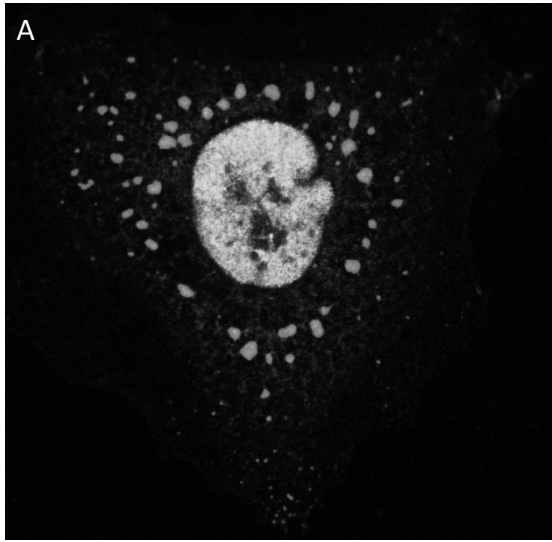
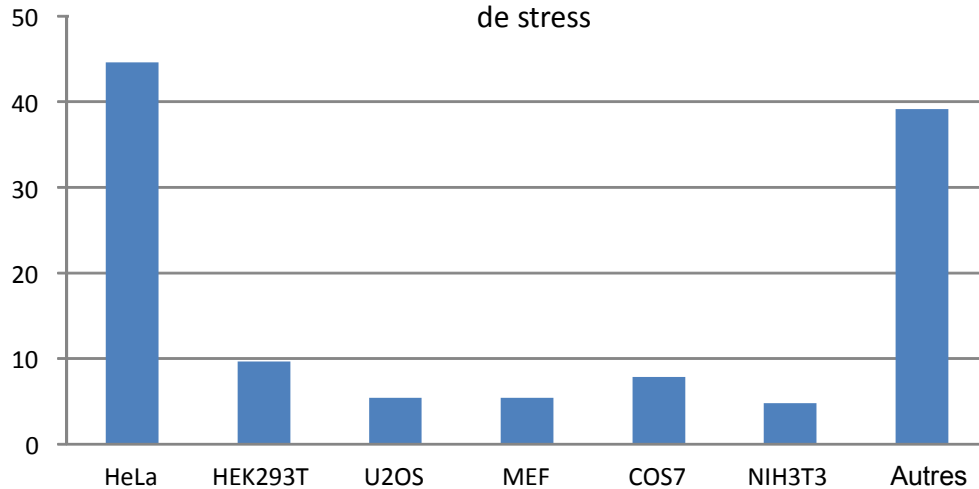


Figure 1: Formation de GS en réponse à l'exposition cellulaire à un stress.

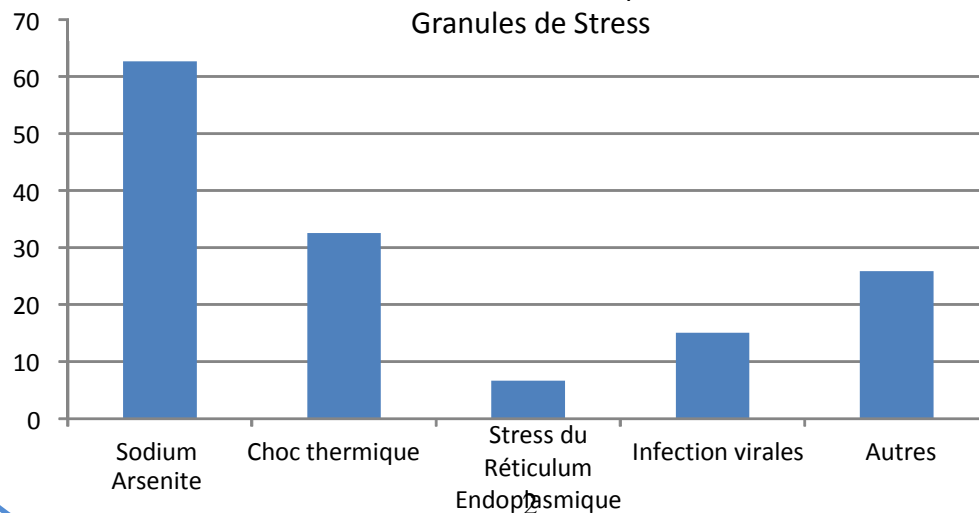
(A) Une cellule HeLa soumise à un stress 0,5 mM de Sodium arsenite pendant 30 min. Les marqueurs utilisés sont TIA-1, G3BP et TDP-43. La superposition des images a été mise en noir et blanc pour un effet plus esthétique (Aulas et al., mol neurodegener. 2012, image de couverture modifiée).

(B & C) 150 publications portant sur l'étude des GS entre 1999 et 2014 ont été analysées. (B) Histogramme représentant les types cellulaires employés. (C) Histogramme représentant les stress employés. Sur les 150 publications étudiées, 35 % utilisent plusieurs stress cellulaires et 13 % utilisent plusieurs lignées cellulaires.

B Lignées cellulaires utilisées dans les études portant sur les Granules de stress



C Stress utilisés dans les études portant sur les Granules de Stress



En 1983, l'équipe de Neumann observe, elle aussi, une induction de l'expression de protéines HSP jusqu'à cinq fois le niveau basal en exposant des plants de *Lycopersicon Peruvianum* (tomate du Pérou) à un choc thermique à 39 °C pendant 2 h. De plus, ils observent l'apparition d'inclusions cytoplasmiques qui disparaissent lorsque les plantes sont remises à une température basale de 25 °C. Les auteurs choisissent alors de nommer ces inclusions « heat shock granules » (HSG). Ainsi la première observation de ce qui est aujourd'hui appelé « granule de stress » (GS) fut répertoriée dans la littérature [6]. Il faudra toutefois attendre 1999 pour que la notion de « Granule de Stress » voit le jour [7].

1.2. Les Granules de Stress

1.2.1. Généralités

La formation des granules de stress (GS) n'est pas une réponse réservée uniquement à l'exposition à des températures élevées. La littérature atteste que les stress osmotique [8, 9], oxydatif [7, 10, 11], du Réticulum Endoplasmique (RE) [12, 13], certaines infections virales [14, 15], l'inhibition du protéasome [16-18], certains stress mitochondriaux [19, 20], l'inhibition de l'initiation de la traduction [21, 22], l'exposition au UV [23, 24], au chlorure de cadmium [25], certains traitements anti-cancéreux [22, 26], traitements antifongiques [27, 28], vont tous induire la formation de « foci » cytoplasmiques regroupés sous le terme de « Granule de Stress » (*Figure 1A-B, Annexe 1/Tableau 4*). Cette réponse au stress est observée dans divers types cellulaires, que ce soit des cellules primaires ou des lignées immortalisées (*Figure 1C, Annexe 1/Tableau 4*). Cependant, il reste à noter que la plupart de ces études sont faites en cellules de type HeLa (45 % des publications analysées) et utilisent le stress oxydatif par arsénite de sodium (SA) (63 % des publications analysées) ou un stress thermique (33 %

des publications analysées) (Annexe 6, tableaux 4). A l'inverse, l'inhibition de l'ARN polymérase, l'utilisation d'agents déstabilisateurs des microtubules ou des microfilaments d'actine, l'exposition à des cytokines inflammatoire ou encore l'absence de nutriment dans le milieu de culture n'entraînent pas la formation de GS en cellule de mammifère [7].

1.2.2. Définition

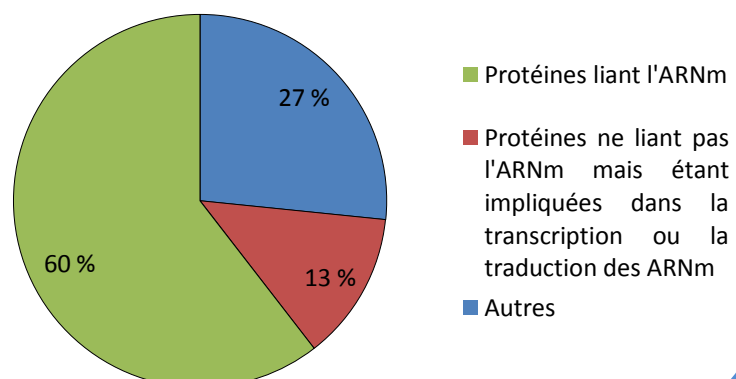
La première définition des GS présente dans la littérature les définit comme (1) des « *foci* » cytoplasmiques, (2) contenant des ARN polyadénylés, (3) des petites sous-unités ribosomales, (4) les facteurs d'initiation de la traduction eIF3, eIF4E, eIF4G et (5) les protéines liant l'ARN TIA-1, HuR, PABP, TTP, (6) formés à la suite de la phosphorylation de eIF2 α , (7) formant de nombreuses inclusions qui fusionnent au cours du temps et se désassemblent une fois le stress résolu, (8) dont la formation est inhibée par le traitement au Cycloheximide [7]. Depuis, le nombre de protéines recrutées au GS connues a considérablement augmenté.

1.2.3. Composition protéique

Les GS sont des inclusions extrêmement labiles, non délimitées par une membrane, dont les constituants protéiques sont en constant échange avec le cytoplasme [29-33]. De ce

Figure 2: Diagramme représentatifs des protéines étant recrutées au niveau des Granule de Stress.

Analyse des protéines recrutées au niveau des Granules de Stress dans 150 publications parues entre 1999 et 2014 en cellules de mammifères.



fait aucune technique n'est actuellement publiée sur la purification ces structures. Actuellement, une approche par protéines candidates est utilisée pour déterminer la composition des GS. Une analyse approfondie de la littérature (150 publications, publiées entre 1999 et 2014) nous apprend que 60 % des protéines recrutées au niveau de GS connues lient l'ARNm (*Figure 2, Annexe 1/Tableau 4*) et seulement 27 % ne lient pas l'ARNm et ne sont impliquées ni dans la transcription ni dans la traduction des ARNm.

Les GS contiennent à la fois des facteurs d'initiation de la traduction comme les eIF3, eIF4, eIF5 (Elongation Initiation Factor 3 – 5) [34, 35], des petites sous unités ribosomales (S3, S6, S18, S19) [12, 34, 36] et un grand nombre de protéines liant l'ARNm. Parmi ces dernières sont retrouvés les facteurs les plus communément utilisés pour suivre les GS, TIA1 (T-cell-restricted intracellular antigen-1) et G3BP1 (GAP SH3 domain-binding protein 1) [37, 38]. La surexpression de ces deux facteurs induit la formation spontanée d'inclusions (souvent appelées « GS constitutifs » dans la littérature) [37-39]. Ces deux protéines possèdent des domaines riches en glycine ou des domaines semblables au prion qui sont à l'origine de leur capacité d'assemblage des GS [30, 37, 38]. Si TIA-1 a longtemps été au cœur de la recherche sur les GS, actuellement, G3BP1 commence à retenir l'attention des chercheurs dans le domaine.

Dès la première publication G3BP1 a été décrite comme une protéine nucléaire liant l'ARN préférentiellement dans le cerveau [40, 41]. Elle est d'ailleurs impliquée dans la dégradation des ARNm via son activité d'endonucléase induite par la phosphorylation de la sérine 149 [42, 43]. Cette même phosphorylation inhibe la formation de GS [37]. De plus, dans le cadre de l'infection par le poliovirus, G3BP1 est clivée par une protéase virale et de ce

fait les GS formés sont plus petits comparés à ceux induit via l'exposition à un choc thermique [44, 45]. Dans les MEF invalidés pour G3BP1, quand ils se forment, les GS sont plus petits, moins abondants et moins bien définis [46]. Toutes ces données indiquent que G3BP1 est aussi une protéine essentielle dans la dynamique de formation des GS. De surcroit, les animaux invalidés pour le gène *G3BP1* meurent à l'état embryonnaires à cause d'une perte massive de neurones dans le système nerveux central ouvrant une nouvelle perspective sur l'implication possible de G3BP1 dans la réponse au stress [41, 47]. Il existe aussi une autre isoforme de la protéine appelée G3BP2. Elle est aussi recrutée au niveau des GS et elle pourrait partiellement compenser la perte de G3BP1. De plus amples investigations seront nécessaires afin de définir clairement son rôle [48, 49].

1.2.4. Modifications post-traductionnelles

La régulation des GS par les modifications post-traductionnelles est encore un thème peu décrit dans la littérature. Généralement, ces modifications vont avoir un effet sur le recrutement protéique et ainsi avoir un effet sur l'assemblage/désassemblage [50].

1.2.4.1. Phosphorylation

La phosphorylation d'eIF2 α sur la sérine 51 est la phosphorylation majeure reliée au GS. Comme mentionné précédemment, elle induit l'inhibition du complexe ternaire eIF2 α -GTP-tRNA_i^{Met} et la formation des GS [7]. Les kinases associées à cette phosphorylation sont au nombre de quatre ; PKR, PERK, GCN2 et HRI. Elles sont activées en réponse à des stimulations par des stress de natures différentes [50, 51].

Cependant, il ne s'agit pas de la seule phosphorylation ayant un impact sur les GS. G3BP1 et HuR, connus comme des marqueurs des GS et qui sont des plus couramment utilisés dans la littérature, vont aussi être sujettes à la phosphorylation. Pour G3BP1, c'est en fait sa déphosphorylation au niveau de la sérine 149 qui marque une étape importante pour son recrutement dans les GS [37], qui permet alors une interaction avec HDAC6, un autre résident des GS [24, 37]. Par ailleurs, la phosphorylation de HuR via JAK3 aboutit, également, à une inhibition de la formation des GS. De plus, cette modification post-traductionnelle s'accompagne de la perte d'interaction avec ses ARNm cibles entraînant leur dégradation prématurée [52]. Ainsi la phosphorylation de ces deux protéines aboutit à un défaut de formation des GS et une accélération de la dégradation de leur ARNm cibles [42, 43, 52]. Dans le même ordre d'idée, l'activation de la kinase FAK, va induire son interaction avec la protéine Grb7 et ainsi aboutir au désassemblage des GS comme mentionné ci-dessus [53]. Il s'agit ici uniquement d'un aperçu de l'impact de la phosphorylation sur la dynamique des GS.

1.2.4.2. Méthylation

Le rôle de la méthylation dans la dynamique des GS a été mis en évidence grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de la méthylation comme l'Adénosine Dialdéhyde (AdOx). Le traitement par l'AdOx empêche le recrutement de protéines liant l'ARNm comme TIAR (TIA-1 related protein) au GS en réponse au SA, potentiellement via l'inhibition de leur export nucléaire [54]. Ainsi ce traitement va induire une augmentation du nombre de cellules arborant des GS [55]. Le prétraitement des cellules par l'inhibiteur de la méthylation 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA) avant exposition au SA, induit une modification de la composition protéique des GS et entraîne un retard dans le désassemblage de ces derniers [9].

La méthylation a aussi été reliée au recrutement de certains facteurs impliqués dans l'assemblage des GS comme TDRD3 (Tudor domain-containing protein 3) au niveau des GS [9]. L'impact de la méthylation sur les GS ne semble pas se limiter à ces protéines : en effet, l'équipe du Dr. Denman présente 14 protéines dont la méthylation semble affecter la composition de GS [56]. Bien que la méthylation semble avoir un rôle dans la dynamique des GS, peu d'études ont été réalisées à ce jour sur ce thème.

1.2.4.3. Autres modifications post-traductionnelles

D'autres modifications post-traductionnelles ont été reliées à la dynamique des GS. Alors que le transfert d'un groupement O-GlcNac (O-N-acétylglucosaminylation) est activé lors de l'exposition au stress, cette modification post-traductionnelle a été démontrée comme activatrice de la formation des GS [28]. La sumoylation (addition de protéine(s) SUMO par liaison covalente) de eIF4g est, elle, associée avec son recrutement au niveau des GS, même si le rôle exact de cette modification dans la formation des GS ne soit pas clairement identifié [57]. La propyl hydroxylase OGFOD1 est elle aussi reliée à la formation des GS, bien qu'à l'heure actuelle son mécanisme exact d'action reste controversé : il passerait soit par l'hydroxylation de la sous-unité ribosomale RPS23 soit par une action indirecte de la phosphorylation de eIF2 α [58, 59]. L'arginilation serait, elle aussi, impliquée dans le recrutement de certains facteur comme la calreticuline (un des composants du complexe eIF2) au niveau des GS [60].

Les modifications post-traductionnelles étant un des mécanismes clés de la régulation des processus cellulaires, il serait intéressant de mener des études sur leur rôle/impact au niveau de la dynamique et de la fonction des GS.

1.2.5. La formation de GS et la survie cellulaire

Lors de leur formation, les GS vont recruter un grand nombre de protéines. (Voir section « 2. La composition protéique »). Le recrutement de certaines d'entre elles, comme TIA-1, semble être une étape déterminante dans la survie cellulaire suite à l'exposition au stress. L'inhibition de l'activité de la kinase RSK2 induit une diminution de 50 % du recrutement de TIA-1 au niveau des GS corrélant avec une augmentation de la mortalité cellulaire [61]. De plus, différentes équipes ont pu démontrer qu'un défaut de formation des GS revient à affecter la survie cellulaire après stress. En effet la formation de GS inhibe la cascade apoptotique en séquestrant des facteurs clés de l'apoptose [62, 63] ou en prévenant l'activation de cette voie de signalisation [64].

Pour ces raisons, il est communément admis que la formation de GS est bénéfique pour la cellule en tant que mécanisme protecteur. Néanmoins, si le stress est de trop forte intensité ou si le temps d'exposition devient trop long, cette réponse originellement protectrice, orientera la cellule vers l'apoptose [65].

1.2.6. Granules de Stress dans un organisme complet

La majeure partie des études qui ont été effectuées sur les GS s'effectuent sur des lignées cellulaires ou des cultures cellulaires primaires. Les études portant sur les GS dans des organismes pluricellulaires sont peu nombreuses. Toutefois ces structures ont aussi été étudiées dans des organismes complets. Une première étude en 2004 sur les cellules ciliées de l'oreille interne de poulet semble démontrer que l'exposition des animaux à la Gentamicine induit une mort cellulaire prématurée. Les auteurs pointent du doigt des inclusions cytoplasmiques retrouvées dans les cellules mortes supputant que la formation (ou la non-

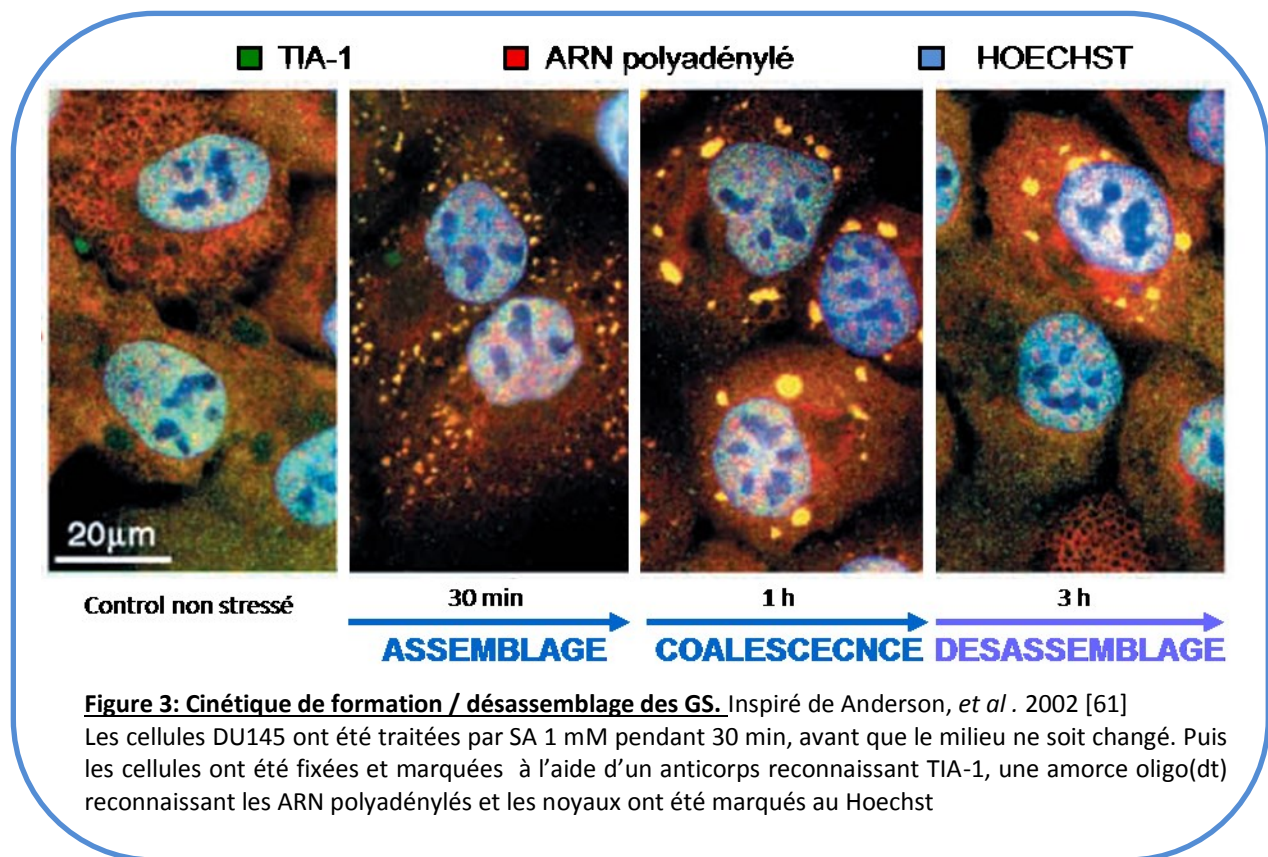
dissolution) de ces structures pourraient être impliquées dans la mort des cellules ciliées. Basés sur la relocalisation de TIAR (TIA-1 related protein) du noyau à des inclusions cytoplasmiques, les auteurs suggèrent fortement que ces inclusions seraient en fait des GS [66]. Dans une autre étude, l'équipe du Dr. Zhang a mis au point une lignée transgénique *C. elegans* surexprimant la protéine TIA-1 humaine étiquetée GFP nous permettant ainsi de suivre la formation des GS. Par la nature entièrement transparente du nématode, l'observation de ces structures cytoplasmiques est aisée *in vivo* prouvant que les GS ne sont pas un artefact de culture cellulaire [67]. De plus, il ne faut pas oublier que les premières observations de « GS » ont été réalisées sur des plants de tomates, qui sont par essence des organismes pluricellulaires [6].

1.2.7. Cinétique de formation des GS

1.2.7.1. Assemblage des GS

La formation de GS dans les cellules constitue une réponse au stress extrêmement rapide (*figure 3*). Pour la grande majorité des stress cellulaires, la phosphorylation d'eIF2 α est un prérequis pour la formation des GS [7, 33]. Elle va limiter la formation du complexe ternaire d'initiation de la traduction eIF2 α -GTP-tRNA_i^{Met}. eIF2 α lie l'ARN de transfert de la méthionine (tRNA_i^{Met}) seulement de manière dépendante de la GTP. La phosphorylation d'eIF2 α empêche l'échange d'un GDP par un GTP inhibant ainsi la formation du complexe ternaire. Bien que l'utilisation de cellules exprimant un mutant eIF2 α non phosphorylable (S51A) empêche la formation de GS en présence de stress [7, 33], la phosphorylation de eIF2 α n'est pas une étape indispensable à la formation de ces structures [21, 30, 33, 34]. L'utilisation du NSC 119893 ; un inhibiteur de l'interaction entre eIF2 α et Met-tRNA_i^{Met}, induit la

formation de GS et l'inhibition de la traduction sans phosphorylation de eIF2 α [68]. La réduction de la présence du complexe ternaire d'initiation causerait la formation des GS [33, 68]. Mais le stress induit par l'exposition à la pateamine A, un agent inhibiteur de la traduction cap-dépendante, induit la formation de GS de manière indépendante de la phosphorylation de eIF2 α [21].



Ainsi l'exposition au stress va induire dans un premier temps la formation de nombreuses petites inclusions cytoplasmiques (*figure 3, deuxième image*) [7, 69]. Cette étape est supposée être enclenchée par le domaine de type « prion » ou encore de « faible complexité ». En effet, il conférerait à la protéine la capacité de « s'auto-agréger » [38] et

serait responsable de la rapidité de formation des SG en réponse à un stress exogène [70]. Mais aussi ce domaine rendrait possible un état « d'hydrogel » [70-72], intermédiaire entre la solubilité et l'insolubilité des protéines permettant le grand dynamisme des GS. Cet état d'hydrogel aurait pour fonction de séquestrer les ARNm possédant de longue séquence 3' non traduites. Après leur formation ou agrégation primaire, ces inclusions qui apparaissent disséminées dans le cytoplasme vont au cours du temps fusionner en de plus grosses inclusions moins nombreuses. Cette deuxième étape est le phénomène d'agrégation secondaire ou de coalescence (*figure 3, troisième image*) [31, 51, 69, 73, 74]. A cette étape, l'apparition de « gros GS » peut être observée et serait corrélée à une augmentation de la survie cellulaire après exposition au stress [11, 75].

1.2.7.2. Désassemblage des GS

Les GS sont des structures cytoplasmiques transitoires ; une fois que le stress s'est résorbé, les GS se désassemblent (*figure 3, dernière image*). Ceci permet une reprise des processus de traduction. Cependant, si les GS ne se désassemblent pas, le retour de la traduction n'a pas lieu [7, 16, 22]. Toutefois, les mécanismes de désassemblages des GS ne sont pas clairement élucidés même si quelques pistes ont déjà été explorées. Le désassemblage reste l'étape de la cinétique des GS qui est la moins abordée dans la littérature.

Le premier mécanisme implique la protéine chaperonne HSP70-72. En effet, en réponse à divers stress l'expression des protéines « HSP » est induite [2, 6, 16]. L'ARNm de HSP70 est lié et stabilisé par la protéine YB-1 (Y-box-binding protein 1). La surexpression de YB-1 (induisant une stabilité accrue de l'ARNm de HSP70) diminue le nombre de cellules arborant des GS. A l'inverse la déplétion de YB-1, induit la formation de plus « gros » GS

[76]. De surcroît, il a été rapporté que la surexpression de HSP72 (forme inductible de HSP70) inhibe la formation de GS en réponse à un stress au MG132 (inhibition du protéasome). A l'inverse, la déplétion de HSP72 via ARNi induit une incapacité cellulaire à désassembler les GS [16]. Par son action de protéine chaperonne, l'expression de HSP70 a été proposée comme mécanisme de désassemblage des GS (agrégats TIA-1) par interaction avec son domaine prion [30, 38].

Le deuxième mécanisme décrit dans la littérature fait intervenir deux protéines identifiées pour la première et unique fois dans les GS dans la même publication. Grb7 (Growth factor receptor-bound protein 7) fait partie des 40 % de protéines dans les GS qui ne lient pas l'ARNm, et des 27 % qui ne lient ni l'ARNm et n'ont aucun rôle connu dans la transcription ou la traduction (*Annexe 1/ Tableau 4*). L'exposition au stress engendre l'activation de la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) qui va phosphoryler Grb7 pour l'extraire des GS, et ainsi induire le désassemblage de ces structures [53].

Le dernier mécanisme abordé dans la littérature fait intervenir VCP (Valosin-containing protein) une protéine impliquée dans le processus d'autophagie. La déplétion de VCP via ARNi provoque la formation de GS plus petits que ceux présents dans les cellules contrôles [77]. Cependant, la dissolution des GS après résolution du stress est aussi perturbée [77, 78]. VCP étant recruté au niveau des GS en réponse à de nombreux stress, les auteurs proposent que VCP agirait ainsi directement sur le désassemblage des GS en condition de choc thermique [78].

1.2.8. Les GS et les ARNm

En plus de leur importante composante protéique, les GS contiennent aussi des ARN poly-adénylés (*figure 3*) [7, 32, 38, 69]. De ce fait, les GS font partie de la famille des granules d'ARN [79]. Le recrutement des ARNm au niveau de ces structures serait un mécanisme qui leur permettrait d'être protégés de la dégradation engendrée par l'exposition au stress [33], mais actuellement ce processus n'a pas été prouvé. La présence d'ARNm semble être une condition *sine qua non* à la formation des GS. En effet le traitement des cellules au Cyclohexymide (CHX), qui bloque les ARNm au niveau des polysomes, va abolir la formation de GS en réponse à un stress et/ou provoquer le désassemblage de ceux déjà existants [30].

Cependant, en condition de stress tous les ARNm n'ont pas le même devenir. Bien qu'une grande partie des ARNm, soit recrutée aux au niveau des GS comme celui de la GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) [30], d'autres comme celui de HSP70, sont exclus de ces structures [30]. Puis, même si la traduction est globalement réprimée pendant le stress, certains ARNm sont toujours traduits, voire induits [6, 16, 79]. Ces derniers sont, le plus souvent, des chaperonnes et leur forte traduction serait un autre aspect de la réponse cellulaire au stress.

1.3. Processing Bodies

1.3.1. Découvertes / généralités

La découverte des Processing bodies (PB) est incontestablement liée à l'étude de la dégradation des ARNm [80]. Ainsi en 1997 l'équipe du Dr. Heyer se penche sur l'étude de

l'homologue murin de XRN1p (mXRN1p), une enzyme impliquée dans la dégradation/taux de renouvellement des ARNm. Les chercheurs constatent alors que la protéine est principalement observée dans des structures cytoplasmiques (570 ± 113 nm) rondes ne contenant ni tubuline, ni actine, ni vimentine, même si elles sont en association avec le réseau de tubuline. C'est la première observation des PB chez les mammifères [81]. Par la suite deux équipes ont montré la localisation d'autres protéines impliquées dans la dégradation des ARNm, Lsm1-7, Dcp1/2, dans ces « *foci* » cytoplasmiques contenant XRN1 [82, 83]. En 2003, les Dr. Seth et Parker démontrent que ces « *foci* » cytoplasmiques sont effectivement un lieu de dégradation de ARNm et ils les nomment « Processing Bodies » (PB) [84-86].

Bien que les PB contiennent toute la machinerie de dégradation des ARNm, certaines des protéines recrutées sont aussi impliquées dans la répression de la traduction [86, 87]. En effet, les PB sont en charge de recruter les ARNm hautement transcrits afin d'en limiter la traduction et d'augmenter la viabilité cellulaire [88]. Dernièrement, les PB sont impliqués dans la répression de la traduction et dégradation des ARNm via les microARN [80, 86]. Cette voie est différente de celle présentée précédemment, elle se situe en aval du clivage des ARNm double brin par Dicer pour former des microARN. Par la suite les microARN seront recrutés au niveau du complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex), via les protéines Argonaute2 et GW182 et pourront interagir avec leur ARN cible. La déplétion de GW182 ou d'Argonaute2 bloque la formation des PB et prévient l'inhibition de la traduction [89-91]. Actuellement, les « *foci* » contenant GW182 peuvent être retrouvés dans la littérature sous le nom de « GW bodies ». Bien que les PB et les « GW bodies » aient été découverts à une période similaire au début des années 2000 [80, 92], elles sont souvent référencées comme étant une seule et même structure [93].

1.3.2. Formation / inhibition

Les PB sont des structures présentes en condition physiologique, bien qu'ils puissent aussi être induits par l'exposition à certains stress [33, 84]. Comme suggéré dans la littérature, la formation de ces structures est, elle aussi, hautement dépendante de la présence d'ARNm [33, 86, 94]. D'une part, l'inhibition de l'étape de décoiffage de l'ARNm (diminution de l'expression de Dcp1), aboutit à l'accumulation d'ARNm, induisant une augmentation de l'abondance et de la taille de PB [84]. D'autre part, les traitements à l'émétine (ou au cycloheximide), bloquant les ARNm dans les structures ribosomiques, empêchent la formation ou induisent un désassemblage des PB [33, 94, 95].

En revanche, bien que les PB partagent certaines caractéristiques avec les GS pour leur induction/maintien, il est à noter que leur formation est, elle, indépendante de la phosphorylation de eIF2 α [33]. De plus, l'exposition à un stress thermique ou au Clitrimazol induit uniquement la formation de GS, tandis que l'Arsénite de Sodium induit les deux structures, [33]. De plus les PB ne contiennent pas les facteurs d'initiation de la traduction classiques contenus dans les GS à l'exception de eIF4E [33, 94].

1.3.3. La dégradation des ARNm dans les PB

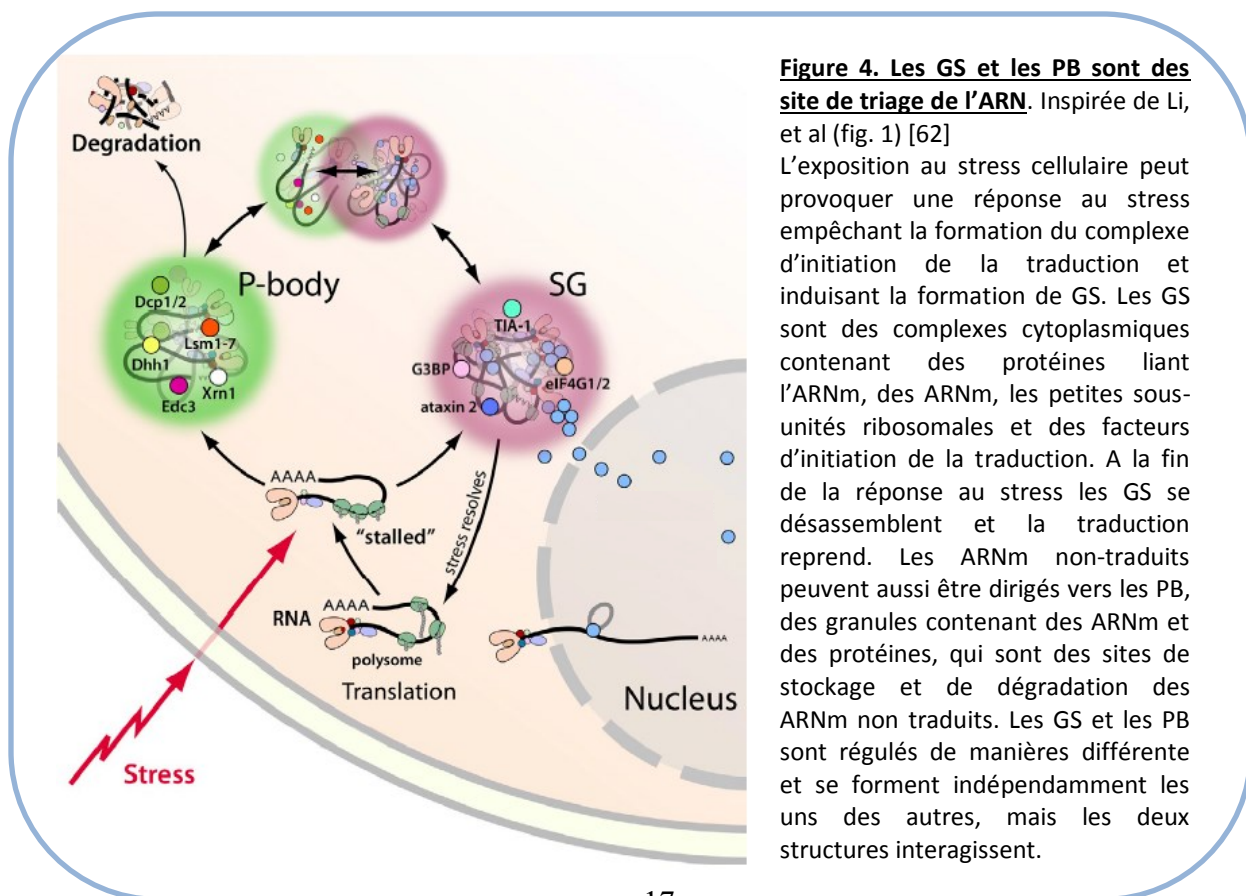
Lorsque les ARNm sont recrutés au niveau des PB, ils peuvent soit, entrer dans le processus de dégradation, soit être réprimés et stockés dans ces inclusions pour une traduction ultérieure [80, 86]. En effet, le recrutement des ARNm au niveau des PB n'entraîne pas nécessairement la dégradation de ces derniers [84]. La dégradation de ARNm ne serait le fait que des « gros » PB [86, 96].

Les ARNm présents dans le cytoplasme sont protégés de la dégradation en 3' par la queue poly A et en 5' par la coiffe. La dégradation commence par la perte de la queue poly A induite par le complexe CCR4-NOT. Le complexe Lsm est présent à cette étape en tant que cofacteur de déadénylation. En effet l'étape déadénylation est souvent limitante. Cette étape est indispensable au recrutement des ARNm dans les PB. Très souvent la perte de la queue polyadénylée est suivie par l'action du complexe DCP1/DCP2 qui s'occupe du retrait de la coiffe. Ensuite l'exonucléase XRN1 peut commencer à dégrader les ARN [80, 97, 98].

1.3.4. Interaction entre les PB et les GS

Comme mentionné dans une section précédente, les GS et les PB partagent certains des composants protéiques comme eIF4G et TIA-1 dans certaines conditions [21, 33, 99, 100].

Néanmoins ces deux structures recrutent toutes les deux des ARNm.



Actuellement, plusieurs études rapportent l'interaction entre ces deux structures en condition de stress, communément appelée « amarrage » (docking). Ce contact entre les GS et les PB leur permettraient d'échanger des ARNm et des protéines [33, 86]. Actuellement deux grandes hypothèses s'affrontent quant à la direction de cet échange. L'équipe du Dr. Anderson défend l'hypothèse selon laquelle les ARNm seraient premièrement dirigés vers les GS en condition de stress. Par la suite, les GS constituerait un lieu de triage qui redirigerait les ARNm soit vers les PB pour être dégradés, soit vers un retour à la traduction [33]. D'un autre côté l'équipe de Dr. Parker, travaillant sur la levure, assure que les ARNm pourraient d'abord être recrutés au niveau des PB avant d'être échangés vers les GS ou vers une réinitiation de la traduction [86, 101]. Actuellement, la (co)existence de ces deux modèles est admise dans différentes revues de littérature (*figure 4*) [70, 102-104].

1.4. Implication des microtubules dans l'assemblage des GS et des PB

Les GS et les PB sont des structures extrêmement mobiles capables de mouvements dans la cellule [33, 105]. L'équipe du Dr. Anderson a démontré lors d'un criblage que de nombreuses protéines impliquées dans le transport via les microtubules ont un effet sur la formation des GS [28]. Les GS, tout comme les PB, sont des structures qui s'associent aux microtubules et non aux filaments d'actine dans les cellules de mammifères [105, 106]. Cependant, à travers les diverses études, l'effet d'une déstabilisation des microtubules est différent d'une structure à l'autre.

Les microtubules ne sont pas impliqués dans le maintien des GS à proprement parler, mais leur déstabilisation par le Nocodazole ou la Vinblastine aboutit à une réduction de formation et une inhibition de la coalescence et du désassemblage des GS [105, 107]. En effet, que ce soit l'assemblage/coalescence ou le désassemblage, les deux processus sont actifs et véhiculés par les protéines moteurs dynéine (transport antérograde) et kinésine (transport rétrograde) respectivement [108]. Les PB sont souvent observés en proche contact avec le réseau de microtubule [81, 87]. La déstabilisation des microtubules par le Benomyl va stimuler la formation des PB [81, 109]. De manière générale, les publications portant sur les microtubules et les GS ou les PB ne sont pas nombreuses. Cependant, le domaine de recherche des granules d'ARN (notamment les granules de transport d'ARNm) est en expansion et les lacunes sur ce sujet devraient peu à peu se combler.

1.5. La réponse au stress dans un contexte pathologique

1.5.1. Infections virales

Les GS et les PB sont deux types de granules d'ARN qui sont impliqués dans la régulation de la traduction en réponse à un stress. Les virus, ayant besoin de détourner la machinerie de réplication cellulaire pour se multiplier, ont développé une multitude de mécanismes afin de contourner la réponse au stress cellulaire [110]. En effet, la formation de GS ou de PB pourrait avoir pour conséquence de séquestrer les ARN viraux afin d'inhiber leur traduction. Certains comme l'Influenza A vont inhiber la kinase PKR empêchant ainsi la phosphorylation de eIF2 α et la formation de GS [111]. D'autres vont cliver des protéines clés des GS et des PB, comme le virus de la Polio qui, par l'intermédiaire de la Protéase C va induire le clivage de G3BP, Xrn1, Dcp1a et Pan3 inhibant la formation de ces structures [45,

112]. Pour le virus de la Dengue, il a été identifié par spectrométrie de masse que les protéines des GS G3BP, USP10 et Caprin lient l'ARNm viral au niveau du 3'UTR. [113], mais l'exacte fonction de cette liaison n'est pas décrite dans l'étude ; elle pourrait aussi bien être impliquée dans la traduction [114] que dans la stabilisation du transcrit [115]. Dans le cadre de l'infection au virus Vaccinia les chercheurs ont pu observer une relocalisation de TIA-1, eIF3b, G3BP 1 et USP10 dans des « *foci* » viraux ne contenant pas de sous-unité ribosomale et ne se désassemblant pas après traitement au cycloheximide [116]. Bien que les auteurs aient identifié ces structures comme des GS, leurs caractéristiques sont en complète contradiction avec la définition initiale des GS [7]. Certains virus encore, n'empêchent pas la formation de GS [117]. Reineke et Lloyd avancent l'idée selon laquelle, « le nombre de mécanismes mis en place par les virus pour saboter la fonction des granules d'ARN est proche du nombre de famille de virus, mais les mécanismes d'action sont encore troubles » [110].

1.5.2. Cancers

Les GS sont des structures qui surviennent dans la cellule afin de la protéger des dommages qu'une exposition au stress pourrait causer [61, 63, 64, 75, 118]. Ainsi, en 2010 l'équipe du Dr. Mazroui a mis en évidence que le traitement au Bortezomib, un agent de chimiothérapie, a pour conséquence l'activation de la kinase HRI qui phosphoryle eIF2 α et induit ainsi la formation de GS. Les auteurs émettent l'hypothèse que cette activation de la formation des GS expliquerait la résistance des cancers solides au traitement [18]. Une autre étude, menée par le Dr. Anderson sur le Sélénium, un composé aux vertus chimio-préventives et chimiothérapeutiques [119], prouve que le traitement au sélénite de sodium induit, non seulement, la formation de GS mais aussi de PB. Toutes fois les GS formés ont une

composition atypique ; ils ne recrutent ni eIF3 ni RACK1. Les auteurs avancent que ces GS atypiques seraient exemptes de fonction de protection contre la mort cellulaire induite par l'exposition au stress [120].

1.5.3. Maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par la présence d'inclusions pathologiques. Certaines études ont mis en évidence la colocalisation de ces inclusions pathologiques avec des marqueurs des GS. Il a été démontré que TIA-1 colocalise avec les inclusions formées par l'expression du premier exon du gène de l'*Huntingtine* (modèle communément utilisé dans l'étude de la maladie d'Huntington) [121]. Chez les modèles murins de la maladie d'Alzheimer (mutants tau JLPL3 et tau inductibles rTg4510), alors que les inclusions positives pour G3BP1 ou TTP (Tristetraprolin, une autre protéine liant l'ARNm qui est recrutée au niveau des GS [7, 19]), croissent en taille parallèlement à la progression de la pathologie, ces inclusions ne colocalisent pas avec celles immuno-réactives pour la protéine Tau pathologique (inclusions positives avec l'anticorps PHF-1). Par contre TTP, colocalise avec la Tau phosphorylée. A l'inverse TIA-1, elle, se localise dans les inclusions de Tau chez les modèles murins et dans des sections de cerveaux post-mortem de patients [122]. Chez les patients atteints de Sclérose Latérale Amyotrophiques, TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43) est une des principales protéines présentes dans les inclusions pathologiques [123]. Cette protéine est aussi recrutée dans les GS en réponse à de nombreux stimuli [8, 11, 17, 124]. Les inclusions pathologiques peuvent aussi s'avérer positives pour marqueurs des GS comme TIA-1, eIF3 et PABP (Polyadenylate-binding protein) [124].

Toutes ces études encouragent à penser que ces inclusions sont le fait d'une dérégulation de la réponse au stress. Même si à l'heure actuelle aucune évidence ne nous permet de savoir si les inclusions pathologiques se forment autour des « agrégats » composés des protéines retrouvées dans les GS et les PB ou si ces mêmes protéines se retrouvent séquestrées dans les inclusions pathologiques déjà existantes [125].

2. La Sclérose Latérale Amyotrophique

2.1. Les maladies neurodégénératives, généralités

Les maladies neurodégénératives sont des pathologies affectant une zone particulière du système nerveux aboutissant généralement à la perte neuronale. Le type de neurone varie d'une maladie neurodégénérative à une autre. Par exemple les neurones dopaminergiques de la substance noire dans la maladie de Parkinson, les neurones pyramidaux du cortex temporal dans la maladie d'Alzheimer, ceux des ganglions de la base pour la chorée de Huntington, ou encore les motoneurons de la moelle épinière et du cortex chez les patients atteints de Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) et les neurones des lobes frontaux dans le cadre des démences fronto-temporales (DFT). Certaines de ces pathologies peuvent affecter simultanément le même patient, comme pour les cas de SLA où quelques patients présentent aussi des symptômes de DFT.

Les causes du déclenchement de ces pathologies sont en grande partie une énigme sur laquelle de nombreuses recherches sont axées. La communauté scientifique a cependant quelques réponses. Par exemple, la chorée de Huntington est entièrement due à une expansion polyglutamine dans le gène *Huntingtine*. Lorsque le nombre de répétitions du motif CAG dépasse 40, alors la pénétrance devient complète. Pour ce qui est des pathologies d'Alzheimer,

de Parkinson, ou de la SLA, certains cas sont reliés à un historique familial mais ils ne représentent respectivement que 5, 15 et 10 % des patients. La plupart des cas de ces trois pathologies sont ainsi considérés comme « sporadiques » car les patients n'ont pas de lien direct avec un autre membre de la famille atteint (ou aucun historique familial n'est accessible). Dans chacune de ces pathologies, des mutations génétiques ont été retrouvées affectant aussi bien des patients familiaux que des patients sporadiques. De plus, ces mutations sont variées : les gènes impliqués sont multiples, et peuvent faire partie de voies de signalisation différentes.

Dans chacune de ces pathologies, il est difficile d'établir avec certitude si les mécanismes de déclenchement sont identiques chez tous les patients, qu'ils s'agissent des cas familiaux qui présentent des mutations dans des gènes différents, ou encore chez les patients sporadiques non reliés à un historique génétique. En plus des mécanismes de déclenchement, ceux de la propagation de ces pathologies sont eux aussi assez complexes à élucider [126, 127]. Dans notre étude, nous nous intéressons de manière plus précise à la SLA

2.2. Dénominations

La Sclérose Latérale Amyotrophique est premièrement décrite en 1873 par Jean-Martin Charcot (1825 - 1893), un neurobiologiste français, lors de ses fameuses « leçons du mardi » qu'il donnait à l'hôpital de la Pitié Salpêtrière à Paris. Il nomma cette pathologie en fonction des observations médicales qu'il a pu effectuer lors du diagnostic des patients ainsi qu'à partir des données obtenues lors de l'autopsie. Le terme « **Sclérose** », renvoie à la dégénérescence de neurones moteurs qui induit la présence d'un tissu apparaissant cicatriciel et fibreux aboutissant à un durcissement musculaire. « **Latérale** », les neurones qui dégèrent

cheminent dans la partie latérale de la moelle épinière. Enfin, « *Amyotrophique* », pour illustrer la perte des motoneurons engendrant une fonte musculaire.

Aux États-Unis ainsi qu'au Canada, cette pathologie est surtout connue sous le nom de *maladie de Lou Gehrig*, du nom du talentueux joueur de baseball qui développa cette pathologie. En effet Henry Louis Gehrig (1903 – 1941), désigné meilleur joueur de la ligue majeur en 1927 et 1936 et inscrit au temple de la renommée en 1939, commence à perdre de sa superbe en 1938. Il déclarera en fin de saison *"I tired mid-season. I don't know why, but I just couldn't get going again"* (j'étais fatigué à la mi-saison. Je ne sais pas pourquoi, mais je ne peux pas continuer ainsi.). En 1939 il apparaît clairement que ses capacités se détériorent. Il est diagnostiqué le 19 juin 1939. Le 21 juin, les New York Yankees annoncent sa retraite. Il décède deux ans plus tard le 2 juin 1941 des suites de sa maladie.

2.3. La SLA en quelques chiffres

La SLA est une maladie neurodégénérative ayant un déclenchement tardif. Seulement 5% des patients déclenchent la pathologie avant l'âge de 45 ans, et généralement la pathologie survient entre 45 et 70 ans, avec un âge moyen de 60 ans. L'incidence de la pathologie est globalement la même à l'échelle mondiale, 2 pour 100 000, ce qui fait 120 000 cas diagnostiqués chaque année, soit 328 nouveaux cas par jour. Actuellement au Canada, entre 2 500 et 3 000 Canadiens vivent avec la pathologie. La SLA est une maladie très agressive : 80 % des patients décèderont de la pathologie dans les 5 ans suivant le diagnostic, et seul 10 % survivent pendant une dizaine d'années [128-130].

2.4. Quel(s) élément(s) déclenche(nt) la pathologie ?

Généralement, la pathologie est diagnostiquée chez des patients entre 40 et 60 ans. Cependant, des cas de patients précoces ou tardifs ont déjà été recensés. La SLA touche sans distinction de sexe ou d'origine ethnique. Ainsi, bien que 10 % des cas soient reliés à un historique familial, les 90 % restants sont considérés comme sporadiques [131]. Toutefois une exposition à des stress environnementaux serait un facteur à risque dans le développement de la pathologie [132].

2.5. Diagnostic

Toute la difficulté du diagnostic de cette pathologie vient de l'hétérogénéité des symptômes. Mais globalement, elle est caractérisée par une perte de la masse musculaire suivit d'une paralysie progressive, aboutissant au décès du patient. Deux « types »

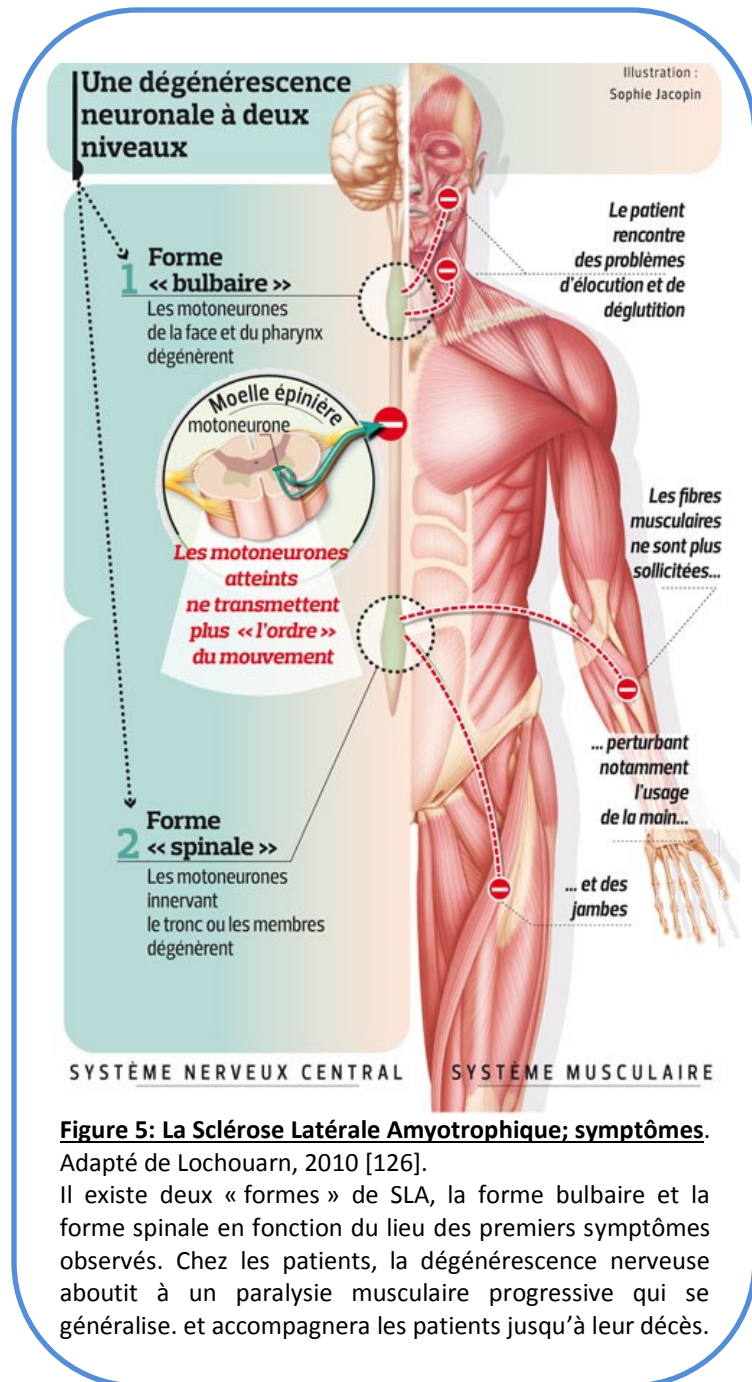


Figure 5: La Sclérose Latérale Amyotrophique; symptômes.

Adapté de Lochouarn, 2010 [126].

Il existe deux « formes » de SLA, la forme bulbaire et la forme spinale en fonction du lieu des premiers symptômes observés. Chez les patients, la dégénérescence nerveuse aboutit à une paralysie musculaire progressive qui se généralise. et accompagnera les patients jusqu'à leur décès.

de SLA sont caractérisés en fonction du site d'apparition des premiers symptômes (*figure 5*). La *forme spinale* atteint les neurones moteurs de la moelle épinière, elle est caractérisée par une paralysie démarrant dans l'un des membres inférieur ou supérieur. La *forme bulbaire* débute par l'implication des neurones du tronc cérébral induisant des difficultés d'élocution et de déglutition. Généralement la paralysie se propage de manière assez rapide et, en fin de vie, les patients rencontrent une compilation de symptômes dont des difficultés à déglutir, à se mouvoir et à s'exprimer. De manière générale la paralysie n'affecte que la composante nerveuse motrice, les nerfs crâniens ne sont pas atteints. De ce fait, pour les patients les autres sens; vision, ouïe, odorat, touché et goût, ne sont pas affectés par la maladie. Par contre, certains organes sont épargnés par la progression de la paralysie, comme les muscles oculomoteurs et cardiaque, les sphincters, la vessie, ainsi que les organes sexuels [131, 133, 134].

Il n'existe pas de test diagnostique spécifique pour la SLA à ce jour. Afin de poser le diagnostic, les cliniciens vont avoir recours à un examen neurologique où des troubles comme les raideurs musculaires, l'exagération de certains reflexes, l'amyotrophie ou des contractions involontaires musculaires (fasciculations) vont être recherchés. L'examen sera complété par un électromyogramme. Cependant malgré ces éléments, le diagnostic n'est pas aisé, et afin d'écarter la possibilité d'une autre pathologie du motoneurone, le praticien pourra aussi soumettre le patient à d'autres examens comme un IRM de la moelle épinière et/ou du cerveau, qui pourraient révéler la présence de démyélinisation, caractéristique d'une Sclérose en plaque. Dans certains cas, le manque de symptômes peut retarder le diagnostic. C'est pourquoi il est difficile de traiter les patients à un stade précoce de la pathologie [134, 135].

2.6. Lien avec la Démence Fronto-Temporale

2.6.1. Des cas communs Sclérose Latérale Amyotrophique et Démence Fronto-Temporale

La SLA n'est pas une maladie neurodégénérative exclusive. En effet une proportion des patients va aussi développer les symptômes de Démence Fronto-Temporale (DFT). Les mécanismes de convergence des deux pathologies affectant des catégories différentes de neurones ne sont pas encore élucidés à ce jour. Les patients peuvent présenter dans un premier temps les symptômes de SLA puis de DFT ; ou de DFT puis de SLA ; ou encore les deux simultanément. Les deux maladies peuvent être reliées à des mutations affectant la même protéine. Les symptômes de la DFT représentent principalement des modifications majeures du comportement (baisse des comportements affectifs, indifférence à l'environnement...). Comme dans la SLA, l'âge de la manifestation de la pathologie se situe entre 45 et 60 ans, et l'espérance de vie des patients oscille entre 2 et 15 ans après le diagnostic. De plus, comme la SLA, la DFT touche indifféremment les hommes et les femmes [136].

2.6.2. Les inclusions pathologiques

Lors d'analyses de tissus post-mortem de patients SLA ou DFT, des inclusions neuronales et gliales ont été retrouvées [137]. Le rôle de ces inclusions dans les pathologies n'est pas clairement défini actuellement. Deux écoles s'affrontent, d'une part, ces inclusions sont considérées comme néfastes car elles pourraient séquestrer des protéines importantes pour le métabolisme cellulaire et ainsi véhiculer directement la toxicité. D'autre part, comme les mutations pathologiques peuvent entraîner une mauvaise conformation protéique, ces inclusions pourraient séquestrer ces protéines mal conformées qui interfèreraient dans le

métabolisme cellulaire et provoqueraient une toxicité. Dans ce cas de figure, les inclusions seraient bénéfiques. La question reste encore très ouverte. De plus, ces inclusions pourraient en plus être complètement inerte et ne pas avoir de lien direct avec la pathologie. Qu'il s'agisse de la SLA ou de la DFT, les inclusions sont présentes dans les tissus nerveux. La composition de ces inclusions varie en fonction de la pathologie (*figure 6*) [138].

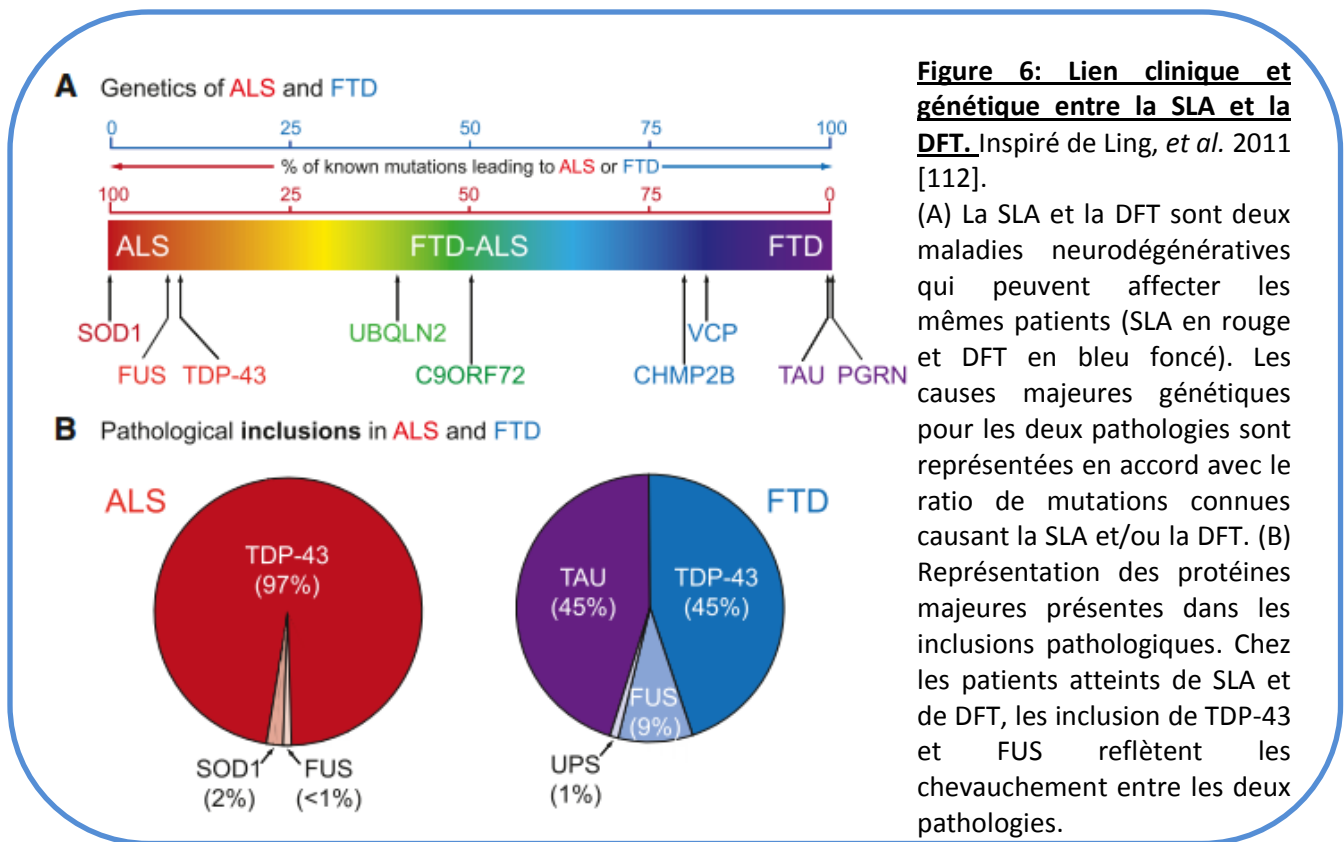


Figure 6: Lien clinique et génétique entre la SLA et la DFT. Inspiré de Ling, *et al.* 2011 [112].

(A) La SLA et la DFT sont deux maladies neurodégénératives qui peuvent affecter les mêmes patients (SLA en rouge et DFT en bleu foncé). Les causes majeures génétiques pour les deux pathologies sont représentées en accord avec le ratio de mutations connues causant la SLA et/ou la DFT. (B) Représentation des protéines majeures présentes dans les inclusions pathologiques. Chez les patients atteints de SLA et de DFT, les inclusion de TDP-43 et FUS reflètent les chevauchement entre les deux pathologies.

2.6.3. Les causes de la pathologie

Les causes exactes du déclenchement de ces pathologies ne sont pas encore clairement définies. Certaines causes génétiques peuvent être partagées par les deux maladies, alors que d'autres vont avoir une plus forte incidence dans la SLA ou la DFT. Comme nous l'avons

évoqué précédemment, 10 % des cas de SLA sont reliés à un historique familial. Cependant, les gènes impliqués contrôlent des processus biologiques divers et variés et présentent des caractéristiques structurales assez différentes. Actuellement, les gènes/protéines qui concentrent le plus l'attention de la communauté scientifique sont au nombre de quatre : SOD1, C9orf72, TDP-43, et FUS. Dans cette étude nous nous sommes focalisé sur TDP-43 et FUS. Ces deux protéines ayant des similarités de structure et de fonction, il est possible qu'elles partagent leurs mécanismes de toxicité.

2.6.3.1. TDP-43 ; généralités

TDP-43 a initialement été décrite en 1995 comme liant la séquence régulatrice TAR (Trans-Activating Response) du VIH, d'où son nom TAR DNA binding protein 43 [139]. Toutefois, TDP-43 a été reliée à la pathologie de la SLA avant que des mutations affectant la protéine n'aient été découvertes. En effet, les inclusions ubiquitinylées caractéristiques des pathologies étaient connues comme étant en partie positives pour Tau (protéine majeur des inclusions dans la maladie d'Alzheimer). Afin de connaître la composition de ces inclusions, en 2006, les chercheurs ont micro-disséqué les inclusions pathologiques avant de les soumettre à une analyse en spectrométrie de masse. C'est dans ces conditions que TDP-43 a été identifiée comme l'un des composants principaux de 97 % des inclusions retrouvées chez les patients atteints de SLA et 45 % des inclusions retrouvées chez ceux atteints de DFT [123, 140]. Par la suite, les premières mutations associant TDP-43 à la pathologie ont été découvertes en 2008 [141, 142]. Une quarantaine de mutations ont été mises en évidence et représentent aujourd'hui 5% des cas familiaux [143]. TDP-43 interagit très fortement avec les protéines impliquées dans le métabolisme des ARNm et contribue à l'élaboration du lien,

aujourd'hui accepté, entre une dérégulation de ce métabolisme et le déclenchement de la pathologie [144].

2.6.3.2. FUS ; généralités

FUS (FUSed in liposarcoma), aussi connue comme TLS (Translocated in LipoSarcoma), a premièrement été identifiée en cancérologie. Cette protéine est impliquée dans certains liposarcomes et certaines leucémies lymphoïdes où le gène encodant la protéine subit un réarrangement chromosomique amenant à sa fusion avec ERG, translocation t(16;21)(p11;q22) [145, 146] ou CHOP, translocation t(12;16)(q13;p11) [147, 148]. De plus, son niveau d'expression est augmenté chez les patients atteints de leucémie myéloïde par rapport à des patients contrôles [149].

Un an après l'identification des premières mutations affectant TDP-43, des mutations ont été retrouvées dans la séquence codante de FUS reliant la protéine aux pathologies de la SLA et de la DFT [150, 151]. FUS fait aussi parti des protéines présentes au sein d'inclusions pathologiques des deux maladies et représente une partie mineure des inclusions SLA (1 %) et 9 % des inclusions DFT. Actuellement plus de 40 mutations ont été identifiées [143].

3. TDP-43 et FUS

3.1. Les modèles d'étude

De nombreux modèles transgéniques de TDP-43 et de FUS ont été réalisés au cours des dernières années dans le but de reproduire les effets des pathologies auxquelles ces protéines sont associées, notamment dans le cadre de la SLA. Dans ce domaine, deux hypothèses sont souvent mises en opposition, même si elles pourraient coexister. La première voudrait que les

mutations associées à la pathologie causent un gain de fonction toxique. Cette théorie est appuyée par le fait que TDP-43 ou FUS, principalement nucléaires en condition non pathologique, se retrouvent sous forme d'inclusions cytoplasmiques chez les patients. Ainsi, les agrégats auraient un effet toxique pour la survie cellulaire. La deuxième voudrait que la pathologie soit induite par la déplétion nucléaire. Dans ce cas TDP-43 et/ou FUS se retrouvent dans l'incapacité de remplir leur fonction nucléaire à cause de leur défaut de localisation entraînant une perte de fonction.

3.1.1. TDP-43

3.1.1.1. Modèles de surexpression

De nombreux groupes ont développé des souris sur-exprimant TDP-43 mutant. Les premiers groupes à publier au sujet des souris transgéniques sur-exprimant TDP-43 ont bien souvent utilisé un promoteur fort comme celui de la protéine Prion. Les souris surexpriment la protéine de 2.5 à 3 fois le niveau de l'endogène. Cependant, les différences entre les lignées surexprimant TDP-43^{sauvage} et TDP-43^{A315T} ne sont pas très marquées. Les souris présentent des inclusions cytoplasmiques phosphorylées et ubiquitinilées, des anomalies mitochondriales et une durée de vie très courte d'à peine deux mois [152, 153]. D'autres souris présentent un phénotype beaucoup moins agressif. Cette fois l'expression de TDP-43^{sauvage}, TDP-43^{A315T}, TDP-43^{G348C}, est placée sous le contrôle du promoteur TDP-43 murin. Les souris développent des inclusions ubiquitinylées ainsi qu'un déficit d'apprentissage et un faible déficit moteur qui s'intensifie avec l'âge. Ces souris atteignent au moins les 10 mois de vie [154]. Dernièrement, un autre modèle a été publié, où les souris transgéniques TDP-43^{A315T} meurent prématurément des suites d'obstructions intestinales. Les chercheurs ont réussi à contourner ce

phénotype en nourrissant les souris à l'aide de « gel » qui élimine la présence d'éléments « non-digérables », et là, les souris présentent peu à peu des caractéristiques de perte neuronales. Le lien entre les maladies du tube digestif et les maladies neurodégénératives n'a pas été expliqué dans cette publication [155].

Chez la drosophile, l'expression des protéines TDP-43^{sauvage}, TDP-43^{A315T} au niveau de l'œil aboutit à une dégénérescence des cellules oculaires. Lorsque l'expression de la protéine est ciblée au niveau des neurones via l'utilisation d'un promoteur spécifique D42 Gal4, les auteurs ne constatent aucune présence d'agrégats. Cependant les mouches transgéniques développent des défauts de locomotion et leur viabilité se retrouve diminuée [156, 157].

Chez l'organisme modèle *C. elegans* ni surexpression de TDP-43^{sauvage} ni celle du mutant TDP-43^{A315T} ne réduit l'espérance de vie du nématode [158]. Les vers exprimant TDP-43^{sauvage}, TDP-43^{G290A}, TDP-43^{M337V}, TDP-43^{A315T} présentent tous un déficit locomoteur lié à l'âge, cependant, l'expression des mutants engendre un phénotype beaucoup plus agressif que l'expression de la protéine sauvage [159]. Cependant, seuls les mutants induisent une perte neuronale et une insolubilité protéique de TDP-43 [158, 159].

Globalement, surexpression de TDP-43 provoque plusieurs phénotypes qui ressemblent à ceux développés chez les patients atteints de SLA. Cependant, bien que l'expression de mutant aggrave dans certains cas les phénotypes observés, l'expression de la protéine sauvage engendre déjà des phénotypes toxiques.

3.1.1.2. Modèles de déplétion de TDP-43

Pas moins de trois équipes ont essayé de mettre au point des souris complètement invalidées pour TDP-43 (Knock Out). Alors que les hétérozygotes sont indifférenciables des souris sauvages, les souris homozygotes *-/-* pour TDP-43 meurent entre 3.5 et 6.5 jours de vie embryonnaire [160-162]. Par la suite, deux équipes ont généré des souris pour lesquelles l'expression de TDP-43 a été supprimée ou diminuée spécifiquement dans les neurones moteurs. Ces souris développent une perte d'innervation des plaques neuromusculaires ainsi qu'une diminution du nombre de neurones moteurs de gros diamètre (alpha). De plus, dans les neurones déficients en TDP-43 les auteurs ont révélé la présence soit de dépôts ubiquitinilés, soit l'accumulation de neurofilaments phosphorylés rappelant la pathologie. Ces phénotypes sont assez proches de ceux observés chez les patients [163, 164].

Chez la drosophile l'homologue de TDP-43 est TBPH (TAR binding protein homolog). Sa déplétion n'est que partiellement létale. Les mouches développent des troubles de locomotion, des mouvements non coordonnés, une incapacité à voler ou à marcher et une réduction de leur durée de vie. Au niveau neuronal, l'arborisation dendritique est fortement affectée avec une diminution des terminaisons de 23 %. L'ensemble de ces phénotypes démontre une atteinte caractéristique évidente du réseau neuronal moteur [165, 166].

Deux groupes ont étudié l'effet de la déplétion de *tdp-1*, l'homologue de TDP-43 présent chez l'organisme modèle *C. elegans*. Il existe deux souches mutantes *tdp1(ok803)* et *tdp-1(ok871)*, supposées ne produire aucun ARNm correspondant à la protéine *tdp-1*. Les vers mutants *tdp-1(ok871)* présentent une baisse de fertilité, un retard de développement. Alors que les mutants *tdp1(ok803)* sont aussi sensibles au stress oxydatif (peroxyde d'hydrogène et

Juglone) et osmotique (NaCl et sorbitol) [167, 168]. L'expression de la protéine humaine TDP-43 restaure un phénotype normal chez les vers *tdp-1(ok803)* [168].

3.1.2. FUS

3.1.2.1. Modèles de surexpression

Peu de modèles murins surexprimant un mutant FUS ont été générés à ce jour. Cependant, il semble que les caractéristiques phénotypiques concordent. En effet l'expression du mutant FUS^{R521C} ou de la protéine tronquée FUS¹⁻³⁵⁹ corrélient avec une diminution de la durée de vie des souris couplée à des déficiences motrices. Mais, aucun de ces modèles n'est comparé à des lignées surexprimant uniquement la protéine FUS^{sauvage}. De ce fait, nous ne pouvons pas conclure si les défauts phénotypique observés doivent être attribués à la surexpression de FUS ou à la présence de la mutation/troncation [169, 170].

Chez la drosophile, l'expression dans l'œil des protéines FUS^{sauvage}, FUS^{R518K}, FUS^{R521H}, FUS^{R521C}, cause une dégénérescence oculaire sévère. Lorsque l'expression de FUS^{sauvage} et de FUS^{521C} est ubiquitaire ou ciblée au niveau du système nerveux, elle induit une augmentation de la mortalité des mouches et un défaut de locomotion concomitant avec une altération morphologique et fonctionnelle des jonctions neuromusculaires [171, 172].

La surexpression de FUS^{sauvage} et celle du mutant FUS^{S57Δ} ne réduisent pas l'espérance de vie de modèle du nématode *C. elegans*. De plus, seuls les mutants induisent une perte neuronale et une insolubilité protéique de FUS [158].

Comparativement aux modèles surexprimant TDP-43, ceux surexprimant FUS sont beaucoup moins nombreux. Cependant, il semble que la toxicité induite par l'expression des mutants soit en grande partie partagée par ceux exprimant la protéine sauvage.

3.1.2.2. Modèles de déplétion

Contrairement à la déplétion de TDP-43, les homozygotes *-/-* pour FUS ne sont pas létales au stade embryonnaire. Cependant, à la naissance, les souris *-/-* sont les plus chétives de leur portée, même si cette différence ne dépasse pas la variabilité naturelle. Bien que ces animaux soient viables, un déficit de méiose engendre d'importants problèmes de fertilité de la souche (stérilité totale des mâles et partielle des femelles) et une forte instabilité génétique : aneuploïdie, anomalie karyotypique, insertion extra-chromosomale, fusion centromérique ainsi que des cassures chromosomique fréquentes [173, 174].

La drosophile possède un homologue de FUS appelé *Cabeza (Caz)*. Les auteurs ont ciblé la déplétion de *Caz* dans les motoneurones (le type cellulaire principalement affecté par la pathologie). Ces mouches présentent une réduction de la mobilité mesurée par un test de « géotaxie négative » (climbing assay). De plus leur arborescence synaptique est amoindrie et le nombre de boutons synaptiques est inférieur à celui des mouches sauvages. L'ensemble du phénotype démontre une atteinte évidente du réseau neuronal moteur [175].

L'homologue de FUS chez le ver est *fust-1*. Il semblerait que *fust-1* soit impliqué dans la réponse au stress [176, 177]. Cependant la souche mutant *fust-1* (équivalent à une déplétion de la protéine) n'est pas entièrement caractérisée à ce jour.

3.1.3. Les modèles cellulaires

Les modèles cellulaires de déplétion de TDP-43 ou de FUS ont principalement aidé à comprendre les mécanismes moléculaires dans lesquels ces protéines sont impliquées. Ces diverses fonctions seront plus amplement décrites dans les paragraphes suivants. De manière générale, nous pouvons noter que les cellules dont l'expression de TDP-43 ou de FUS a été réduite ont une survie moindre ou présentent une sensibilité accrue au stress [161, 164, 174, 178, 179]

3.2. TDP-43 & FUS : Propriétés générales

3.2.1. Structure et localisation

TDP-43 est une protéine composée de deux motifs de reconnaissance à l'ARN (RRM) [180], un signal de localisation nucléaire (NLS), d'un signal d'export nucléaire (NES) [181] et d'un domaine C-terminal riche en glycine responsable des interactions homotypiques et hétérotypiques (*figure 7*) [139]. TDP-43 est une protéine principalement nucléaire en condition normale [139], mais en condition pathologique, une clairance nucléaire et une accumulation cytoplasmique peuvent être observées [137, 179, 181]. Généralement, ces inclusions contiennent une version tronquée et modifiée post-traductionnellement de la protéine [140]. Les mécanismes exacts menant à cette délocalisation ne sont pas encore clairement élucidés. TDP-43 circule entre le cytoplasme et le noyau de façon continue, pour faciliter le transport d'ARNm. L'interruption de ce mouvement semble être impliquée dans ce défaut de localisation. Les équipes de Barelle et de Lee ont démontré en 2008 que la partie C-terminale (le domaine riche en glycine) de la protéine est tout aussi importante que son NLS pour que TDP-43 soit correctement positionnée dans la cellule. A l'inverse, la perturbation de

la capacité de liaison à l'ADN ou à l'ARN n'a aucun impact sur la localisation de TDP-43. En revanche, la déplétion de son RRM N-terminal (RRM1) ou de son NES cause une dérégulation de sa dynamique nucléaire et la formation d'agrégats nucléaire [179, 181].

Les premières mutations de TDP-43 reliées à la pathologie ont été découvertes en 2008 [141, 142]. Aujourd'hui, plus d'une quarantaines ont été trouvées et à l'exception d'une, elles sont toutes retrouvées dans la partie C-terminale de la protéine [182]. Certaines mutations pathologiques sont suffisantes, mais pas nécessaires, à la relocalisation de l'expression de TDP-43 dans le cytoplasme. En effet, TDP-43 est recruté au sein d'inclusions cytoplasmiques dans 97 % des cas bien que les mutations affectant la protéine ne représentent que 5 % des patients [123, 143].

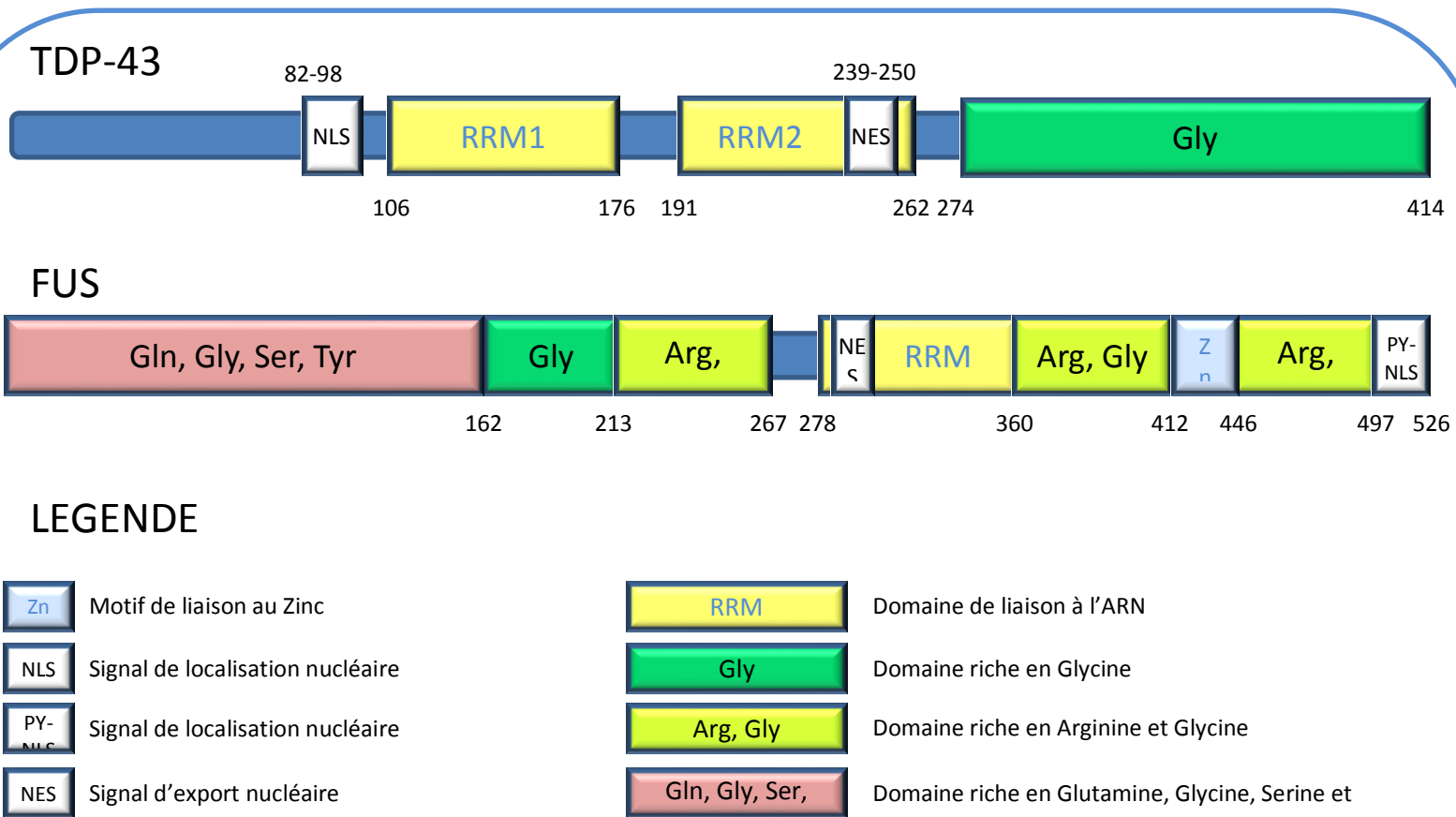


Figure 7: Structure protéique de TDP-43 et de FUS

FUS est composée d'un domaine riche en QGSY (Gln, Gly, Ser, Tyr), d'un unique RRM, de trois domaines RGG (répétition Arg-Gly-Gly), d'un domaine en doigts de zinc, d'un domaine de localisation nucléaire atypique (PY-NLS) et d'un signal d'export nucléaire prédictif [148, 183-185]. FUS est aussi une protéine principalement nucléaire [148] qui va pouvoir voyager entre le cytoplasme et le noyau [186]. L'équipe du Dr. Nukina a effectué un travail remarquable dans la caractérisation des domaines impliqués dans la localisation de FUS (*figure 7*). Elle a généré 27 constructions composées de combinaisons variées des différents domaines de FUS. Ainsi le retrait du PY-NLS va induire une relocalisation cytoplasmique de la protéine. Tandis que les déplétions respectives du domaine N-terminal QSYG, du RRM, du domaine à doigt de zinc, RGG2, RGG3 ou du RGG1 couplée au domaine riche en glycine n'ont pas d'effet sur la localisation de FUS [185]. L'équipe a aussi réalisé des combinaisons où les constructions contenant au moins le PY-NLS, s'expriment normalement au niveau nucléaire.

Les premières mutations de FUS, reliant la protéine à la SLA, ont été trouvées en 2009 [150, 151], et elles sont essentiellement retrouvées au niveau du signal d'export nucléaire [182]. Des mutations reliées à la SLA affectant FUS ont également pour effet de perturber son transport et par conséquent sa localisation de telle sorte que FUS se retrouve alors relocalisé au niveau d'inclusions cytoplasmiques [150, 151, 171, 187-190]. Lorsque sa transcription est inhibée, FUS demeure dans le cytoplasme.

3.2.2. heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP)

TDP-43 et FUS sont toutes les deux des hnRNP. Ce terme général décrit les protéines qui lient les hnRNA (heterogeneous nuclear RNA) mais qui ne sont pas des composants

stables des complexes RNP (ribonucleoprotein). Elles jouent un rôle important dans la structure hnRNA ou ARN pré-messagers et dans leur transport du noyau vers le cytoplasme. Les hnRNP sont les protéines les plus abondantes du noyau, de plus elles sont extrêmement conservées au cours de l'évolution [191]. Les hnRNP possèdent généralement un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARN, où chacune d'entre elles va avoir une affinité spécifique pour une ou plusieurs séquences ARN ou ADN. Les hnRNP forment des complexes multi-protéiques avec les chaînes naissantes d'ARNm (ARN pré-messagers) et sont généralement impliquées dans le métabolisme des ARNm. [191, 192].

En tant que hnRNP, TDP-43 et FUS sont toutes les deux capables de lier de l'ARNm et de l'ADN, et font partie intégrante du métabolisme des ARNm [139, 143, 193-195].

3.2.3. Autorégulation

Le maintien de l'homéostasie cellulaire nécessite un niveau finement régulé en TDP-43 et en FUS. Pour preuve, ces deux protéines sont capables de s'autoréguler par des mécanismes dits de rétrocontrôle.

Ainsi, l'équipe du Dr. Barelle a publié en 2011 des lignées cellulaires HEK293 stables sur-exprimant une copie de TDP-43 étiquetée, permettant l'induction de son expression. Après 24 à 72 heures d'induction de la protéine exogène (fonction de l'étiquette étudiée), l'expression de la protéine endogène est fortement réduite [196]. Cet effet de rétrocontrôle est aussi observé chez les souris transgéniques du laboratoire du Dr. Baloh [153] et serait dû à la liaison du RRM1 et du domaine C-terminal (acides aminés 321 à 366) à la séquence 3' UTR de son propre ARNm. Lorsque le niveau protéique de TDP-43 augmente, son ARNm est

séquestré dans le noyau et redirigé vers l'exosome où il sera dégradé [196, 197]. Un autre modèle de souris, publié par Dr. D. Cleveland montrent aussi une auto-régulation de TDP-43. Ici, les chercheurs montrent que TDP-43 lie son propre ARNm sur la séquence 3' UTR impliquant le mécanisme NMD (Non sense Mediated Decay) pour dégrader les ARNm « excédentaires » [198].

FUS est elle aussi capable de s'autoréguler en agissant directement sur son ARNm. La surexpression de la protéine FUS étiquetée GFP va induire une diminution de l'expression endogène de la protéine de 50%. En effet, FUS est un répresseur de l'inclusion de l'exon 7 de son propre ARNm et l'exclusion de cet exon dirige directement l'ARNm vers sa dégradation via le NMD (Non sense Mediated Decay) [199].

3.2.4. Liaison aux acides nucléiques

L'équipe du Dr. Gaynor a publié la première étude nommant TDP-43. Cet article porte sur l'analyse des facteurs régulant l'expression du VIH. En effet, les chercheurs visaient l'identification des facteurs pouvant se lier à la séquence ADN TAR du VIH. Cette séquence est importante pour la liaison de la protéine « tat » induisant le recrutement de facteurs de transcription permettant la transcription des protéines virales du VIH. Il semblerait que la liaison de TDP-43 empêche le recrutement adéquat de ces facteurs et bloquerait ainsi l'assemblage du complexe de transcription, aboutissant à sa répression [139]. De manière générale, les deux RRM de TDP-43 semblent être impliqués dans la liaison à l'ADN double et simple brin et lient de manière préférentielle les séquences riches en TG. En outre, TDP-43 fixe aussi l'ARNm suivant un motif contenant préférentiellement 3 répétitions UG et son affinité augmente avec le nombre de répétitions. Bien que les deux RRM soient capables de

s'associer à de l'ARNm de manière indépendante, la présence simultanée des deux RRM augmente de manière significative l'efficacité de cette liaison [180, 200].

FUS est, elle, capable de lier l'ADN simple et double brin [193, 201, 202] et reconnaît des structures quaternaires particulières comme les D-loop et les GC quadriplexes par exemple. La dérégulation de son activité de liaison à l'ADN pourrait être impliquée dans la genèse de translocations chromosomiques impliquées dans des leucémies [203]. FUS est aussi capable de lier l'ARNm ou les pré-ARNm. Pour ce qui est de la séquence consensus de liaison, de nombreux conflits sont présents dans la littérature. Quelques équipes ont trouvé un motif GGUG ou AUU, certaines sont enclines à favoriser une liaison sur des sites polyG et polyU ; d'autres concluent que la liaison de FUS se fait selon des séquences nucléotidiques peu spécifiques [183, 186, 203-206]. Le RRM de FUS est capable de fixer à la fois l'ADN et l'ARNm, cependant sa structure est assez atypique et ne ressemble pas au RRM classiques : une surface relativement grande de liaison aux acides nucléiques, et une boucle longue composée de motifs lysine-lysine. Ces particularités pourraient expliquer la capacité de FUS à s'associer aux acides nucléiques sans grande spécificité de séquence [184]. La liaison de FUS à l'ARNm semble toutefois en partie indépendante de son RRM, sa déplétion n'annihilant pas la liaison à l'ARNm [184]. En effet, les deux motifs RGG et le domaine en doigt de zinc de FUS sont eux aussi impliqués dans la reconnaissance et la liaison des ARNm [148, 204]. Enfin, le domaine de liaison au Zinc est celui qui lie de manière la plus efficace l'ARNm [27].

TDP-43 et FUS sont ainsi toutes les deux capables de lier à la fois l'ADN et l'ARNm. Si leur capacité de liaison à l'ADN n'est pas la fonction qui a retenu l'attention des chercheurs, plusieurs équipes se sont penchées sur l'identification de leurs ARNm cibles [198,

206-215]. D'une manière globale, TDP-43 et FUS lient chacune un tiers des ARNm cérébraux, mais n'ont qu'une quantité assez restreinte de cibles communes [138, 195, 206].

3.2.5. L'épissage

Chez les eucaryotes, l'épissage est le mécanisme nucléaire par lequel les introns contenus dans l'ARN pré-messager sont exclus afin de former un ARNm mature [216]. La découverte de ce processus qui fait intervenir des complexes multi-protéiques variés remonte à 1977 [217, 218]. Nonobstant l'élimination des introns, lors de l'épissage alternatif certains exons vont aussi être éliminés et aboutir à la formation de plusieurs d'ARNm matures de la protéine. Généralement les diverses isoformes sont exprimées dans des tissus différents ou à des stades développementaux spécifiques [216].

De nombreux exemples prouvent le rôle de TDP-43 dans l'épissage d'ARNm cibles via son domaine riche en glycine [219]. La première étude à démontrer le rôle de TDP-43 dans l'épissage a été réalisée en 2004. Dans ces travaux l'équipe du Dr. Pagani démontre que TDP-43 va induire l'exclusion de l'exon 9 de CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) aboutissant à la production d'une protéine non-fonctionnelle [220, 221]. Dans le cas de la protéine *sortiline*, le récepteur de la Progranuline, TDP-43 est aussi impliquée dans l'exclusion d'introns. En effet, la diminution de son expression amène une augmentation de l'inclusion de l'exon 17b entraînant elle-même un dysfonctionnement du récepteur [222]. A l'inverse, la diminution d'expression de TDP-43 induit l'exclusion de l'exon 3 de la protéine POLDIP3 (Polymerase delta-interacting protein 3) [223, 224]. La fonction d'épissage de TDP-43 serait principalement portée par ses motifs de reconnaissance de l'ARN (surtout le premier) et par son signal de localisation nucléaire. TDP-43 a une préférence pour les introns longs

[198] et les séquences riches en UG (au moins 6), mais la présence de ces séquences n'induit pas forcément l'implication de TDP-43 dans le processus d'épissage. Savoir si TDP-43 sera plutôt impliquée dans l'inclusion ou dans l'exclusion d'introns est dépendant de plusieurs autres facteurs [198, 225].

Comme TDP-43, FUS est elle aussi impliquée dans l'épissage alternatif via ses motifs RGG2-3 [204]. FUS peut aussi bien favoriser l'inclusion ou l'exclusion d'exon au niveau de ses ARNm cible. Ainsi, l'absence de FUS engendre l'inclusion des exons 3 et 10 dans la le gène *MAPT* [205], aboutissant ainsi à la formation de l'isoforme reliée à la démence frontotemporale [226]. La déplétion de FUS va aussi avoir pour effet l'exclusion des exons 15 et 16 dans le gène de la *caskin1* et de l'exon 11 pour *Ctnn* (Src substrate cortactin). A l'inverse, elle va provoquer l'inclusion des exons 6 et 7 du gène *Sh3kbp1* (SH3 domain-containing kinase-binding protein 1) et l'inclusion de l'exon 5 pour de la protéine *TIA-1* (T-cell-restricted intracellular antigen-1) [213, 214]. En outre, l'immuno-déplétion de FUS induirait un défaut d'épissage au niveau des ARN pré-messager de la *β -globine* (HeLa) ou de la *rubisco activase* (*Arabidopsis thaliana*) [227].

Ces actions de FUS sur l'épissage alternatif s'expliquent par le fait que FUS fait partie intégrante du complexe d'épissage composé des protéines PTB (Polypyrimidine tract-binding protein 2), SRm160 (Serine/Arginine related nuclear matrix protein of 160 kDa) et les protéines SR (SC35 et SRp75). FUS aiderait ainsi à l'assemblage et l'organisation du complexe. FUS aurait aussi pour fonction la sélection du site d'épissage [227, 228], et possède comme TDP-43, une préférence de liaison sur les introns longs [198, 206].

3.2.6. Stabilité des ARNm

TDP-43 et FUS possèdent aussi un rôle dans la stabilité de leur ARNm cibles. Par exemple, TDP-43 lie l'ARNm de hNF-L en lignée cellulaire ainsi que dans des homogénats de moelle épinière par son 3'UTR, et sur une région située entre les bases 135 et 185 suivant le codon stop . Cette interaction stabilise l'ARNm et le protège de la dégradation [229]. TDP-43 est aussi impliquée dans la stabilité de l'ARNm de CDK6 (Cyclin-dependent kinase 6). Sa déplétion aboutit à une accélération de la dégradation de l'ARNm de CDK6. Mais, lors d'une exposition aux UV, TDP-43 va interagir préférentiellement avec un autre ARNm (GADD7 ; Growth arrest and DNA damage-inducible protein 7) et ainsi délaisse celui de CDK6, induisant une déstabilisation du dit ARNm et aboutissant à sa dégradation [230].

Bien que FUS soit impliquée dans la stabilité chromosomique [173], rien n'est vraiment décrit en terme de régulation de la stabilité de ses ARNm cibles.

Enfin, étant donné que TDP-43 et FUS lient de nombreux ARNm via leur séquence 3'UTR [211], il est fort probable que ces deux protéines soient impliquées dans la régulation de la stabilité d'autres ARNm.

3.2.7. Transcription

Nous avons réalisé une analyse manuelle du « CLIP assay » publié en 2007 par l'équipe du Dr. Cleveland [207]. Sur les 527 interactions analysées, 54 sont des ARNm de facteurs impliqués dans la transcription, à la fois dans l'activation et dans la répression. Ces liaisons se font sur les séquences régulatrices suggérant que TDP-43 pourrait avoir un impact indirect sur la transcription. Cependant, il n'y a que peu d'étude à ce sujet.

Chez l'organisme modèle *C. elegans*, l'inactivation de l'homologue de TDP-43 (utilisation de la souche *tdp-1(ok803)*) montre une forte perturbation du profil d'expression génique. Ainsi, sur les 22 500 gènes étudiés par microarray 712 ont une expression affectée d'au moins 1,5 fois : 485 diminués et 227 augmentés. En revanche, lorsque les auteurs se basent sur une différence d'expression de 1,2 fois alors les chiffres augmentent fortement, et pas moins de 4 381 gènes se retrouvent affectés : 2 600 diminués et 1781 augmentés. Il est important de noter que l'une des voies de signalisation les plus affectées concerne le métabolisme des ARN [167]. De plus nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse selon laquelle ces changements pourraient être provoqués par un changement de stabilité de l'ARNm.

De par son implication dans le cancer, l'impact de FUS sur la transcription a déjà été étudiée de près. Ainsi l'addition de 30 ng de protéine FUS recombinante dans un système « cell free » diminue la transcription globale de 30 %. De manière plus spécifique cette addition entraîne une diminution de la production des ARNs_n U6 et ARNr_{5S} mais aussi de l'ARNt^{Met}, importants pour l'initiation de la traduction. Les mêmes résultats ont été reproduits via l'utilisation d'inhibiteur de l'ARN pol III. FUS exerce son action inhibitrice sur la transcription en interagissant avec la plus grosse sous-unité de l'ARN pol III, RCP155, ainsi qu'avec le facteur de transcription TBP (TATA-box-binding protein) au niveau du promoteur des gènes transcrits par l'ARN polymérase III. A l'inverse, la diminution d'expression de FUS corrèle avec une augmentation de la transcription par l'ARN polymérase III [231]. Enfin, l'absence de FUS cause aussi un arrêt prématuré de la transcription par l'ARN polymérase II, ainsi que la polyadénylation précoce des transcrits [232].

3.2.8. Droscha et les microARN

De nombreuses évidences relient les microARN aux maladies neurodégénératives (revue [233]) et il semble que leurs activités soit essentielles à la survie des neurones [234]. La déplétion de TDP-43 aboutit globalement à une baisse significative du niveau de microARN dans la cellule [235-237]. Selon les études, soit ce changement est indépendant du type cellulaire (HeLa, SH-SY5Y, N2a) [237], soit la diminution de microARN serait un effet davantage relié aux cellules de type « neuronal » différenciées [235, 236]. TDP-43 interagit avec les complexe Droscha et Dicer de manière partiellement indépendante de l'ARN. D'une part, ces interactions sont toutefois principalement orchestrées par le domaine C-terminal de TDP-43, les domaines de liaison à l'ARN et le domaine riche en glycine étant, pour leur part, dispensables [237]. D'autre part, la perte d'expression de TDP-43 semble avoir un effet drastique sur l'expression de Droscha dans les cellules de type « neuronal » différenciées et stabiliserait la protéine dans le but de prévenir sa dégradation. A l'inverse, ce même effet n'est pas observable sur Dicer [236]. Mais encore TDP-43 aiderait à recruter Dicer et Droscha au niveau de leur cible microARN précurseur [237].

Alors que l'équipe de Meida-Sato n'a trouvé aucune interaction entre FUS et Dicer ou Droscha [237], l'équipe de Bozzoni a démontré que sa présence favorise le recrutement de Droscha au niveau de microARN cibles. Ainsi une diminution de 45 % de l'expression de FUS aboutit à la diminution de l'expression des microARN. Par ailleurs, cette action de FUS ne semble pas être spécifique aux neurones [238].

3.2.9. Recrutement de TDP-43 et de FUS au niveau des GS

3.2.9.1. Recrutement des protéines endogènes

Par leur implication à divers niveaux dans le métabolisme des ARNm, un certain nombre de groupes ont cherché à savoir si TDP-43 et FUS sont recrutées au niveau des GS.

Tableau 1 : Localisation de TDP-43 aux Granules de Stress

type cellulaire		Stress	marqueur GS	visualisation de TDP-43	référence
HEK293T	glie corticale	0.4 M sorbitol, 1h	HuR, hnRNPA1, TIAR	surexpression endogène	+ [8]
BE-M17	HEK293	0.5 mM sodium arsenite, 1h Solution « Hanks balanced salt »	TIA-1, TIAR, PABP, eIF3	surexpression	[124]
NSC34		0.5 mM sodium arsenite, 30 min	TIA-1, HuR	endogène surexpression	+ [17]
		Choc thermique, 44 °C, 30 min			
		10 µM MG132, 4h			
HeLa	SK-N-SH	0.5 mM sodium arsenite, 30 min	TIA-1	endogène surexpression	+ [11]
		Choc thermique, 43 °C, 30 min			
		1 µM Thapsigargine, 50 min			

Entre 2010 et 2012, cinq équipes se sont intéressées à établir un lien entre TDP-43 et les GS. Elles ont utilisé des lignées cellulaires, des stress, et des marqueurs de GS différents. A partir de ces études, il s'avère que TDP-43 est recrutée au niveau des GS en condition de stress du réticulum endoplasmique, oxydatif, osmotique, thermique, mitochondrial, et lors de l'inhibition du protéasome. Chacune des études a utilisé des marqueurs de GS différents, mais

s'accordent toutes sur le fait que TDP-43 n'est aucunement recrutée au niveau des PB (*tableau 1*). Son recrutement se fait concomitamment par son RRM1 [17] et son domaine C-terminal riche en Glycine [8, 17], ce qui implique à la fois son interaction avec les ARNm (par son RRM1) et avec d'autres protéines (C-terminal). Toutefois bien qu'une équipe ai démontré que la surexpression de TDP-43 puisse induire la formation de « GS constitutifs » [124], deux autres attestent du contraire [17, 239]. La déplétion de TDP-43 n'empêche pas la formation des GS bien qu'elle soit ralentie et le désassemblage accéléré bien que les inclusions formées soient plus petites et leur morphologie plus irrégulière [11].

Tableau 2 : Localisation de FUS aux Granules de Stress

type cellulaire		Stress	marqueur GS	visualisation de FUS	référence
HeLa	HT-1080	0.5 mM SA, 1h	TIA-1	protéine sauvage endogène	[240]
		Choc thermique, 44 °C, 1h			
SH-SY5Y	neurones hippocampaux primaires	Choc thermique, 44 °C, 1h	TIA-1	surexpression protéines mutantes	[27]
		0.5 mM sodium arsenite, 30 min			
		20 µM Clotrimazol, 30 min			
HEK293		0,5 mM sodium arsenite 1h	TIAR	surexpression protéine sauvage et mutantes	[29]
		10 µM Thapsigargine 2h			
		Choc thermique 42,5 °C, 30 min			
embryon de poisson		Choc thermique 42,5 °C, 45 min			

FUS est elle aussi recrutée au niveau des GS dans certaines circonstances (*tableau 2*). L'équipe du Dr. Hayward a montré que le recrutement de FUS aux GS est accentuée en présence de mutations. Alors que GFP-FUS^{sauvage} n'est recruté que dans moins de 10 % des GS marqués par TIAR. Il semble que le recrutement de FUS au niveau des GS soit dépendant

de sa capacité de liaison aux ARNm [27, 240]. A noter que FUS ne colocalise pas avec le marqueur des PB GE-1/hedls [29].

Les cas de SLA reliés à TDP-43 et FUS font partie des plus fréquents. Cependant, la génétique seule ne permet d'expliquer qu'une minorité des cas (5 % des cas familiaux chacun). Hors les « TDP-opathie » et les « FUS-opathie » -cas présentant des inclusions de ces deux protéines- représentent à elles seules 98 % des cas [138]. Ces deux protéines, ont un rôle prépondérant dans le métabolisme des ARNm, et leur recrutement au niveau des GS en condition de stress nous incline à penser qu'elles pourraient aussi avoir un certain impact dans la réponse au stress cellulaire. Une des hypothèses très en vogue à l'heure actuelle est que l'exposition au stress pourrait être un facteur déclencheur de la SLA. De ce fait TDP-43 et FUS se placeraient au croisement entre les prédispositions génétiques et les stress environnementaux.

3.2.9.2. Les mutants et la réponse au stress

Savoir si TDP-43 ou FUS agissent via un gain ou une perte de fonction est toujours matière à débat. Comme début de réponse certaines équipes ont analysé l'effet de la surexpression de mutants ou de la protéine sauvage sur le phénotype des GS [8, 124, 239, 241].

Les résultats attestent que la surexpression en elle-même de TDP-43 sauvage va induire une augmentation de la mort cellulaire (activation des caspases 3/7). Cette augmentation n'est pas significativement différente de celle induite par l'expression de mutants en condition basale. Par contre l'exposition au stress entraîne une augmentation de la

mort cellulaire via l'activation des caspases 3/7 seulement dans les cellules surexprimant les mutants TDP-43 [124]. Il semble que l'expression des mutants TDP-43 reliés à SLA augmente aussi la taille des GS comparativement au contrôle. Néanmoins, dans ces études les auteurs n'incluent pas les cellules non transfectées, donc il est difficile de déterminer l'impact de la surexpression par rapport celui des mutations [8, 124].

Des études, effectuées par le laboratoire du Dre. Bosco, s'intéressent à l'impact de l'expression de mutants FUS sur la dynamique des GS. Premièrement la protéine FUS sauvage (endogène ou surexprimée) se localise peu ou pas au GS en réponse à un stress oxydatif, thermique ou du réticulum endoplasmique [29, 241, 242], et la déplétion de la protéine n'abolit pas la formation des GS [242]. Cependant, l'expression de mutants augmente de manière considérable le nombre de cellules formant des GS [29]. De plus, l'expression du mutant FUS^{R495X} induit la formation de GS qui sont 1,4 fois plus gros et 27 % plus abondants que ceux formés dans les cellules exprimant FUS sauvage. Or, la capacité de formation des GS est affectée dans les cellules mutantes. En effet l'assemblage des GS est retardé et le désassemblage, plus rapide. A l'aide d'expérience de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), les auteurs se sont penchés sur la dynamique d'échange protéique entre les GS et le cytoplasme dans ce cadre de l'expression du mutant FUS^{R495X}. Bien que les GS soient plus gros, la dynamique d'échange de TIA-1 et de G3BP1 est plus rapide qu'avec l'expression de la protéine FUS sauvage. Ce qui signifie que les interactions protéiques sont plus labiles et explique très certainement les défauts de formation et de désassemblage [241].

4. Introduction de l'étude

TDP-43 et FUS ne sont pas les seules protéines reliées à la pathologie qui se retrouvent recrutées au niveau des GS en réponse à un stress. Les protéines VCP (Valosin-containing protein) [77, 78, 243], SMN (Survival motor neuron) [244, 245], hnRNPA1 et hnRNPA2 (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, A2) [11, 246], TAF15 (TATA-binding protein-associated factor) [240, 247] peuvent aussi être recrutées au niveau des GS. De ce fait nous nous sommes demandé si une dérégulation de la réponse au stress via un impact sur la formation / fonction des GS pourrait être à l'origine du déclenchement de la pathologie. Nous nous sommes penché sur l'étude de TDP-43 et de FUS dans ce contexte.

Le domaine d'étude liant TDP-43 et FUS à une perturbation des GS est un domaine d'étude très dynamique. Cependant, une majorité des publications ne s'intéresse qu'à l'effet des mutations de ces deux protéines sur la formation des GS [8, 124, 239, 241]. Or actuellement, savoir si TDP-43 et FUS agissent via une perte ou un gain de fonction est toujours sujet à débat. C'est pourquoi, nous avons choisi une approche par perte de fonction, pour étudier l'impact de ces deux protéines sur la formation et fonction des GS. En étudiant un des mécanismes supposé de toxicité, cette approche nous permet aussi de mettre en évidence le rôle de la protéine endogène dans ce processus.

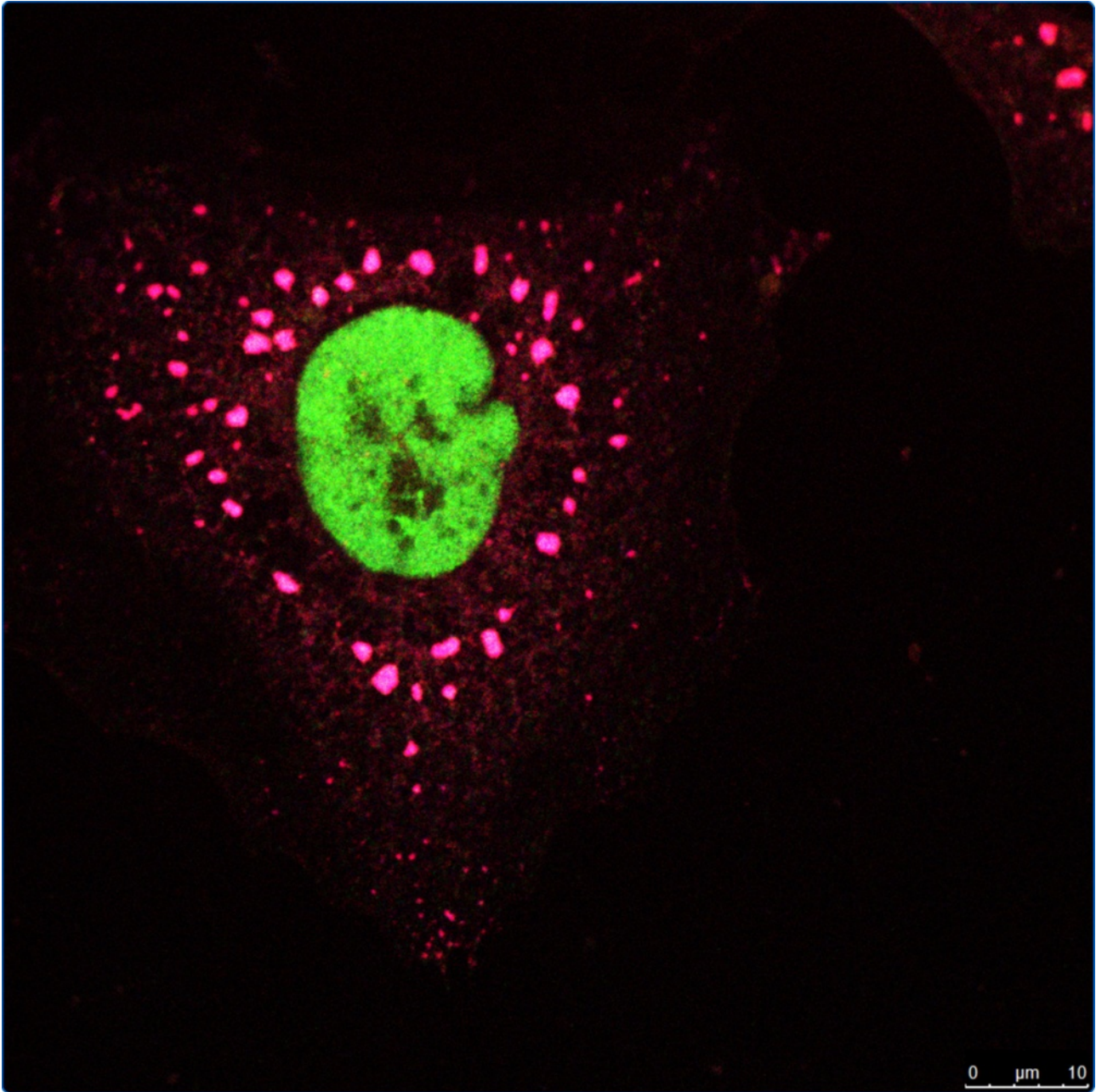
Cette étude a commencé au tout début de l'intérêt porté à TDP-43 dans le contexte des GS. En effet, alors que TDP-43 et FUS sont reliés à la SLA à partir de 2006 et 2009 respectivement [123, 140-142, 150, 151] la première étude les rapportant dans les GS date de fin 2009 pour TDP-43 [17] et fin 2010 pour FUS [29]. La première publication du laboratoire sur le sujet arrive en 2011 et c'est la première se basant essentiellement sur la perte de

fonction de TDP-43 [11]. De plus, la plupart des publications se focalisent uniquement sur un point de la cinétique de formation des GS. La force de nos études est de s'inscrire dans une cinétique afin de suivre l'intégralité de la formation des GS et de leur fonction.

Aulas et al,

« Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP »

Molecular Neurodegeneration 2012



Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP

Aulas *et al.*

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP

Anais Aulas¹, Stéphanie Stabile¹ and Christine Vande Velde^{1,2*}

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by the selective loss of upper and lower motor neurons, a cell type that is intrinsically more vulnerable than other cell types to exogenous stress. The interplay between genetic susceptibility and environmental exposures to toxins has long been thought to be relevant to ALS. One cellular mechanism to overcome stress is the formation of small dense cytoplasmic domains called stress granules (SG) which contain translationally arrested mRNAs. TDP-43 (encoded by *TARDBP*) is an ALS-causative gene that we have previously implicated in the regulation of the core stress granule proteins G3BP and TIA-1. TIA-1 and G3BP localize to SG under nearly all stress conditions and are considered essential to SG formation. Here, we report that TDP-43 is required for proper SG dynamics, especially SG assembly as marked by the secondary aggregation of TIA-1. We also show that SG assembly, but not initiation, requires G3BP. Furthermore, G3BP can rescue defective SG assembly in cells depleted of endogenous TDP-43. We also demonstrate that endogenous TDP-43 and FUS do not have overlapping functions in this cellular process as SG initiation and assembly occur normally in the absence of FUS. Lastly, we observe that SG assembly is a contributing factor in the survival of neuronal-like cells responding to acute oxidative stress. These data raise the possibility that disruptions of normal stress granule dynamics by loss of nuclear TDP-43 function may contribute to neuronal vulnerability in ALS.

Keywords: TDP-43, Stress granules, FUS/TLS, G3BP, TIA-1, ALS, Cell death, Oxidative stress

Background

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a late-onset neurodegenerative disease characterized by the selective loss of upper and lower motor neurons. It is inevitably fatal with patients experiencing a progressive and rapid paralysis owing to a relentless denervation of nearly all muscles. ALS can be either inherited with 10% of cases having a familial history, or be sporadic where etiology remains unknown but exposure to environmental stresses are strongly suspected to be relevant [1]. Of the familial cases, ~4% are due to mutations in *TARDBP*, encoding TAR DNA Binding Protein (TDP-43) [2,3]. Interestingly, a proportion of sporadic ALS cases have also been attributed to TDP-43 mutations [2,3]. TDP-43 is a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) and is

reported to function in multiple aspects of RNA metabolism including transcription, splicing, and stabilization [4]. Mutations in a second hnRNP, FUS/TLS (Fused in sarcoma/translocated in sarcoma), are also causative for ALS [5,6]. TDP-43 and FUS are expected to function similarly in RNA metabolism [4].

Mammalian cells possess a variety of mechanisms to mediate cellular recovery following stress exposure. One process is the transient formation of stress granules (SG), small cytoplasmic inclusions ($\leq 5 \mu\text{m}$) that rapidly form following exposure to chemical, viral or thermal stress [7,8]. SG contain several RNA-binding proteins, stalled pre-initiation complexes and translationally arrested mRNAs. They are believed to function as sites for mRNA storage and sorting, permitting a rapid re-integration of these stalled pre-initiation complexes once the stress has been cleared [8]. SG formation is a highly regulated process that is initiated by the self-oligomerization of the core SG proteins G3BP (RasGAP SH3 domain binding protein 1) and TIA-1 (T-cell intracellular antigen) within 15-20 min of stress exposure

* Correspondence:

¹Centre d'excellence en neuromusculaire de l'Université de Montréal, Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Departments of Medicine and Biochemistry, Université de Montréal, 1560 rue Sherbrooke Est, Montréal, QC H2L 4M1, Canada

²CHUM Research Center (CRCHUM), Université de Montréal, 1560 rue Sherbrooke Est, Montréal H2L 4M1, Canada

[9,10]. In the case of acute oxidative stress, several small SG fuse into fewer but larger SG over the next 60 min. This secondary aggregation is referred to as SG assembly [8]. By 2 hours post-stress exposure, SG disassemble and cellular processes return to normal [11,12]. Thus, SG are a transient mechanism to halt general protein translation and give translational priority to specific transcripts that are necessary for the cell to overcome the encountered stress [11].

Efficient SG kinetics are considered imperative to cell survival following exposure to a variety of physiological and environmental stresses [13-15]. Impaired SG signaling as a contributing factor in neurodegenerative diseases has been previously documented. Specifically, depletion or mutation of FMRP, the gene responsible for the neurological Fragile X syndrome, induces a severe impairment in SG dynamics [16]. A variant in SMN responsible for the motor neuron disease spinal muscular atrophy (SMA) fails to be recruited normally to SG in SMA patient cells [17]. Ataxin-2, mutated in spinocerebellar ataxia type 2 and recently linked as a susceptibility gene for ALS, localizes to and regulates SG formation [18-22].

TDP-43 and FUS both localize to SG in response to oxidative, thermal, osmotic, and proteasomal stress [12,23-28]. TDP-43 is localized to cytoplasmic inclusions in post-mortem tissue from ALS patients and since some of these inclusions are also positive for SG markers, some have suggested that deregulation of SG may drive inclusion formation [23,29,30]. However, in a cell-based assay, very few TDP-43 positive SG actually proceed to aggregate formation [30]. Thus, it is important to remember that the other striking pathological feature observed in patient motor neurons is the depletion of the nuclear pool of TDP-43. Whether TDP-43 mutations are a gain or loss of function (or both) is currently a matter of debate [4,31,32]. However, it has recently been proposed that TDP-43 pathogenesis might arise from a loss of nuclear TDP-43 function (and/or gain of cytoplasmic function) [31]. In fact, data from yeast to rodents indicates that TDP-43 mediated toxicity correlates better with a loss of normal TDP-43 function than with the presence/generation of TDP-43 cytoplasmic aggregates [31,33]. TDP-43 is primarily localized to the nucleus. Thus, in order to mimic the nuclear depletion that is universally observed in neurons of patient brains and spinal cords [34,35], we have employed siRNA-specific depletion of TDP-43 as a model of loss of nuclear function. Using this system, we have previously demonstrated that TDP-43 modulates the expression of the core SG factors G3BP and TIA-1 [12]. Here, we have addressed the role of endogenous TDP-43 in SG formation and assembly in response to oxidative stress documenting that endogenous TDP-43 and FUS do not have

overlapping functions in this process. Furthermore, we report that the TDP-43 target gene G3BP is required for SG assembly but not initiation. Surprisingly, we demonstrate that blocked SG assembly (secondary TIA-1 aggregation) has a differential effect on the survival of neuronal and non-neuronal cells responding to acute oxidative stress exposure.

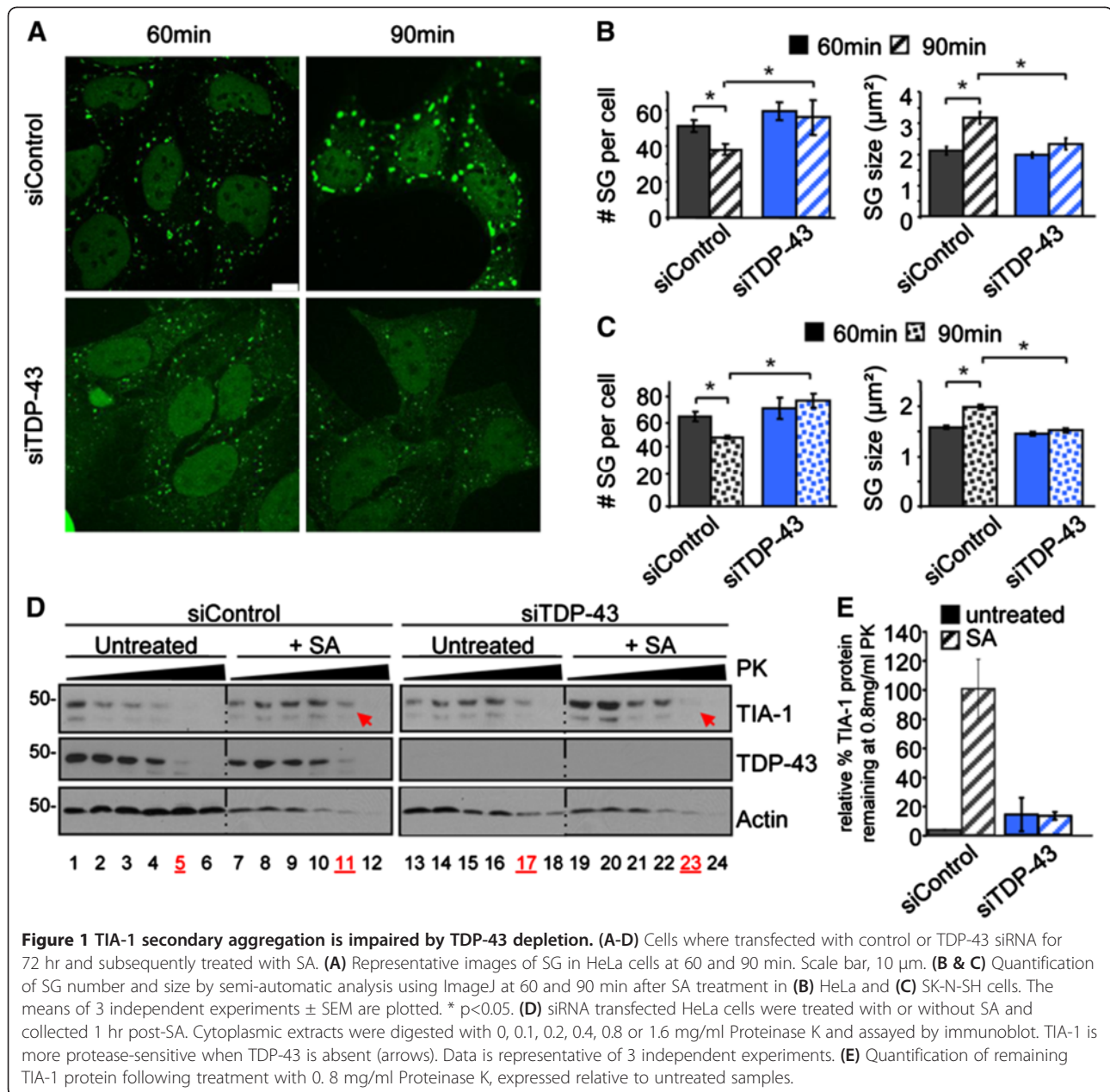
Results

Endogenous TDP-43 regulates SG assembly as marked by secondary TIA-1 aggregation

We have previously demonstrated that TDP-43 depletion leads to a defect in the timing of SG formation in response to acute oxidative stress induced by sodium arsenite (SA) treatment [12]. In addition, we reported that SG in TDP-43 depleted cells assayed immediately after the stress were 43% smaller than control cells [12], but the number of SG per cell is comparable to siControl cells (73.4 ± 3.6 vs. 82.2 ± 6.4 , $p = 0.15$). These data suggest a potential role for TDP-43 in SG dynamics. It is well documented that following initial SG formation, SG slowly reduce in number but each individual SG increases in size before resolving. This SG size increase is attributed to the fusion of multiple TIA-1 oligomers and is referred to as SG assembly [8]. However, the mechanism(s) which mediate this step is unclear.

Building on our previous published data in which we validated two independent TDP-43 specific siRNAs, we selected one of these siRNAs for transfection into HeLa cells and then subsequently stressed the cells for 30 min with 0.5 mM SA followed by recovery with fresh media. Cells were subsequently fixed at 60 and 90 min and SG were visualized with TIA-1 labelling (Figure 1A). In HeLa cells transfected with control siRNA (siControl), we observed an average of 84 ± 5 SG per cell with an average size of $1.9 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$ at 60 min, followed by a reduction in SG number (60 ± 6 SG, $p = 0.005$) and an increase in SG size (to $3.0 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$, $p = 0.009$) at 90 min (Figure 1B). This simultaneous decrease in SG number and increased SG size is due to the secondary aggregation of TIA-1 oligomers and is referred to as SG assembly [8]. In cells depleted of endogenous TDP-43, SG assembly is blocked such that SG number and size remains unchanged at both time points examined (Figure 1B). A second TDP-43 targeted siRNA also yielded the same results (Additional file 1: Figure S1). Moreover, this blockade in SG assembly was also true in SK-N-SH cells, a neuronal-like cell line (Figure 1C).

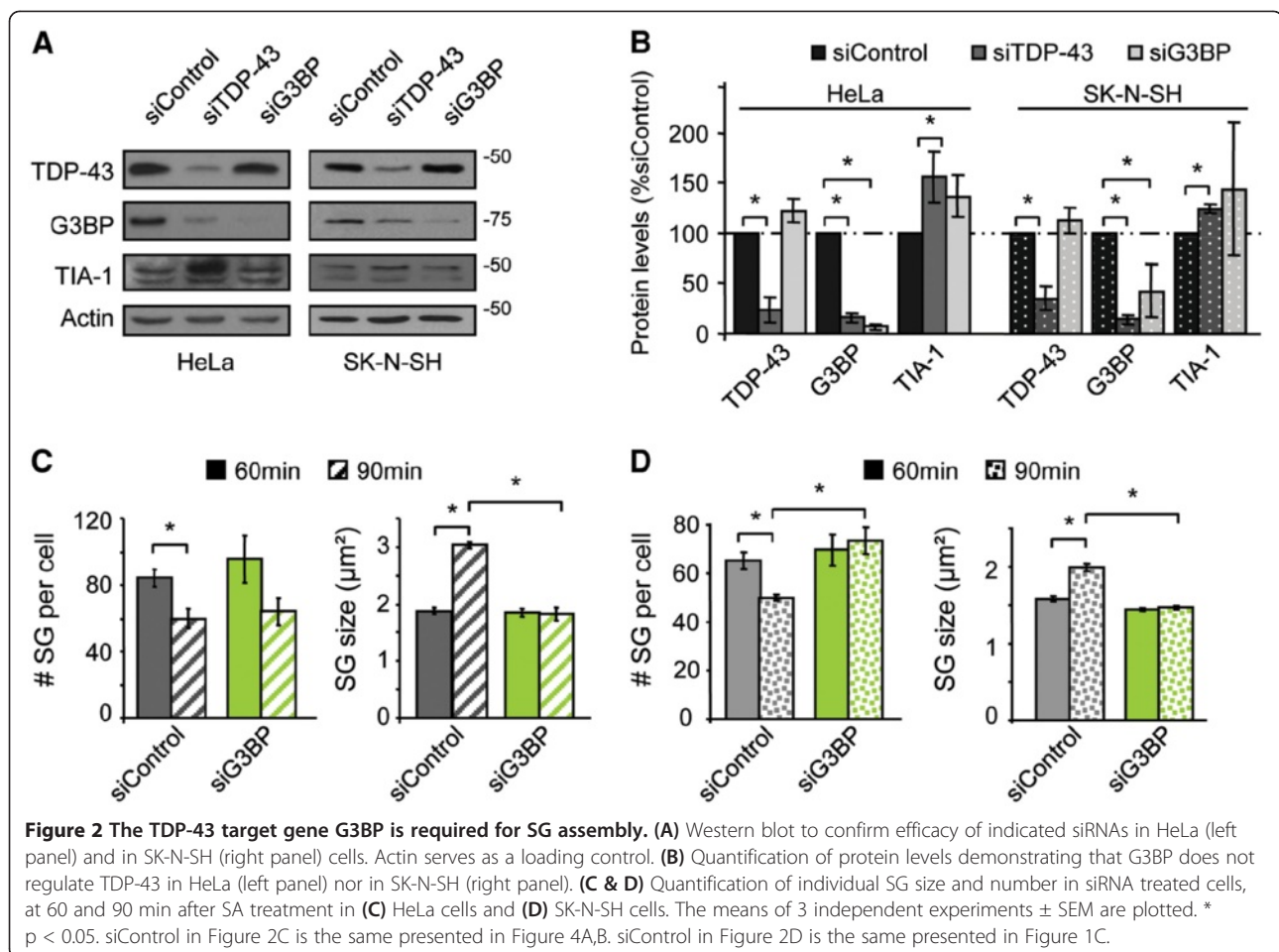
To further evaluate whether TIA-1 oligomerization was disrupted in SG assembly, we performed a protease sensitivity assay. Briefly, SG assembly is reflected as increased TIA-1 aggregation and thus increased protease resistance [9,36]. Cells transfected with TDP-43 or control siRNA were stressed with SA and then permitted to



recover for 60 min before cytoplasmic fractions were subject to a titration of Proteinase K (PK) and blotted for TIA-1. In siControl cells, we observed an increased resistance of TIA-1 to proteolysis between stressed and unstressed cells (Figure 1D, compare lanes 5 and 11; Figure 1E). In contrast, TIA-1 protease-sensitivity in SA-treated TDP-43 depleted cells was comparable to untreated cells, indicating decreased TIA-1 aggregation and thus impaired SG assembly (Figure 1D, compare lanes 11 and 23, red arrows; Figure 1E). Collectively, these experiments demonstrate that endogenous TDP-43 is required for normal SG assembly.

The TDP-43 target G3BP is required for SG assembly but not initiation

We have previously reported that G3BP is down-regulated in cells depleted of TDP-43 via two independent siRNAs [12]. We hypothesized that the SG assembly defect observed in TDP-43 depleted cells could be attributed to decreased G3BP expression. To address this, we reduced G3BP levels using a gene-specific siRNA to levels comparable to cells treated with TDP-43 siRNA (remaining G3BP protein in siG3BP vs. siTDP-43 in HeLa cells: $p = 0.08$; in SK-N-SH: $p = 0.32$; Figure 2A, B). Importantly, we noted that G3BP depletion does not impact TDP-43 expression



(HeLa: $p = 0.071$, SK-N-SH: $p = 0.21$; Figure 2A, B). G3BP is considered essential for SG initiation based on studies where overexpression of G3BP is sufficient to nucleate SG [10]. However, unlike TIA-1, which is required for SG initiation, the impact of G3BP on SG initiation by either siRNA or genetic deletion has not been reported. To define if G3BP is necessary for SG initiation at endogenous expression levels, we counted the number of SG per cell and measured SG size in G3BP-depleted conditions immediately following a 30 min SA exposure. We observed that the number of SG per cell was equivalent in siControl and siG3BP cells (113 ± 3 vs. 117 ± 11 SG per cell, $p = 0.373$, Additional file 2: Figure S2). Moreover, we did not detect a difference in initial SG size (1.7 ± 0.1 vs. $1.8 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$, $p = 0.398$, Additional file 2: Figure S2). Since SG composition can vary between cell types, we also evaluated SK-N-SH cells and observed strikingly similar results with respect to SG number (55 ± 8 vs. 63 ± 13 SG per cell, $p = 0.332$) and size (1.43 ± 0.01 vs. $1.42 \pm 0.03 \mu\text{m}^2$, $p = 0.366$). Together, these data indicate G3BP is a non-essential factor in the initiation of SG in response to acute oxidative stress induced by SA.

To evaluate the role of G3BP in SG assembly, we quantified the number of SG per cell as well as individual SG size at 60 and 90 min after SA treatment. Visual inspection of SG by confocal suggested a difference in SG number and size in siG3BP cells compared to controls. Quantification of individual SG in these cells revealed that the number and the size of SG in siG3BP HeLa cells is comparable to siControl cells at 60 min ($p = 0.243$ and $p = 0.400$, respectively; Figure 2C). In contrast, while average SG size increases 1.6-fold in siControl cells ($p = 0.004$) as expected, siG3BP cells remain constant at $1.9 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$. We obtained similar results with a second siRNA for G3BP (Additional file 1: Figure S1) and in SK-N-SH cells (Figure 2D) indicating that the requirement of G3BP for SG assembly is not a cell-type specific event. Taken together, our data demonstrate G3BP as an important factor in SG assembly, but not SG initiation as previously suggested.

G3BP rescues the defect in SG assembly observed in TDP-43 depleted cells

Our previous work indicated that TDP-43 depletion using two independent siRNAs resulted in a robust and

reproducible decrease in G3BP expression [12]. To investigate whether the defect in SG assembly observed in TDP-43 depleted cells could be attributed to G3BP, we transiently expressed GFP-tagged G3BP in TDP-43 depleted cells, at a level comparable to endogenous G3BP expression (Figure 3A). Using our conditions, where we transfected 0.3 μ g of G3BP-GFP cDNA for 24 hr, we detected cells of both high and low expression by immunofluorescence. Consistent with a previous report, G3BP overexpression at high levels induces the spontaneous formation of SG [10] (Figure 3B, *asterisks*) such that $60 \pm 0.4\%$ of transfected cells formed SG in the absence of SA treatment (Figure 3C). Interestingly, we noted that the depletion of TDP-43 resulted in a 1.9-fold reduction in the number of cells with spontaneous SG formation suggesting that endogenous TDP-43 participates in this process ($p = 0.0006$).

In order to address our initial hypothesis that G3BP mediates SG assembly in TDP-43 depleted cells, we selected transfectants with low G3BP-GFP expression for further analysis. Low expression was defined via measurement of the GFP signal in individual cells. Cells having an average pixel intensity below 60 arbitrary fluorescent units were uniquely included in the subsequent quantification. This population of low-expressing G3BP-GFP cells do not exhibit spontaneous SG formation (Figure 3B, *arrowheads*). As expected, cells co-transfected with control siRNA and control GFP cDNA undergo normal SG assembly while siTDP-43 cells transfected with GFP cDNA demonstrate a defect in SG assembly (Figure 3D-F). The low expression of G3BP-GFP in TDP-43 depleted cells restored the number and size of SG at 90 min to levels equivalent to controls, indicating a restoration of SG assembly (Figure 3E, F). Thus, the defect in SG assembly in TDP-43 depleted cells can be rescued by G3BP expression. These data indicate that G3BP functions downstream of TDP-43 in SG assembly.

SG formation and assembly does not require endogenous FUS

There have been several reports that a second ALS-causing gene FUS/TLS, which is an hnRNP like TDP-43, localizes to SG in response to oxidative stress [26-28]. All of these studies demonstrated SG localization of over-expressed FUS protein, but do not evaluate the contribution of endogenous FUS to this process. Since there is suggestion that TDP-43 and FUS participate in similar biological processes [37-40], we investigated the potential role of endogenous FUS in SG dynamics in response to oxidative stress using siRNA depletion in HeLa cells. We did not observe any difference in the number of cells able to form TIA-1 labelled SG in response to SA treatment at any time point examined

(data not shown). Furthermore, SG initiation (number and size at 30 min) was undisturbed in cells depleted of FUS (Additional file 2: Figure S2). Similarly, SG assembly proceeded normally as SG number and size were similar between siControl and siFUS cells at 60 and 90 min post-stress (Figure 4A, B). These data were confirmed with a second siRNA specific for FUS (Additional file 1: Figure S1). Since TDP-43 depletion can alter the expression of TIA-1 and G3BP [12], we also evaluated the levels of these proteins in siFUS cells. FUS depletion (92% in HeLa and 68% in SK-N-SH) did not impact TIA-1 or G3BP protein expression in HeLa or SK-N-SH cells (Figure 4C, D). We also noted that FUS depletion does not impact the expression of endogenous TDP-43 (Figure 4C, D) nor does it impact TDP-43 localization to SG (data not shown). We conclude that endogenous wild type FUS does not participate in SG initiation or assembly in response to acute oxidative stress.

TDP-43 mediates cellular vulnerability to oxidative stress in neuronal-like cells

SG comprise one arm of an integrated cellular stress response. Previous data indicate that a failure in SG dynamics (meaning formation, assembly, or disassembly) contributes to poor cellular recovery to acute stress [13-15]. We have previously shown that TDP-43 contributes to cell survival 24 hr after stress exposure [12]. To determine if this was a short- or long-term requirement and whether this was exclusive to TDP-43, we extended these studies such that cells transfected with specific siRNAs for 48 hr were stressed (SA, 30 min) and then assessed for cell viability at 24 and 48 hr by trypan blue exclusion. In all cases, robust depletion of TDP-43, G3BP, and FUS was achieved by the respective siRNAs (Figure 5A, C). In the case of TDP-43 depleted HeLa cells, we noted a 1.9-fold increase ($p = 0.01$) in cell death in unstressed conditions at 48 hr while no significant differences in viability were detected in siG3BP or siFUS cells (Figure 5B). When challenged with SA treatment, siTDP-43 cells fared worse than siControl cells 24 hr later and cell death was further increased to 2.3-times siControl cells at 48 hr (24 hr: $p = 0.02$; 48 hr: $p = 0.01$, Figure 5B). Depletion of FUS had no impact on cell viability at any time point, consistent with our data that endogenous FUS is not required for a SG response. Surprisingly, depletion of G3BP did not impact cellular recovery to oxidative stress in HeLa cells (Figure 5B). However, additional experiments in the neuronal-like cell line SK-N-SH revealed similarly increased cell vulnerability 48 hr post-SA treatment in both TDP-43 and G3BP depleted cells (siTDP-43: 2.3-fold, $p = 0.019$; siG3BP: 2.6-fold, $p = 0.005$) (Figure 5D). In contrast, as in HeLa cells, FUS depletion had no effect on survival in these neuronal-like cells. Thus, neuronal-like cells seem

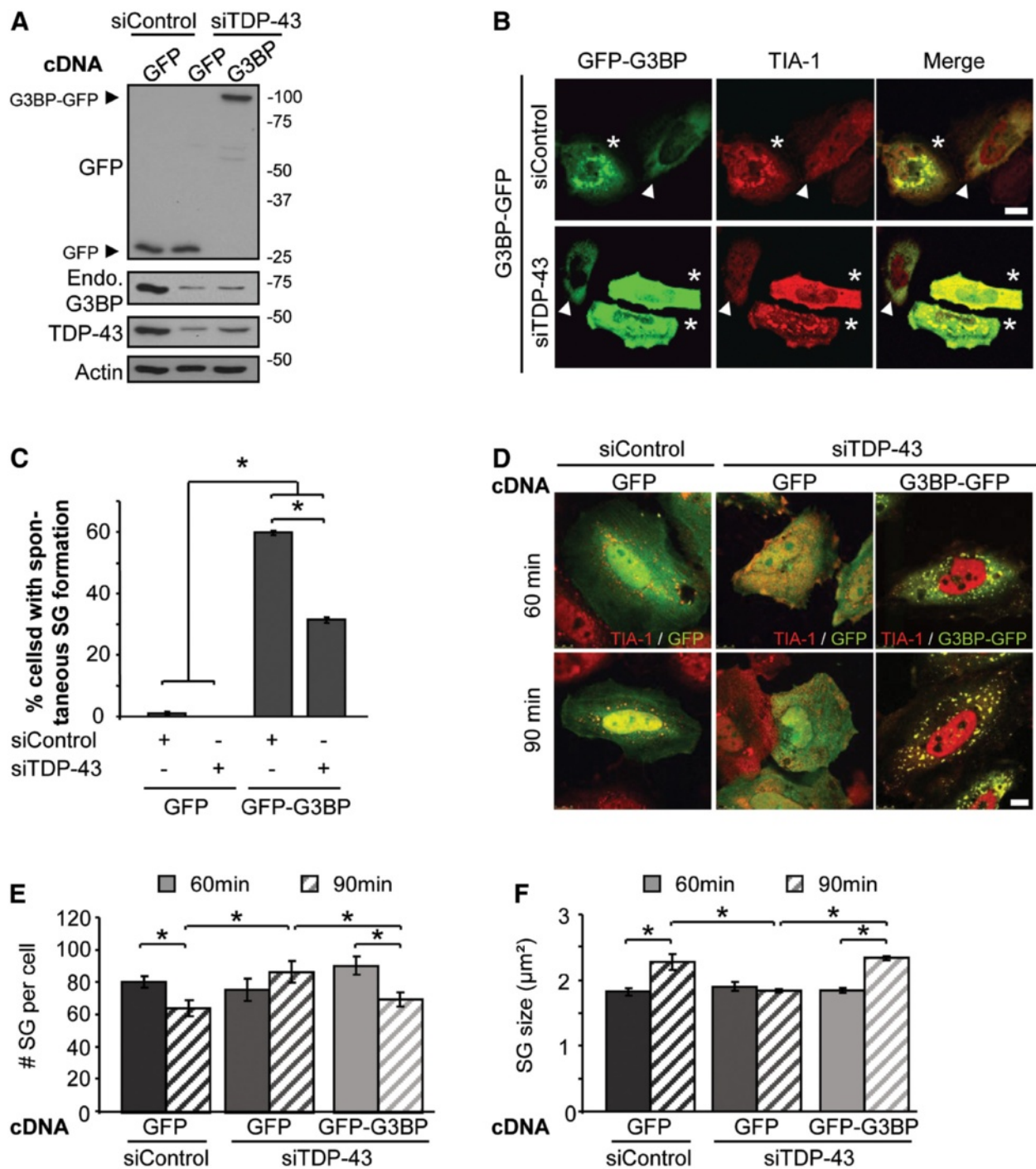
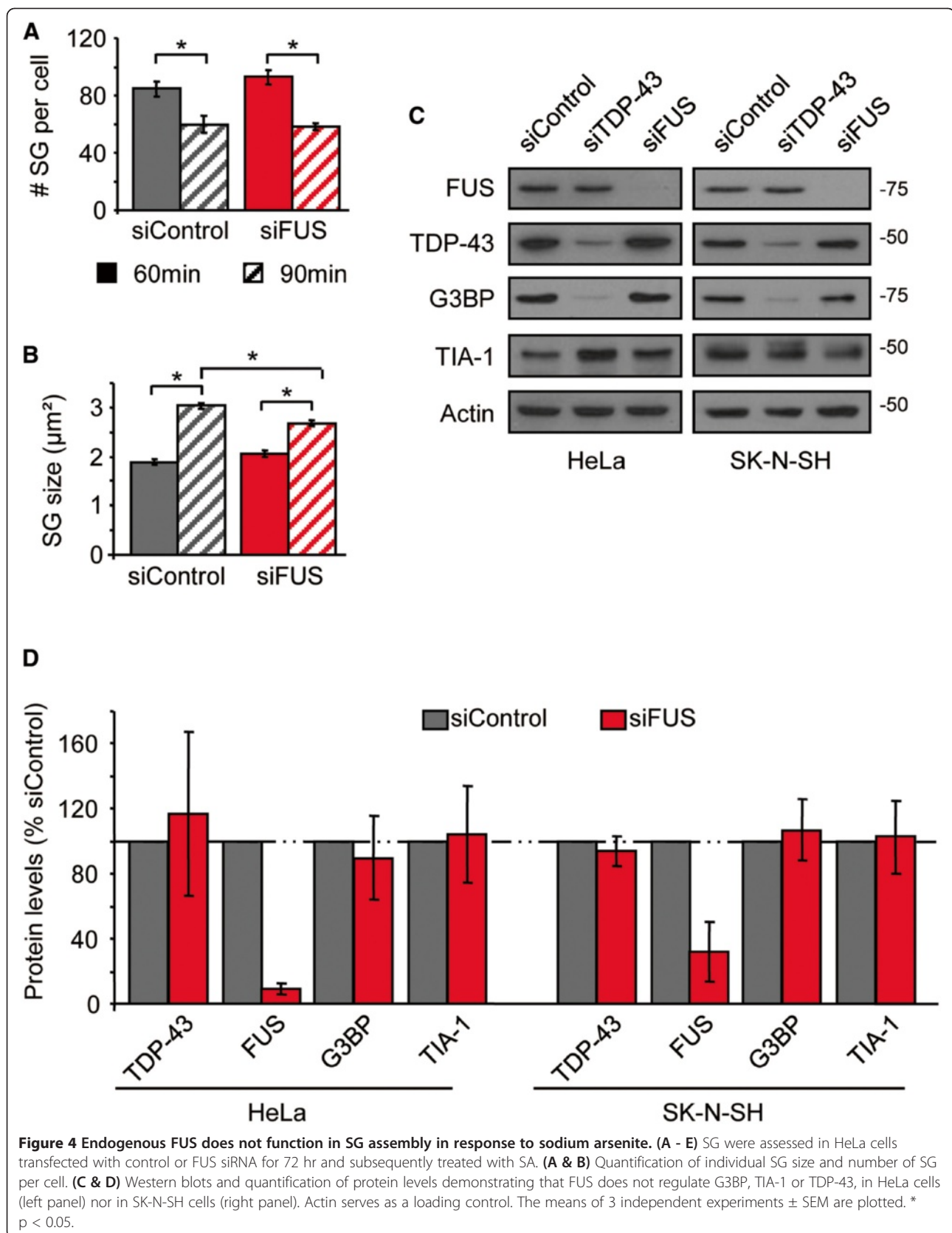
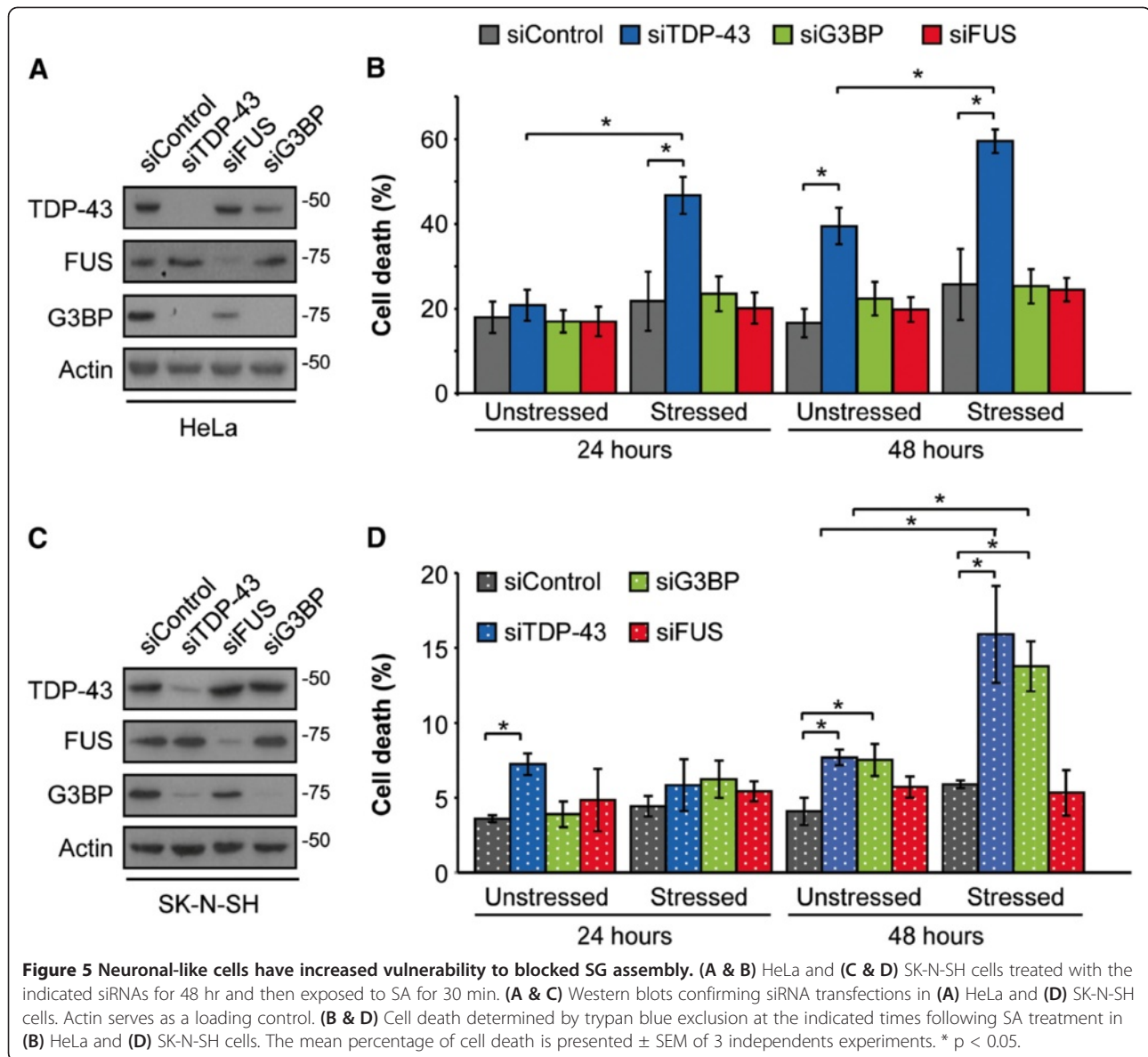


Figure 3 Blocked SG assembly in TDP-43 depleted cells is rescued by G3BP-GFP. (A - F) SG formation and resolution were assessed in HeLa cells transfected with control or TDP-43 siRNA for 48 hr, transfected with GFP or G3BP-GFP for 24 hr and subsequently treated with SA. Coverslips were collected before SA treatment (A - C) and at 60 and 90 min after stress (D - F). (A) Western blot confirming expression of transfected plasmids. Actin serves as a loading control. (B) Representative micrographs of quantified cells with spontaneous SG formation. Asterisks and arrows indicate cells expressing G3BP-GFP with or without spontaneously forming SG, respectively. Scale bar, 20 µm. (C) Quantification of cells with spontaneous SG formation (SG formation in the absence of stress). Cells were scored as SG positive when they had at least two TIA-1 foci of a minimal size of 0.75 µm². (D) Representative images quantified for SG number and size by semi-automatic analysis using ImageJ. Scale bar, 10 µm. (E & F) Number and size of SG were quantified at 60 and 90 min after SA treatment by semi-automatic analysis using ImageJ. The means of 3 independent experiments ± SEM are plotted. * p < 0.05.



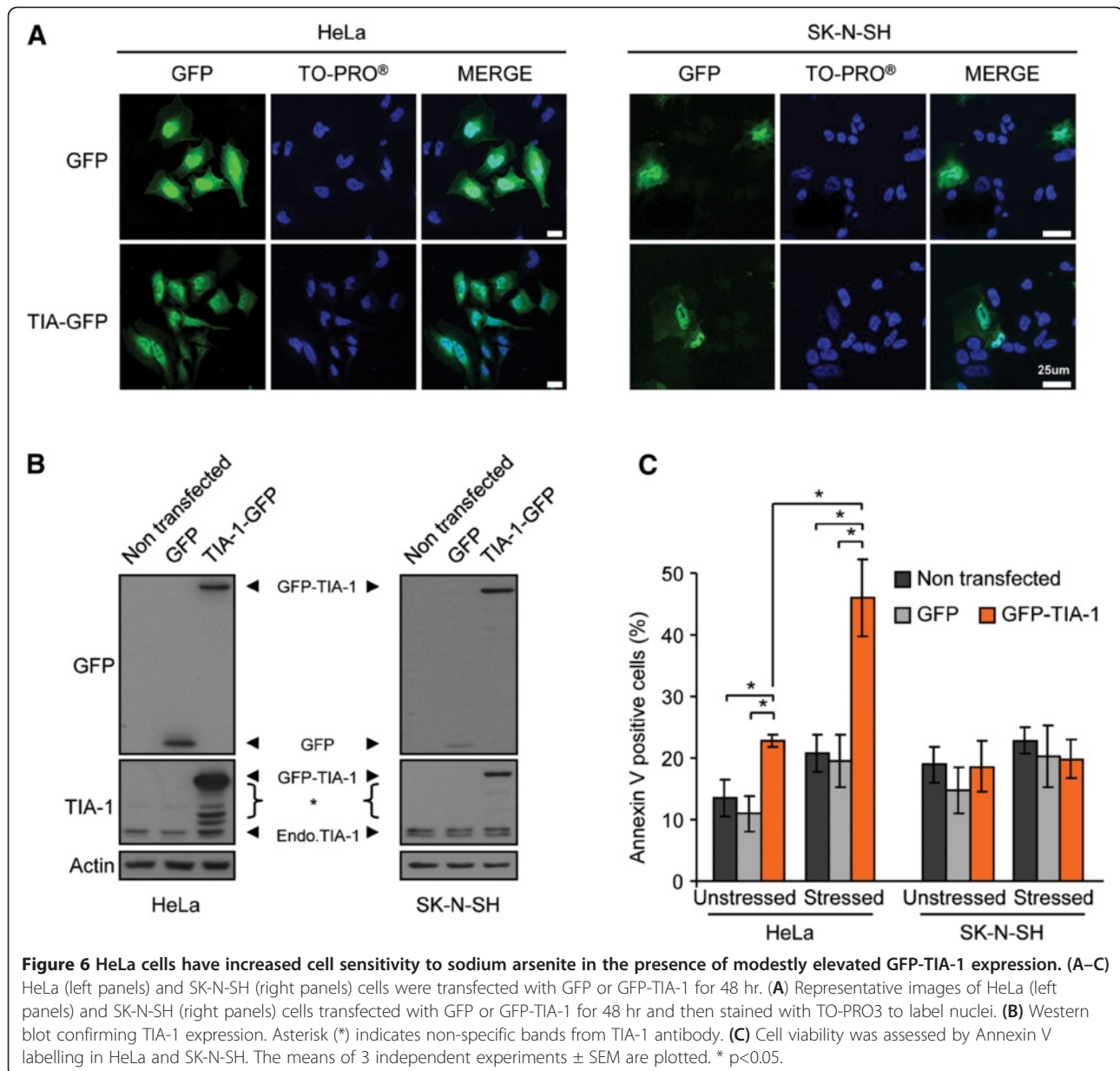


to be more vulnerable to a defect in SG assembly when either TDP-43 or G3BP is depleted. In both lines, cells transfected with control siRNA exhibited a background level of cell death that was constant throughout the experiments.

TIA-1 overexpression enhances cell toxicity of HeLa cells

TDP-43 depleted cells have not only a down-regulation of G3BP but also a 30% up-regulation of TIA-1 protein levels (and 2.6-fold increase in TIA-1 transcripts) [12] that is not observed in G3BP depleted cells (Figure 2A). Since G3BP siRNA failed to recapitulate the same level of toxicity as TDP-43 depletion in HeLa cells, we wondered if there was a differential sensitivity to elevated TIA-1 expression

between cell types. To address this, we transiently transfected cells with a low concentration of GFP-tagged TIA-1 for 24 hr (Figure 6A, B). At 24 hr post-transfection, we observed that cells with high GFP-TIA-1 expression formed puncta resembling SG in the absence of exogenous stress, in agreement with a previous report [9]. (However, TIA-1 aggregates were not detected at 48 hr, data not shown.) Cells were then briefly stressed with SA (30 min) and the media was replaced so as to permit cellular recovery for 24 hr. In order to avoid inducing non-specific cell death attributed to supraexpression of TIA-1, we used a very low concentration of cDNA in these experiments. This resulted in a low transfection efficiency. Thus, in order to selectively assess cell death in GFP⁺



transfectants (and thus exclude non-transfectants), we employed a flow cytometry method to assess cell death via Annexin V labelling specifically in GFP-expressing cells. By this method, we observed that GFP-TIA-1 transfected HeLa cells have a 2.3-fold increased toxicity following SA treatment ($p = 0.01$, Figure 6C). Also, we note that in unstressed/basal conditions, GFP-TIA-1 transfected cells have nearly twice the toxicity as control GFP transfected cells ($p = 0.005$, Figure 6C). Note, while TIA-1 has been previously described as cytotoxic, the toxicity observed here is independent of the level of TIA-1 overexpression as demonstrated by independently

gating populations of high and low GFP-TIA-1 expression (Additional file 3: Figure S3). In contrast, control GFP transfected cells were comparable to untransfected cells in both basal and stressed conditions. When we performed the same experiment in SK-N-SH cells, we noted that TIA-1 over-expression did not sensitize cells to SA (Figure 6C). Note, the apparent difference in TIA-1 expression detected by immunoblot likely arises from a reduced transfection efficiency of SK-N-SH cells (compare images in Figure 6A), while FACS analysis was restricted to cells expressing either GFP or GFP-tagged fusion protein. Taken together, these data suggest that low-level overexpression of TIA-1 can be toxic to certain cell

types and this toxicity can be exacerbated by the addition of an exogenous stress.

Discussion

We previously reported that cells depleted of endogenous TDP-43 formed smaller and less well-defined SG in response to oxidative stress. In addition, we reported that the reduction of endogenous TDP-43 levels induced an up-regulation of TIA-1 and a down-regulation of G3BP [12]. G3BP and TIA-1 are both considered to be SG nucleating proteins based on studies where overexpression of either molecule is sufficient to induce SG formation in the absence of stress [9,10]. While the requirement for TIA-1 in SG initiation has been further reinforced by the use of TIA-1 null cells [9], a similar experiment has not been reported for G3BP. Using siRNA-specific depletion of G3BP, we found that SG initiation defined by primary TIA-1 aggregation was undisturbed. We conclude that G3BP is not an essential SG initiating factor. In contrast, SG assembly defined by the secondary aggregation of TIA-1 resulting in fewer but larger SG, was completely blocked by the reduction of G3BP. This effect was nearly identical to that observed in TDP-43 depleted cells. Moreover, the blockade in SG assembly in TDP-43 depleted cells could be restored by the addition of exogenous G3BP. Our data indicate that TDP-43 regulation of G3BP controls SG assembly, an important step in SG dynamics. Interestingly, a large-scale analysis of TDP-43 target mRNAs has identified TDP-43 as binding to G3BP mRNA at the 3'-UTR [41]. Our own experiments in HeLa cells using immunoprecipitation of TDP-43 followed by RT-PCR for G3BP transcripts, confirm that TDP-43 can indeed bind G3BP mRNA in at least one of the cell types used here (unpublished data). The exact mechanism(s) by which TDP-43 regulates G3BP expression is the focus of future investigations. Interestingly however, we note that our data is strikingly similar to observations made in poliovirus infection where G3BP is cleaved by the virus-encoded 3C protease [42]. In this context, G3BP cleavage effectively inactivates G3BP, yielding smaller SG compared to oxidative stress exposure [42,43]. It is poignant to point out that poliovirus, which selectively attacks motor neurons, can result in a post-infection syndrome characterized by progressive muscle weakness and paralysis in rare cases. Lastly, it is noteworthy that G3BP-null mice are embryonically lethal, with animals largely developing normally with the exception of widespread neuronal cell death in various brain regions (spinal cord was not examined) [44]. Collectively, these data raise the possibility that SG dynamics (and the G3BP axis) are an essential aspect to motor neuron survival. Future studies include validation of this hypothesis in primary motor neurons.

Our previous work demonstrated that SG were morphologically irregular and significantly smaller in cells depleted of TDP-43 immediately following acute oxidative stress [12]. We add here that these changes occur while the number of SG per cell remains constant. Collectively, these data suggest that TDP-43 can also contribute to SG initiation. Whether the effect is direct or indirect remains to be determined. As is the case for G3BP and TIA-1, it is possible that TDP-43 controls the expression of other SG residents essential to the process. Further study of this aspect is required to identify a TDP-43-regulated SG initiation factor(s) and/or determine if it is TDP-43 itself. While it is tempting to suggest that it is G3BP which mediates this step, we note that initial SG number and size is normal in G3BP depleted cells. Clearly, endogenous TDP-43 contributes to the regulation of SG dynamics at more than one level.

The function of SG is proposed to be the storage and sorting of mRNA and SG are considered to be an important component of cell survival following stress exposure [8]. Our experiments indicate that endogenous TDP-43 is required to overcome acute oxidative stress in both HeLa and the neuronal-like cell line SK-N-SH. In contrast, endogenous FUS was not required in either cell line. Taken together, we propose that TDP-43 toxicity in ALS favours a loss of protective function while FUS mutations do not. In fact, given the number of studies using cell models with overexpressed FUS cDNAs, we propose that FUS mutations are gain-of-function since overexpression seems to encourage SG localization, with mutant FUS having a stronger localization than wild type [26-28]. In addition, it has been reported that mutant FUS is recruited to SG more rapidly than wild type FUS suggesting that FUS mutation causes a possible imbalance in normal SG dynamics [27]. While this hypothesis may prove to be true, we find it interesting that depletion of endogenous FUS had no impact on SG initiation and assembly in the context of acute oxidative stress.

Since TDP-43 and G3BP depletion yields the identical effect on SG dynamics, we expected to observe the same effect in our cell survival assay. To our surprise, our hypothesis was true only in neuronal-like SK-N-SH cells. That SG composition and/or kinetics are not identical in different cell types has been previously reported [7,45]. Thus, while it is possible that HeLa cells have evolved other means to avoid cell death in the absence of normal SG kinetics, we feel that this data supports our hypothesis that the proper control of SG dynamics is essential to neuronal survival. Thus, the disruption of this mechanism could be an underlying element of motor neuron vulnerability in ALS. However, given that the current data is limited to transformed cell lines and acute oxidative stress, future experiments in primary cultures

exploring other ALS-relevant stress agents will be required to fully evaluate this hypothesis.

TDP-43 depletion also leads to increased TIA-1 expression. While TIA-1 overexpression results in spontaneous SG formation, SG formation in the absence of SA was never observed in TDP-43 depleted cells. Thus, we wondered what may be the impact of moderately elevated TIA-1 levels. TIA-1 is a strong translational repressor [46] and is reported to induce apoptotic DNA fragmentation in thymocytes [47]. In our hands, ectopic TIA-1 expression induced spontaneous SG at 24 hr post-transfection. However, these inclusions were no longer observed at 48 hr, either due to cell death or spontaneous resolution. Moreover, we also detected a consistent 2-fold increase in cell death at 48 hr post-transfection. Surprisingly, the expression of TIA-1 exacerbated HeLa cell death 2.3-fold in response to an acute exposure to SA. We speculate that the modest up-regulation of TIA-1 induced by TDP-43 depletion (which does not yield visible aggregates), leads to a protracted translational arrest that contributes to increased cellular vulnerability. SK-N-SH cells were resistant to exogenous TIA-1 expression. Motor neurons, the vulnerable cell type in ALS, have very particular mRNA storage and protein translation mechanisms at the synapse [48]. In the context of ALS, we speculate that the reduction of functional TDP-43 levels (possibly via nuclear depletion) leads to a deregulation of normal SG kinetics and altered molecular control of key components relevant to cell survival. This contributes to a prolonged translational arrest and increased cell vulnerability. While our data implies a functional significance to the size/morphological changes associated with SG assembly, future work is needed to more fully examine the enigma that is “SG function” and the impact of arrested translation. However, it is noteworthy that increased SG size is widely viewed as a prerequisite to proposed SG function in mRNA triage [8].

Mutations in both TDP-43 and FUS are causative for ALS. In addition, both are RNA binding proteins that localize to SG in response to thermal or oxidative stress [12,23,25-28]. Many have expected that TDP-43 and FUS would participate in the same cellular pathways and that mutations in each would yield similar effects. However, we demonstrate here that the role for TDP-43 in regulating SG dynamics appears to be specific since depletion of endogenous FUS does not impact SG initiation or assembly. Moreover, at the molecular level, while TDP-43 and FUS have been reported to cooperatively regulate HDAC6 [39], we note here that reduction of FUS levels does not impact G3BP or TIA-1 protein levels in either of the cell types tested. In addition, in our experiments FUS depletion does not impact TDP-43 levels, nor does TDP-43 appear to regulate FUS, in

contrast to a previous report [41]. This difference may be due to cell type since this study assayed whole mouse brain, while our study has examined cultured cell lines.

Conclusions

SG are a transient mechanism to manage cell stress. To neurons, a non-renewable cell type, SG and other cellular stress response mechanisms are anticipated to be extremely important to their long-term survival [31,49]. We demonstrate that endogenous TDP-43, via G3BP, plays a role in SG dynamics that is independent of endogenous FUS. This supports our view that TDP-43 and FUS are not inter-changeable in all biological processes. We also report that SG assembly plays a more significant role in cell recovery following exposure to exogenous stress in neuronal-like cells, compared to non-neuronal cells. For future consideration, we hypothesize that this inherent and subtle difference in SG dynamics may be an underlying feature of the selective cellular vulnerability in ALS (and possibly other neurodegenerative diseases). Further studies using ALS relevant cell types and disease-linked stressors are warranted.

Methods

Cell culture and transfection

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% glutamine. For transfection of siRNA, 125 pmol of custom siRNAs were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. siRNA sequences used were: human FUS/TLS: 5'-GGC CAAGAUCAAUCCUCCAUGAGUA-3', and #2 5'-CGG GACAGCCCAUGAUUAAUUUGUA-3'; human G3BP1: 5'-ACAUUUAGAGGAGCCUGUUGCUGAA-3', and #2 5'-GCGCAUUAACAGUGGGGAAAUA-3'; human TDP-43: 5'-AAGCAAAGCCAAGAUGAGCCUUUGA-3', and #2 5'-AAGAUGAGAACGAUGAGCCCAUUGA-3', and negative control low GC siRNA (catalogue number 12935-200, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells were transfected at 30–50% confluency and collected after 72 hr. For transfection of cDNA, 0.3 µg GFP tagged TIA-1 (provided by J. Goodier, Johns Hopkins University, MD) or 0.3 µg of G3BP-GFP (provided by J. Tazi, Montpellier, France) were transfected with Lipofectamine LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were transfected with cDNA 48 hr after siRNA treatment. Cells were collected after 24 hr of treatment. Cells were treated with 0.5 mM sodium arsenite (30 min, 37°C; Sigma). Recovery was initiated by changing the media. Cells were fixed at the indicated time points.

Immunofluorescence and antibodies

Cells grown on cover slips were fixed in 1% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) and subsequently permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 15 min. Cover slips were blocked with 0.1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 15 min and incubated with antibodies to TDP-43 (1:400; Proteintech, Chicago, IL, USA), TIA-1 (1:100; Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA), G3BP (1:400; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), diluted in blocking buffer for 1 hr at room temperature. Cover slips were subsequently washed once with 0.1% Triton X-100 in PBS and twice with 0.1% BSA in PBS. Labelling was visualized with the fluorescently conjugated secondary antibodies donkey anti-mouse Texas Red (1:200; Jackson Immunochemicals, West Grove, PA, USA), donkey anti-rabbit FITC (1:200; Jackson Immunochemicals, West Grove, PA, USA), and donkey anti-goat Alexa 633 (1:800; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For some experiments, cells were stained with TO-PRO 3 (1:300; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 10 min at room temperature. Cover slips were washed three times in PBS and mounted with ProLong Antifade reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Images were collected on a Leica SP5 confocal microscope.

Quantification of SG size and number

ImageJ was used for quantification of SG parameters. SGs were identified by TIA-1 staining and cells were scored as positive when they had at least two foci of a minimal size of $0.75 \mu\text{m}^2$. Automatic recognition was done by Image J using the following parameters, SGs ranging from 0.75 to $5 \mu\text{m}^2$, randomly selected in 10 cells per condition. The average SG size of at least 100 SG is presented. For G3BP-GFP experiments, cells with an average pixel intensity of 60 arbitrary fluorescent units were selected for analysis. Control cells at this level of G3BP-GFP expression did not exhibit SG formation in basal conditions.

Cell lysates and immunoblot analysis

Cells were collected in ice-cold PBS, lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, and protease inhibitors), incubated 10 min on ice, 10 min at room temperature, and centrifuged at 13 800 *g*. Supernatants were collected and quantified with the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The following antibodies were used in immunoblotting: rabbit anti-TDP-43 (1:5000; Proteintech, Chicago, IL, USA), goat anti-TIA-1 (1:500; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-G3BP (1:750; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), rabbit anti-FUS (1:1000, Abcam, Cambridge, MA, USA) and mouse anti-Actin (1:200 000; MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Blots were visualized with peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL Western Blotting Substrate (Pierce, Waltham,

MA, USA). Densitometry was performed with Adobe PhotoShop.

Protease sensitivity

Cells were collected in ice-cold PBS, lysed in 10 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.5 M sucrose, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM DTT. Cytoplasmic fractions were recovered as supernatants after centrifugation at 230 *g* for 10 min and quantified with the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). 50 μg of cytoplasmic extract were incubated with increasing concentrations of Proteinase K (0 - 1.6 mg/ml) for 5 min at 37°C. Proteinase K was neutralised by 10 mM PMSF for 10 min on ice [36]. Samples were then resuspended in 1X Laemmli sample buffer.

Cell viability

Cell viability in siRNA depleted cells was scored via trypan blue exclusion at the indicated times after stress. Cell viability/toxicity in GFP-TIA-1 transfected cells was measured using the Annexin V/7-AAD labelling kit (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. In these experiments, cells were gated for GFP and Annexin V⁺ cells are reported in the figure. Data acquisition was performed on a BD LSR II flow cytometry (BD Biosciences) and data was analyzed with FlowJo (Treestar, Ashland, OR).

Statistics

In all cases, data was compared via a two-tailed Student *t*-test using Microsoft Excel.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Blocked stress granule assembly confirmed with a second set of gene-specific siRNAs. HeLa cells were transfected with independent siRNAs for the indicated genes. SG number and size were quantified at the indicated times, as previously described in Figures 1, 2, 3 and 4. The means of 3 independent experiments \pm SEM are plotted. * $p < 0.05$.

Additional file 2: Figure S2. Stress granule initiation is not affected by G3BP and FUS. SG nucleation, as determined by TIA-1 labelling, was assessed in HeLa cells transfected with control, G3BP or FUS siRNA for 72 hr and subsequently treated with SA (0.5 mM, 30 min) and then immediately fixed. SG number and size were quantified using ImageJ. The means of 3 independent experiments \pm SEM are plotted. * $p < 0.05$.

Additional file 3: Figure S3. Toxicity is equivalent in high and low expressing GFP-TIA-1 transfectants. (A-B) HeLa cells transfected with GFP or GFP-TIA-1 for 48 hr (from Figure 6) were electronically gated for low and high TIA-1 expression. Cell viability, as determined by Annexin V labelling, was independently assessed in the two populations. The means of 3 independent experiments \pm SEM are plotted. * $p < 0.05$.

Abbreviations

ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis; FUS/TLS: Fused in Sarcoma/Translocated in Sarcoma; G3BP: RasGAP SH3 domain binding protein 1; HDAC6: Histone Deacetylase 6; SA: Sodium Arsenite; SG: Stress Granule; SMA: Spinal Muscular Atrophy; SMN: Survival Motor Neuron; TDP-43: TAR DNA response element binding protein 43; TIA-1: T-cell Intracellular Antigen.

Competing interests

The authors declare they have no competing interests.

Authors' contributions

AA and CVW designed experimental procedures. AA and SS performed the experiments. AA and CVW wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank the members of the Vande Velde lab for helpful discussions; A Prat and N Arbour for access to equipment; J Tazi (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, Montpellier, France) and J Goodier (Johns Hopkins, Baltimore, USA) for GFP-G3BP and GFP-TIA-1 plasmids; and PA Dion, JA Parker, A Kania, N Leclerc and N Grandvaux for scientific discussion. This work was supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ); Canadian Institutes of Health Research (CIHR); Neuromuscular Research Partnership; National Science and Engineering Research Council (NSERC); Canadian Foundation for Innovation (CFI), and the CRCHUM (all to CVW). CVW is an FRSQ Research Scholar Junior 1 and AA is supported by the Bourse Louis-Dallaire from Réseau de Médecine Génétique Appliquée. The funding sources had no input on the design, collection, analysis, or interpretation of data; nor in the writing of the manuscript and the decision to submit the manuscript for publication.

Received: 25 May 2012 Accepted: 19 October 2012

Published: 24 October 2012

References

- Dion PA, Daoud H, Rouleau GA: **Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms.** *Nat Rev Genet* 2009, **10**:769–782.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, et al: **TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis.** *Nat Genet* 2008, **40**:572–574.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al: **TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis.** *Science* 2008, **319**:1668–1672.
- Lagier-Tourenne C, Cleveland DW: **Rethinking ALS: the FUS about TDP-43.** *Cell* 2009, **136**:1001–1004.
- Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al: **Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis.** *Science* 2009, **323**:1205–1208.
- Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, et al: **Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6.** *Science* 2009, **323**:1208–1211.
- Anderson P, Kedersha N: **Stress granules.** *Curr Biol* 2009, **19**:R397–R398.
- Anderson P, Kedersha N: **Stress granules: the Tao of RNA triage.** *Trends Biochem Sci* 2008, **33**:141–150.
- Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, et al: **Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1.** *Mol Biol Cell* 2004, **15**:5383–5398.
- Tourriere H, Chebli K, Zekri L, Counselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, et al: **The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules.** *J Cell Biol* 2003, **160**:823–831.
- Kedersha N, Anderson P: **Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability.** *Biochem Soc Trans* 2002, **30**:963–969.
- McDonald KK, Aulas A, Destroismaisons L, Pickles S, Beleac E, Camu W, et al: **TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1.** *Hum Mol Genet* 2011, **20**:1400–1410.
- Guil S, Long JC, Caceres JF: **hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:5744–5758.
- Zou T, Yang X, Pan D, Huang J, Sahin M, Zhou J: **SMN deficiency reduces cellular ability to form stress granules, sensitizing cells to stress.** *Cell Mol Neurobiol* 2011, **31**:541–550.
- Qi D, Huang S, Miao R, She ZG, Quinn T, Chang Y, et al: **Monocyte chemotactic protein-induced protein 1 (MCP1) suppresses stress granule formation and determines apoptosis under stress.** *J Biol Chem* 2011, **286**:41692–41700.
- Didiot MC, Subramanian M, Flatter E, Mandel JL, Moine H: **Cells lacking the fragile X mental retardation protein (FMRP) have normal RISC activity but exhibit altered stress granule assembly.** *Mol Biol Cell* 2009, **20**:428–437.
- Hua Y, Zhou J: **Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules.** *FEBS Lett* 2004, **572**:69–74.
- Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzerid D, Yaspo ML, et al: **Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**:1385–1396.
- Yu Z, Zhu Y, Chen-Plotkin AS, Clay-Falcone D, McCluskey L, Elman L, et al: **PolyQ Repeat Expansions in ATXN2 Associated with ALS Are CAA Interrupted Repeats.** *PLoS One* 2011, **6**:e17951.
- Lee T, Li YR, Ingre C, Weber M, Grehl T, Gredal O, et al: **Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients.** *Hum Mol Genet* 2011, **20**:1697–1700.
- Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, et al: **Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS.** *Nature* 2010, **466**:1069–1075.
- Daoud H, Belzil V, Martins S, Sabbagh M, Provencher P, Lacomblez L, et al: **Association of Long ATXN2 CAG Repeat Sizes With Increased Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis.** *Arch Neurol* 2011, **68**:739–742.
- Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang YJ, Vanderwyde T, Citro A, Mehta T, et al: **Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue.** *PLoS One* 2010, **5**:e13250.
- Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Dries DR, Mayer P III, Good SK, et al: **TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor.** *Mol Cell Biol* 2010, **31**:1098–1108.
- Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, Buratti E, et al: **TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult.** *J Neurochem* 2009, **111**:1051–1061.
- Gal J, Zhang J, Kwinter DM, Zhai J, Jia H, Jia J, et al: **Nuclear localization sequence of FUS and induction of stress granules by ALS mutants.** *Neurobiol Aging* 2010, **32**:2323.e27–2323.e40.
- Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, Kwiatkowski TJ Jr, et al: **Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules.** *Hum Mol Genet* 2010, **19**:4160–4175.
- Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, Hruscha A, et al: **ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import.** *EMBO J* 2010, **29**:2841–2857.
- Baumer D, Hilton D, Paine SM, Turner MR, Lowe J, Talbot K, et al: **Juvenile ALS with basophilic inclusions is a FUS proteinopathy with FUS mutations.** *Neurology* 2010, **75**:611–618.
- Parker SJ, Meyerowitz J, James JL, Liddell JR, Crouch PJ, Kanninen KM, et al: **Endogenous TDP-43 localized to stress granules can subsequently form protein aggregates.** *Neurochem Int* 2012, **60**:415–424.
- Lee EB, Lee VM, Trojanowski JQ: **Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration.** *Nat Rev Neurosci* 2012, **13**:38–50.
- Baloh RH: **TDP-43: the relationship between protein aggregation and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration.** *FEBS J* 2011, **278**:3539–3549.
- Wegorzewska I, Baloh RH: **TDP-43-based animal models of neurodegeneration: new insights into ALS pathology and pathophysiology.** *Neurodegener Dis* 2011, **8**:262–274.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al: **Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.** *Science* 2006, **314**:130–133.
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, et al: **TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **351**:602–611.
- Tsai NP, Ho PC, Wei LN: **Regulation of stress granule dynamics by Grb7 and FAK signalling pathway.** *EMBO J* 2008, **27**:715–726.
- Fiesel FC, Voigt A, Weber SS, Van den HC, Waldenmaier A, Gomer K, et al: **Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6.** *EMBO J* 2010, **29**:209–221.
- Kryndushkin D, Wickner RB, Shewmaker F: **FUS/TLS forms cytoplasmic aggregates, inhibits cell growth and interacts with TDP-43 in a yeast model of amyotrophic lateral sclerosis.** *Protein Cell* 2011, **2**:223–236.
- Kim SH, Shanware N, Bowler MJ, Tibbetts RS: **ALS-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to coregulate HDAC6 mRNA.** *J Biol Chem* 2010, **286**:12766–12774.

40. Vaccaro A, Tauffenberger A, Aggad D, Rouleau G, Drapeau P, Parker JA: **Mutant TDP-43 and FUS Cause Age-Dependent Paralysis and Neurodegeneration in *C. elegans*.** *PLoS One* 2012, **7**:e31321.
41. Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, Liang TY, *et al*: **Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43.** *Nat Neurosci* 2011, **14**:459–468.
42. White JP, Cardenas AM, Marissen WE, Lloyd RE: **Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase.** *Cell Host Microbe* 2007, **2**:295–305.
43. Piotrowska J, Hansen SJ, Park N, Jamka K, Sarnow P, Gustin KE: **Stable formation of compositionally unique stress granules in virus-infected cells.** *J Virol* 2010, **84**:3654–3665.
44. Zekri L, Chebli K, Tourriere H, Nielsen FC, Hansen TV, Rami A, *et al*: **Control of fetal growth and neonatal survival by the RasGAP-associated endoribonuclease G3BP.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:8703–8716.
45. Tradewell ML, Yu Z, Tibshirani M, Boulanger MC, Durham HD, Richard S: **Arginine methylation by PRMT1 regulates nuclear-cytoplasmic localization and toxicity of FUS/TLS harbouring ALS-linked mutations.** *Hum Mol Genet* 2012, **21**:136–149.
46. Damgaard CK, Lykke-Andersen J: **Translational coregulation of 5' TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR.** *Genes Dev* 2011, **25**:2057–2068.
47. Tian Q, Streuli M, Saito H, Schlossman SF, Anderson P: **A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells.** *Cell* 1991, **67**:629–639.
48. Liu-Yesucevitz L, Bassell GJ, Gitler AD, Hart AC, Klann E, Richter JD, *et al*: **Local RNA translation at the synapse and in disease.** *J Neurosci* 2011, **31**:16086–16093.
49. Tsai NP, Tsui YC, Wei LN: **Dynein motor contributes to stress granule dynamics in primary neurons.** *Neuroscience* 2009, **159**:647–656.

doi:10.1186/1750-1326-7-54

Cite this article as: Aulas *et al*: Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP. *Molecular Neurodegeneration* 2012 **7**:54.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Aulas et al,

“A functional interaction between stress granules and processing bodies is defined by G3BP1”

soumis à Nature Communication

A functional interaction between stress granules and processing bodies

is defined by G3BP1

Anaïs Aulas^{1,2}, Guillaume Caron^{1,3}, Christos G. Gkogkas⁴, Nguyen-Vi Mohamed^{1,3},
Laurie Destroismaisons¹, Nahum Sonenberg⁵, Nicole Leclerc^{1,3}, J. Alex Parker^{1,3} and Christine
Vande Velde^{1,3*}

¹Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM),
Departments of ²Biochemistry and ³Neurosciences, Université de Montréal, Montréal, QC,
H2X 0A9, Canada; ⁴Patrick Wild Centre and Centre for Integrative Physiology, University of
Edinburgh, Edinburgh, EH8 9XD, UK; ⁵Department of Biochemistry and Goodman Cancer
Research Centre, McGill University, Montréal, QC, H3A 1A3, Canada.

***Corresponding Author:**
Dr. Christine Vande Velde
CHUM Research Center (CRCHUM)
Université de Montréal
900 rue Saint-Denis, Local R09.442
Montréal, Canada H2X 0A9
Phone 514-890-8000 ext. 28832

ABSTRACT

G3BP1, a target of TDP-43, is required for normal stress granule (SG) assembly. Specifically, in the absence of G3BP1 (or TDP-43) SGs remain small, failing to undergo secondary aggregation. In neuronal-like cells, this phenotype is linked to poor survival. Here, using both transformed cell lines and primary neurons, we investigated the functional impact of this disruption in SG dynamics. We demonstrate that while stress-induced translational repression and recruitment of key SG proteins is undisturbed, depletion of G3BP1 or its upstream regulator TDP-43 disturbs normal interactions between SGs and Processing Bodies (PB). This is concomitant with decreased SG size, reduced SG-PB docking and impaired preservation of polyadenylated mRNA. Reintroduction of G3BP1 alone is sufficient to rescue all of these phenotypes, indicating that it is essential for normal SG-PB interactions and SG function. Using *C. elegans*, we demonstrate that TDP-43 regulation of G3BP1 is evolutionarily and functionally conserved.

Organisms have evolved a variety of strategies to overcome exposures to environmental stressors such as thermal, oxidative, osmotic, UV irradiation or viral infection. One of these mechanisms is the formation of “stress-induced RNA granules” such as Stress Granules (SGs) or Processing Bodies (PBs) [7, 84]. While SGs and PBs share many of the same protein and mRNA components, their exact compositions remain unknown [88, 248]. SGs are cytoplasmic inclusions ($\leq 5 \mu\text{m}^2$) that are absent in normal growth conditions but can be induced by stress stimuli. PBs are smaller, dense inclusions that are present in basal conditions, and can be induced by stress. Both structures recruit mRNA during stress and this correlates with/further contributes to translational repression. The exact functions of SGs and PBs are somewhat debated in the literature. The prevailing view is that SGs form primarily to protect endogenous mRNA from stress degradation, actively sorting transcripts for this storage versus degradation or reinitiation of translation, although this has never been explicitly demonstrated [249]. On the other hand, the chief function of PBs is considered to be mRNA degradation, although there are some reports that mRNA can be returned for reinitiation [95]. The stress-induced RNA granule response is conserved throughout evolution and is tightly regulated in order to facilitate cell survival following exposure to noxious stimuli [79].

There is increasing evidence that SGs may participate in the pathogenesis of the late-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [70, 104]. ALS-affected neurons frequently feature the mislocalization/misaccumulation of two RNA binding proteins (RBP), TDP-43 and FUS. Both are nuclear RBP involved in many aspects of RNA metabolism, and are known genetic causes of familial and sporadic ALS, suggesting deregulation of the RNA life cycle as a common pathogenic mechanism [125]. While mutant TDP-43 and FUS demonstrate recruitment to SGs in response to many different stimuli,

whether the consequent disruption in SG dynamics is due to a loss or gain of function is still a matter of debate [8, 11, 17, 27, 29, 124, 240]. We have previously reported that depletion of TDP-43, but not FUS, yields a significant down- and up-regulation of the core SG proteins G3BP1 and TIA-1, respectively [11]. Moreover, we have demonstrated that SG size is decreased by TDP-43 depletion via blocked secondary aggregation, which can be restored by exogenous expression of G3BP1 [250]. In neuronal-like cells, we have linked cellular vulnerability to oxidative stress to the loss of G3BP1 and its upstream regulator TDP-43 [250].

In the present study, we investigated the consequences of disrupted SG dynamics: namely the inability of SGs to achieve secondary aggregation as a consequence of decreased G3BP1 expression. We demonstrate that stress-induced translational arrest is normal despite TDP-43/G3BP1 depletion, but uncover that both molecules influence basal translation rates. In addition, in both transformed cells and primary neurons, TDP-43/G3BP1-mediated regulation of SG size determines the stability of interactions with PBs, another type of RNA granule, which is involved in mRNA decay. The disturbance in SG-PB interactions in stress conditions results in a progressive loss of polyadenylated transcripts. Lastly, using *C. elegans*, we demonstrate that TDP-43 regulation of G3BP1 is evolutionarily and functionally conserved. Taken together, these data demonstrate that the TDP-43 target G3BP1 is essential for a functional interaction between SG and PB.

RESULTS

SG proteins and polyadenylated mRNA are localized normally to SGs despite impaired secondary aggregation

We have previously reported that depletion of TDP-43 or its target G3BP1, impairs the secondary aggregation step of SG assembly in response to oxidative stress yielding increased numbers of SGs of reduced size. In contrast, SG assembly proceeds normally in FUS depleted cells [11, 250]. Given the reduction in size, we hypothesized that the recruitment of one or more SG components is disrupted by TDP-43/G3BP1 depletion. Since there is no method available to robustly isolate or enrich for SGs, we employed a candidate approach to evaluate if the recruitment of certain SG components was altered in these smaller SG. Specifically, we selected a panel of SG markers that are commonly used in the literature and previously shown to localize to SGs in a variety of contexts, namely HuR, eIF3A and eIF4G [8, 12, 34, 124]. Inspection of TDP-43 and G3BP1 depleted HeLa cells 60 mins after a 30 mins exposure to 0.5 mM sodium arsenite (SA) (ie. 90 mins, the time at which SG secondary aggregation is complete) demonstrated undisturbed localization of HuR, eIF3A, and eIF4G to SGs marked with TIA-1 (**Fig. 1A, B**). In fact, it was comparable to siControl and siFUS cells where SG size is normal. We noted the same localization in response to thermal stress and with a second set of siRNA for each of our target genes (data not shown). Quantitative analysis also showed no major differences in SG protein localization between the groups (**Fig. 1B, histograms**).

SGs are composed of proteins and mRNA [7]. Even though the function of SGs remains to be better defined, the leading hypothesis is that they are assembled to store and/or sort polyadenylated mRNA during a stress exposure [33]. An obligate feature of SG is the presence of polyadenylated mRNA. Thus, we performed fluorescence *in situ* hybridization

(FISH) using a fluorescently-conjugated oligo(dT) probe followed by HuR and TIA-1 immunostaining to label SGs (**Fig. 1C**). In all conditions, mRNA was highly colocalized with TIA-1⁺HuR⁺ SA-induced SGs and to normal levels. The same result was obtained with a second set of siRNAs and in response to thermal stress (data not shown). While we cannot exclude the possibility that depletion of TDP-43, G3BP1, or FUS may influence the localization of specific transcripts or proteins to SG, from our experiments we conclude that the localization of polyadenylated mRNA and these core SG proteins is normal despite impaired SG assembly.

Normal stress-induced translational repression in TDP-43, G3BP1 and FUS depleted cells

It is our hypothesis that the process of secondary aggregation in SG assembly (i.e. the fusion of numerous small SGs to fewer larger SGs organized perinuclearly) most hold some functional significance. However, there is no assay to test SG function *per se*. SG formation is concomitant to a translational repression following stress exposure, so as to provide translational priority to stress responsive genes [6, 7, 30, 32]. While mRNA localization appeared normal, we speculated that the failure of SGs to coalesce may have an impact on the efficiency of this stress-induced translational repression and contribute to the increased cellular vulnerability we have previously reported in TDP-43 depleted cells [11, 250]. Following a 72 h siRNA transfection, whole cell lysates were collected after pulsing with ³⁵S-methionine for 30 mins before SG assembly (ie. unstressed), when SG coalescence is completed (90 mins), and when SGs are fully resolved (180 mins) [11] (**Fig. 2A, B**). As expected, siControl cells displayed a robust transient repression of translation following SA treatment (91 ± 1 %) at 90 mins with a full recovery to basal levels by 180 mins (**Fig. 2B**).

Stress-induced translational repression occurred normally in TDP-43, G3BP1, and FUS depleted cells, compared to siControl cells (**Fig. 2B**; $p = 0.378, 0.493, 0.116$ for siTDP-43, siG3BP1 and siFUS, respectively) indicating that stress-induced translational repression is independent of SG size.

Basal translation is diminished by TDP-43 and G3BP1 siRNA

In unstressed conditions, siTDP-43 and siG3BP1 cells exhibited a significant reduction in basal translation compared to siControl cells. Specifically, unstressed siTDP-43 and siG3BP1 cells were metabolically labeled at $50 \pm 9 \%$ and $70 \pm 6 \%$ ($p = 0.0056$ and $p = 0.0083$ respectively) of that observed in siControl cells, respectively (**Fig. 2B**, *top: compare lanes 4 & 7 to lane 1*). Basal translation was not significantly different between siTDP-43 and siG3BP1 cells ($p = 0.139$). Interestingly, at 180 mins post-stress, translation returned to the lower pre-stress/basal level in both siTDP-43 and siG3BP1 cells (**Fig. 2B**, *top: compare lanes 4 & 6, 7 & 9*). On the other hand, FUS-depleted cells exhibited basal translation levels comparable to siControl cells ($p = 0.261$). Coomassie blue staining confirms comparable protein loading between lanes (**Fig. 2B**, *middle*). These results were confirmed with a complementary ribopuromylation assay (**Fig. S1**). This assay features a short pulse with puromycin which is intercalated into nascent polypeptides, followed by immunoblotting with an anti-puromycin antibody. By this assay, basal translation levels in siTDP-43 and siG3BP1 cells were reduced $38 \pm 7 \%$ and $36 \pm 2 \%$ ($p = 0.0053$ and $p = 0.0009$, respectively) compared to siControl cells (**Fig. S1**), consistent with metabolic labeling.

To investigate further the defect in basal translation, we performed polysome profiling of siRNA treated cells. Compared to siControl cells, TDP-43 depleted cells demonstrate a

decrease in total RNA associated with polysomes, as detected by adsorption at 254 nm (**Fig. 2C, top**). This is accompanied by an increase in the peak corresponding to 80S ribosome-associated RNA, consistent with a defect in translation initiation (Polysome/Monosome ratio: siControl 3.46 ± 0.31 ; siTDP-43 2.8 ± 0.29 , $p < 0.001$) (**Fig. 2C, top**). siG3BP1 cells also show a trend for reduced formation of polysomes (Polysome/Monosome ratio: siControl 3.58 ± 0.11 ; siG3BP1 3.39 ± 0.22 , $p = 0.057$) (**Fig. 2C, middle**). In contrast, and consistent with metabolic labeling, siFUS cells exhibit a normal polysome to monosome ratio (Polysome/Monosome ratio: siControl 3.42 ± 0.27 ; siFUS 3.45 ± 0.09 , $p = 0.142$) (**Fig. 2C, bottom**). Taken together, the data indicate that TDP-43 and its target G3BP1 are required for normal translation in basal conditions while FUS is dispensable.

Increased levels of polyadenylated mRNA and processing bodies

To evaluate whether the observed deficits in protein synthesis in basal conditions were due to a reduced steady-state level of polyadenylated mRNA, we performed FISH with a fluorescently-conjugated oligo(dT) probe and quantified single plane confocal images for total cellular fluorescence intensity (**Fig. 3A**). Compared to cells treated with control siRNA, polyadenylated mRNA levels were increased 1.35 ± 0.7 , 1.23 ± 0.6 and 1.45 ± 0.2 -fold in siTDP-43, siG3BP1 and siFUS cells, respectively (**Fig. 3A**, $p = 0.007$, 0.025 , 0.038). These changes are not accounted for by deregulated steady-state levels of the PB-resident mRNA degradation enzymes Dcp1a or Xrn1 (**Fig. 3B**). The effect on polyadenylated mRNA was specific since total RNA levels were unchanged by TDP-43 siRNA (**Fig. S2A**). Also, despite an increased amount of polyadenylated mRNA, its nuclear-cytoplasmic distribution was comparable to siControl cells for all conditions (**Fig. S2B**).

Decreased levels of translation and increased polyadenylated mRNA levels in basal conditions have been linked to changes in another type of RNA granule known as processing bodies (PBs) [93, 251]. PBs are present in basal conditions, and are also induced by stress [33, 84]. In general, PBs contain mRNA decapping and degradative enzymes and thus are considered as sites of mRNA degradation [84, 252]. Using Dcp1a as a marker for PBs, we counted the number of cells containing PBs in normal culture conditions (**Fig. 3C, D**). In siControl cells, 30 ± 4 % of HeLa cells contained PBs in basal conditions. However, in siTDP-43, siG3BP1 and siFUS cells, the percentage of cells was increased two and three-fold (62 ± 4 %, 60 ± 6 % and 90 ± 3 %), respectively compared to siControl cells (**Fig. 3D**; $p < 0.005$ for all conditions). This observation correlates well with the increased levels of polyadenylated transcripts and was confirmed with a second set of siRNAs (**Fig. S3A**).

We also examined the total number of PBs per cell and the size of individual PBs in basal conditions. We observed there to be a trend of 1.4 ± 0.1 and a significant 1.5 ± 0.1 -times more PBs per individual cell in unstressed siTDP-43 and siFUS cells, but not siG3BP1 (**Fig. 3E**, $p = 0.079$, 0.018 , and 0.935 , respectively). In addition, individual PB size was not significantly different for siTDP-43 and siG3BP1 cells, but was reduced 36 ± 12 % in FUS depleted cells (**Fig. 3F**, $p = 0.026$). A size distribution analysis revealed there to be an increased proportion of the smallest sized PBs ($0.1 - 0.2 \mu\text{m}^2$) in siFUS cells and a similar trend in siTDP-43 cells (**Fig. S3B**, $p = 0.041$ and 0.075 respectively) in basal conditions. Thus, basal PB dynamics are variably disrupted in all siRNA conditions tested.

Stress-induced PB kinetics are normal in all conditions

Like SGs, PBs can also be induced by exogenous stress [33, 84, 93]. As we observed some PB deregulation in basal conditions, we next investigated whether there are alterations in stress-induced PB dynamics. Inspection of the number of cells forming PBs immediately following a 30 mins exposure to SA shows stress-induced PB formation occurs normally in TDP-43, G3BP1, and FUS depleted cells (**Fig. S3C**). In addition, PBs are observed in nearly 100 % of cells at 30 and 90 mins, and start to dissolve by 180 mins, paralleling our previous observations for SG formation and disassembly [11]. Interestingly, we noted that at 180 mins, regardless of siRNA condition, the number of cells containing PBs returns to the pre-stress level (**Fig. S3C**). While the number of PBs is increased to a maximum of ~20 per cell compared to unstressed conditions for all siRNA conditions, we do not observe a stress-induced increase in the average size of individual PBs (**Fig. S2D**). However, at 180 mins, an increased proportion of smaller PBs ($0.15 - 1 \mu\text{m}^2$) was observed in siTDP-43 and siFUS cells when a size distribution analysis is performed (**Fig. S3B**, $p = 0.023$ and $p = 0.008$, respectively).

SG-PB docking is compromised in TDP-43 and G3BP1 depleted cells

Following SA stress exposure, one or more PBs are frequently observed to make close and transient contact with SG, referred to as docking [33, 248]. The association of these two distinct types of RNA granules has been proposed to permit or facilitate the exchange of mRNA and proteins between the two structures [33]. To determine if SG-PB docking is influenced by the absence of TDP-43, G3BP1, or FUS, we performed immunofluorescent labeling with markers defined for each structure. While Dcp1a is well established to be found only in PBs, TIA-1 is well recognized as a SG marker that has been observed in PBs in certain

contexts [21, 99, 248]. However, in our experience with HeLa cells stressed with SA, TIA-1 is never detected in PBs. For these experiments, SGs are defined as TIA-1⁺ cytoplasmic puncta with a minimum size of 0.75 μm^2 . Coverslips were fixed at 90 mins (including 30 mins SA exposure) and double labeled so as to permit SGs and stress-induced PBs to fully assemble (**Fig. 4A**). SG-PB docking was defined as when a Dcp1a⁺ puncta and a TIA-1⁺ puncta were in close proximity to each other such that there were no visible pixels between the structures and/or when there was a partial overlap of the signals (**Fig. 4A**). In siControl treated HeLa cells, 45 \pm 0.5 % of PBs were docked with SGs. In contrast, SG-PB docking was significantly reduced in TDP-43 and G3BP1 depleted conditions (31 \pm 2.0 % and 30 \pm 0.5 %, respectively; $p = 0.0023$ and 0.0002) while siFUS exhibited SG-PB docking equivalent to controls (47 \pm 1.3 %, $p = 0.536$) (**Fig. 4B**). A second independent set of siRNAs confirmed these results (**Fig. S3E**). The observed deficit in SG-PB docking cannot be attributed to PBs since all samples demonstrate a similar PB size and number at this time point (**Fig. S3D**).

We also investigated SG-PB docking in primary cortical neurons. Neurons were transfected with siTDP-43 at subsequently stressed with SA. Due to the low transfection efficiency in neurons, cells were selected according to TDP-43 expression, as revealed by immunofluorescence labeling and classified as either TDP-43^{Low} or TDP-43^{Endogenous} expressing cells (**Fig. 4C**). Using the PB-marker Dcp1a and an oligo(dT) probe to follow SG, we observed an 11 % decrease in SG-PB docking in TDP-43^{Low} neurons compared to neurons exhibiting normal levels of TDP-43 (TDP-43^{Endogenous}; $p = 0.0045$) (**Fig. 4D**). A similar decrease in docking was also observed in the neuronal-like cell line SH-SY5Y treated with siTDP-43 and siG3BP1 ($p = 0.002$ and $p > 0.001$) but not siFUS ($p = 0.803$) (**Fig. S3F**). Thus, reduced levels of TDP-43 and G3BP1 similarly compromise SG-PB docking.

SG-PB docking is dependent on G3BP1-mediated SG size

Since SG-PB docking was reduced in siTDP-43 and siG3BP1 cells where SG size is diminished [250], we wondered if SG size is a determinant of PB docking. To address this, we measured the size of SGs when they were docked with PBs. In HeLa cells stressed with SA, the average size of a docked SG is $\sim 2.5 \mu\text{m}^2$ regardless of siRNA condition (siControl: $2.48 \pm 0.16 \mu\text{m}^2$, siTDP-43: $2.49 \pm 0.22 \mu\text{m}^2$, siG3BP1: $2.54 \pm 0.21 \mu\text{m}^2$, siFUS: $2.7 \pm 0.18 \mu\text{m}^2$) (**Fig. 4E**). A distribution analysis for SG size in all siRNA treated cells analyzed at 90 mins post-stress (including 30 mins SA treatment) reveals that SGs distribute into two broad classes: “small SGs” measuring 0.75 to $< 2 \mu\text{m}^2$ and “large SGs” measuring 2 to $5 \mu\text{m}^2$. In siControl cells, SGs are divided evenly between the two classes. In the context of siTDP-43 and siG3BP1, the proportion of SG that measure as “large SGs” is similarly reduced by approximately half to $23 \pm 2 \%$ and $24 \pm 4 \%$, respectively ($p = 0.002$ and 0.035). In contrast, in siFUS cells where SG-PB docking is normal, the distribution of SGs into small and large classes is indistinguishable from siControl ($52 \pm 4 \%$ and $48 \pm 4 \%$, respectively, $p = 0.600$) (**Fig. 4F**).

To assess the dynamics of SG-PB docking in real-time, we performed live cell imaging using transient transfection of HeLa cells with Dcp1a-RFP and TIA-1-GFP plasmids in the context of TDP-43 siRNA. We first verified that transient exogenous expression of the TIA-1 reporter construct at the low amount we used ($0.3 \mu\text{g}$ each) did not induce SG formation and that cells underwent SG formation with normal kinetics following SA treatment (**Fig. S4A**). In cells treated with SA and then imaged for a 10 min window starting at 90 mins (the time point where SGs are largest), images were collected every 30 secs and individual PBs were

monitored for contact with SGs. While PBs are dynamic, the number of contacts between SGs and PBs was unchanged by TDP-43 depletion (**Fig. S4B**). However, the average duration of PB docking onto large SGs ($>2 \mu\text{m}^2$) was reduced by 41 % in TDP-43 depleted cells compared to siControl cells (4.95 ± 0.98 mins vs. 8.35 ± 0.76 mins, $p = 0.008$) (**Fig. 4G**) but was comparable when small SGs ($<2 \mu\text{m}^2$) were analyzed (**Fig. S4C**). Thus, we conclude that SG size, mediated by G3BP1-dependent secondary aggregation of SG, is a determinant of SG-PB docking.

Loss of polyadenylated mRNA as a consequence of reduced SG-PB docking

The field consensus is that the function of SGs is to sort mRNA for storage, reinitiation or degradation [33]. It has been proposed that mRNA and RNPs can be exchanged between SGs and PBs via docking and that this may serve to target certain transcripts for degradation in PBs while other transcripts are stored in SGs and thus protected from degradation [33]. The prevailing view in mammalian cells is that mRNA is transferred from SGs to PBs during docking with localization of mRNA in PBs being a one-way ticket to decapping and degradation [33]. However, evidence in yeast suggests that transcripts can be re-capped and that PBs also participate in the sorting of transcripts, such that mRNA are proposed to be transferred from PBs to SGs for storage [33, 86, 95]. In order to determine if deficient SG-PB docking has a functional consequence on mRNA preservation, we designed an experiment where cells were induced to undergo two full cycles of SG (and stress-induced PB) assembly and disassembly with polyadenylated mRNA levels being measured before the first stress, and then after each SG disassembly (ie. 180 mins after each SA addition) (**Fig. 5A**). In siControl cells, the levels of polyadenylated mRNA after two consecutive SA treatments, as measured

via total cellular pixel intensity following FISH with an oligo(dT) probe, is equivalent to unstressed cells (**Fig. 5B**). However, in cells depleted of TDP-43 or G3BP1, while mRNA levels are initially higher in unstressed conditions (as shown in **Fig. 3A**), there is a progressive step-wise decrease in polyadenylated mRNA after two consecutive rounds of SA treatment. Specifically, relative to unstressed cells, we observe a decrease in polyadenylated mRNA levels of $35 \pm 4 \%$ and $52 \pm 3 \%$ in siTDP-43 cells and $21 \pm 2 \%$ and $43 \pm 7 \%$ in siG3BP1 cells ($p = 0.013$ and 0.002 for siTDP-43, $p = 0.048$ and 0.031 for siG3BP1). In contrast, siFUS cells which also exhibit higher levels of polyadenylated mRNA in basal conditions, did not demonstrate a loss of mRNA but rather was constant, comparable to siControl cells (**Fig. 5B**). A similar result was obtained with a second set of siRNA after a single SA exposure (**Fig. S5**). We further validated this result in SH-SY5Y cells treated with siTDP-43 and siG3BP1 and examined after the second SA exposure (**Fig. 5C**). Thus, the functional interaction between SGs and PBs serves to preserve transcripts during stress.

Exogenous G3BP1 fully rescues SG-PB docking and maintains mRNA levels

We have previously shown that depletion of TDP-43 induces a downregulation of G3BP1 transcript and protein [11], and that defective SG assembly induced by TDP-43 depletion is fully restored by exogenous G3BP1 expression [250]. In the current manuscript, the linear relationship from TDP-43 to G3BP1 is preserved since nearly every phenotype observed in siTDP-43 cells is also observed in G3BP1-depleted cells. To determine if G3BP1 is the molecule directly mediating these effects, we reintroduced G3BP1 expression into siTDP-43 cells. As we have previously published, in order to avoid artifact from G3BP1 overexpression, G3BP1 cDNA is limited to $0.3 \mu\text{g}$ and only cells with low total fluorescence and without

spontaneous cytoplasmic aggregates (sometimes referred to as constitutive SGs) are analyzed [250] (**Fig. 6A**). SG-PB docking, analyzed as described above, was fully restored by exogenous G3BP1 expression (**Fig. 6B**). In addition, the progressive loss of polyadenylated mRNA following consecutive SA exposures was fully rescued by G3BP1 expression (**Fig 6C**). Thus, TDP-43 regulation of G3BP1 is central to coordinating the functional interaction between SGs and PBs.

Regulation of G3BP1 by TDP-43 is evolutionarily conserved

In a *C. elegans* model null for *tdp-1*, encoding the worm ortholog of TDP-43, animals exhibit increased sensitivity to juglone-induced oxidative stress [168]. Given our previous data documenting the relevance of TDP-43 regulation of G3BP1 expression and SG dynamics, we sought to determine if this was an evolutionarily conserved mechanism. Since a null mutant allele for the G3BP1 ortholog *K08F4.2*, recently named *gtbp-1*, does not exist, we examined juglone sensitivity of worms fed *gtbp-1* or *tdp-1* RNAi bacteria. We observed that both RNAi conditions yielded similar sensitivity to juglone (**Fig. 7A**), reminiscent of our previous experience with the *tdp-1(ok803)* mutant [168]. Moreover, that TDP-43 regulation of G3BP1 is evolutionarily conserved was demonstrated by RT-PCR where *gtbp-1* transcript levels were reduced 66 ± 6 % in the *tdp-1(ok803)* strain compared to the wild type N2 controls (**Fig. 7B**). Thus, TDP-43 regulation of G3BP1 and its role in SG responses is evolutionarily and functionally conserved.

DISCUSSION

TDP-43 and G3BP1 depletion yields small SGs [250]. However, we show here that these smaller SGs contain canonical SG proteins such as eIF3G, eIF4A, and HuR and normal levels

of polyadenylated mRNA. Importantly, stress-induced translational arrest proceeds normally despite a defect in secondary SG aggregation. However, by three different assays, we demonstrate that TDP-43/G3BP1 depletion is associated with a defect in basal translation rates. In addition, we demonstrate that this is not due to a loss of polyadenylated mRNA levels, which were increased in all siRNA conditions examined, compared to controls. It has been previously reported that a translational defect exists in TDP-43 depleted cells with a similar abundance in stalled preinitiation complexes, however this was attributed to a decrease in total mRNA that could be available for translation [253]. While we did not observe a decrease in total mRNA, in TDP-43 and G3BP1 depleted cells, less RNA was associated with polysomes and more associated with monosomes, which is further consistent with impaired translation initiation. We speculate that, at least in TDP-43/G3BP1 depleted cells, the increase in basal polyadenylated mRNA could be attributed to reduced G3BP1 expression since G3BP1 has been reported to function as an endoribonuclease [254]. However, FUS does not regulate G3BP1 expression. It remains unknown if FUS regulates post-translational modifications on G3BP1 (ex. Phosphorylation, methylation) that are known to functionally impact G3BP1 [24, 37]. Alternatively, increased transcript levels in FUS-depleted cells could be due to some other unknown mechanism.

We have previously shown that TDP-43 mediated regulation of G3BP1 determines SG size [250]. We now conclude that SG size is a determinant of SG-PB docking. TDP-43 localization to SGs is maintained in G3BP1 depleted cells (**Fig. S6**). However, G3BP1 is absent from SGs in siTDP-43 cells due to downregulation of its expression [250]. While we cannot exclude the possibility that there are other TDP-43 regulated SG proteins not investigated here that could be similarly absent from SGs, the data strongly suggest that

G3BP1 is the central determinant of SG size and functional SG-PB interactions since introduction of exogenous G3BP1 alone was sufficient to completely restore these aspects. Interestingly, the transition from primary to secondary aggregation has been postulated to integrate cellular signaling molecules via piggyback recruitment on core SG proteins, such as G3BP1 [31, 51, 69, 73, 74]. Our data extends this proposal to include SG-PB interactions.

The current model in mammalian cells posits that upon stress, non-translating mRNAs complexed with RNPs preferentially transit from polysomes to SGs [95]. It is widely considered that at SGs, mRNPs are sorted either for degradation (presumably via docking and exchange with PBs), returned to the polysome for reinitiation, or stored until the stress is abated and translation returns to normal [33]. However, in yeast, there is evidence which suggests mRNPs localized to PBs can be remodelled and subsequently accumulate in SGs, effectively assigning the triage point to PBs rather than SGs [101]. As proposed by Buchan and Parker, the relative rates of exchange of translation factors for PB proteins versus the aggregation of SG components might be the determining factor for mRNA fate (SG or PB) when translation is interrupted [101]. Essentially, the question becomes: what determines the path of nontranslating mRNAs in times of stress? In our attempt to define the fate of mRNA immediately following polysome disassembly in TDP-43/G3BP1 depleted conditions, we developed an assay to determine the levels of polyadenylated mRNA following two consecutive rounds of SG assembly and disassembly. Here, we observed that while polyadenylated mRNA levels remain constant in siControl cells, implying efficient protection/storage of transcripts, there is a progressive and step-wise loss of mRNA when cells are depleted of TDP-43 or G3BP1. However, there is no evidence for decreased RNA synthesis as steady-state polyadenylated mRNA levels are increased in basal conditions. In our

view, as docking is not increased (in order to exchange mRNA from SGs to PBs), this scenario is only possible if nontranslating mRNAs preferentially transit from polysomes to PBs. At PBs, the transcripts are presumably degraded outright, and/or fail to be transferred to SGs. Moreover, since docking is not completely abolished, this suggests that both models co-exist in mammalian cells (i.e. non-translating mRNA can flow to both SGs and PBs). As TDP-43 localizes to SGs despite G3BP1 depletion, and reintroduction of G3BP1 alone to TDP-43-depleted cells rescues all phenotypes, we conclude that G3BP1 is a critical RBP that directs the preferential flow of mRNA from polysomes to SGs. In the absence of G3BP1 (either via direct siRNA or downregulation as a consequence of TDP-43 siRNA), SG-PB contacts are less stable, resulting in the path to PBs to be more utilized. This implies that a functional significance of SG size is the preservation of mRNA transcripts.

Our data also clearly demonstrate an interesting sub-story: while FUS does not influence SG-PB interactions, it does influence PB number and size suggesting that PB dynamics might be a common underlying mechanism in ALS pathogenesis. In addition, translation levels remain comparable between siControl and siFUS cells, but there is a ~3-fold increase in PB formation and 2-fold increase in mRNA levels in basal conditions. This is consistent with reports that while changes in PB formation, mRNA levels and translation often correlate, they are not fully inter-dependent and thus FUS siRNA may be an important tool in further dissecting this mechanism [94, 255].

In the current report, using transformed cells and primary neurons, we establish that G3BP1, a target of TDP-43, is the critical regulator of the interaction between RNA granule subtypes, namely SGs and PBs. To our knowledge, the data presented here are the first report that SG size, as determined by the presence of G3BP1, dictates the interactions between SGs

and PBs. Moreover, we show that the progressive loss of polyadenylated transcripts is a functional consequence of sequentially disrupting normal SG assembly and subsequent interactions with PBs. Using *C. elegans*, we conclude that the regulation of TDP-43 on G3BP1 and consequences on stress vulnerability are evolutionarily and functionally conserved. Since G3BP1 is a downstream target of the ALS-causing gene TDP-43, it could be an important intersecting point in ALS pathogenesis, worthy of further exploration.

METHODS

Immortalized cell culture and transfection: HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% glutamine. For transfection of siRNA, 125 pmol of custom siRNAs were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. siRNA sequences used were: human FUS/TLS #1: 5'-GGCCAAGAUCAAUCCUCCAUGAGUA-3', and #2 5'-CGGGACAGCCCAUGAUUAAUUUGUA-3'; human G3BP1 #1: 5'-ACAUUUAGAGGAGCCUGUUGCUGAA-3', and #2 5'-GCGCAUUAACAGUGGUGGGAAAUUA-3'; human TDP-43 #1: 5'-AAGCAAAGCCAAGAUGAGCCUUUGA-3', and #2 5'-AAGAUGAGAACGAUGAGCCCAUUGA-3', and negative control low GC siRNA (catalogue number 12935-200, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). HeLa cells were transfected at 30–50% confluency and collected after 72 h. For cDNA transfection, 0.3 µg G3BP1-GFP (provided by J. Tazi, Montpellier, France), 0.3 µg Dcp1a-RFP (provided by P. Anderson, Harvard) and 0.3 µg TIA-1-GFP (provided by J. Goodier, Johns Hopkins University, MD) was transfected with Lipofectamine LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were transfected with cDNA 48 h after siRNA transfection and collected after an additional 24 h. SH-SY5Y cells were cultured in DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% FBS and 10 % non-essential amino acid and transfected with 100 pmol siRNA using Nucleofector, as per the manufacturer's instructions (Lonza, Mississauga, ON, Canada). After 8 h, the media was replaced. Cells are

collected 48 h after nucleofection. To induce SG, cells were treated with 0.5 mM sodium arsenite (30 mins, 37 °C; Sigma). Recovery was initiated by changing the media.

Mouse cortical neurons: The use of animals and all surgical procedures described in this article were carried out according to guidelines set by the *Canadian Council on Animal Care*. Neurons were prepared from E16 mouse embryos (C57Bl/6). Cerebral cortices were treated with trypsin (0.025 %, 37 °C, 20 mins). The reaction was stopped with trypsin inhibitor solution containing DNase. Neurons were dissociated by several passages through a Pasteur pipette and then plated either on glass coverslips or on culture dishes coated with polylysine and laminin (Sigma, Oakville, ON, Canada). Neurons were maintained in Neurobasal medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with Glutamax (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and B27 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada).

Immunoblot analysis: Cells were collected in ice-cold PBS, lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 1 % sodium deoxycholate, and protease inhibitors), incubated 10 mins on ice, 10 mins at room temperature, and centrifuged at 13 800 g. Supernatants were collected and quantified with the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Antibody information is listed in the supplemental information. Blots were visualized with peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL Western Blotting Substrate (Pierce, Waltham, MA, USA). Densitometry was performed with Adobe PhotoShop.

Immunofluorescence: Cells grown on cover slips were fixed in 1 % formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) and subsequently permeabilized with 0.1 % Triton X-100 in PBS for 15 mins. Cover slips were blocked with 0.1 % bovine serum albumin (BSA) in PBS for 15 mins and incubated with primary antibodies diluted in blocking buffer for 1 h at room

temperature. Cover slips were subsequently washed once with 0.1 % Triton X-100 in PBS and twice with 0.1 % BSA in PBS. Labelling was visualized with fluorescently conjugated secondary antibodies. Cover slips were washed three times in PBS and mounted with ProLong Antifade reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Images were collected on a Leica SP5 confocal microscope.

Fluorescence In Situ Hybridisation: Cells grown on coverslips were fixed in 4 % formaldehyde in PBS and subsequently permeabilized with 0.1 % Triton X-100 in 2X saline sodium citrate (SSC) for 15 mins, washed with 1 M Tris, pH8 for 5 mins. Cover slips were blocked with 0.0005 % BSA, 10 mg/ml yeast RNA diluted in 2X SSC, washed with 1 M Tris, pH8 for 5 mins and incubated with hybridization buffer (1.3 ng oligo(dT) probe, 0.005 % BSA, 1 mg/ml yeast RNA, 10 % dextran sulphate, 25 % formamide, diluted in 2X SSC) for 1 h in a humid chamber. Coverslips were subsequently washed twice with 4X SSC for 5 mins and once with 2X SSC for 5 mins. Coverslips were incubated with primary antibodies for 1 h (details above) and then washed twice with 4X SSC for 5 mins and once with 2X SSC for 5 mins. Labelling was visualized with fluorescently conjugated secondary antibodies, as above. Coverslips were washed twice with 4X SSC, once with 2X SSC and then mounted with ProLong Antifade reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Images were collected on a Leica SP5 confocal microscope. Total cellular fluorescence intensity of the oligo(dT) probe was determined in Adobe PhotoShop.

Quantification of SG and PB size and number: SG and PB parameters were quantified with ImageJ. SG and PB were identified by TIA-1 and Dcp1a staining, respectively and cells were scored as positive when they had at least two foci with a minimum size of 0.75 and 0.15 μm^2 , respectively. Automatic recognition by ImageJ used the following parameters: SG

ranging from 0.75 to 5 μm^2 , PB ranging from 0.15 to 5 μm^2 in a minimum of 10 randomly selected cells per condition.

Metabolic labelling: Cells were stressed (0.5 mM SA, 30 mins) and collected at 0 (before stress), 90 and 180 mins. Cells were pulsed with 50 μM ^{35}S -methionine diluted in normal growth medium lacking methionine, 30 mins before collection in ice-cold PBS and lysed in RIPA buffer. Equal amounts of protein were loaded on SDS-PAGE gel and then stained with Coomassie blue and dried for 2 h at 80 °C. Dried/stained gels were exposed to film overnight. Densitometry of the whole lane was performed using Adobe PhotoShop.

Polysome profiling: After 72 h siRNA transfection, polysome profiling was performed as previously described [256]. Briefly, cells were washed with ice-cold PBS containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide and subsequently lysed in 5 mM Tris-HCl (pH7.5), 2.5 mM MgCl_2 , 1.5 mM KCl, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide, 2 mM DTT, 0.5 % Triton X-100, and 0.5 % sodium deoxycholate. Lysates were loaded onto 10–50% sucrose density gradients (20 mM HEPES-KOH (pH7.6), 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2) and centrifuged at 235 000 g in an SW40i rotor for 2 h at 4°C. Absorbance of different fractions at 254 nm was continuously recorded using an ISCO fractionator with a UV detector (Teledyne ISCO). Polysome to monosome ratio was calculated as the area under the A_{254} absorbance curve, using the function describing the absorbance values, processed with the definite integral command in MATLAB.

Live imaging: Live imaging was performed on HeLa cells grown on glass-bottomed dishes (MatTEK) 48 h after cDNA transfection. Environment was kept at 37 °C and 5 % CO_2 . Cells were acclimated to the microscope incubator chamber prior to imaging. Only cells

exhibiting low levels of TIA-1-GFP and devoid of spontaneous SG were selected for subsequent SA treatment and imaging. Time-lapse movies were taken using a Leica DMI 6000B equipped with an HC PL APO CS2 63x/1.40 oil objective and a Hamamatsu 1394 ORCA-ERA camera. Images were collected every 30 sec for 10 mins with maximum sample protection using two different channels. Analysis was made manually following individual PB between frames. Only PB and SG that remained in focus for the 10 mins of filming were included in the analysis.

C. elegans: RNAi-treated strains were fed with *E. coli* (HT115) containing an Empty Vector (EV), *tdp-1*(F44G4.4) or *gtbp-1*(K08F4.2) RNAi clones were from the ORFeome RNAi library (Open Biosystems) and were verified by sequencing prior to use. RNAi experiments were performed at 20 °C. Worms were grown on NGM enriched with 1 mM Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG). For oxidative stress tests, worms were transferred to NGM plates containing 240 µM juglone at adult day 1. For all assays, worms were evaluated for survival every 30 mins for the first 2 h and every 2 h thereafter up to 6 h. Nematodes were scored as dead if they were immotile and unable to move in response to tactile stimuli. For all tests, at least 20 animals/plate in triplicate were scored in three independent experiments. RNA was extracted using a classic Phenol/Chloroform extraction method and then reverse transcribed with QuantiTect (Qiagen). Primers used include: *tdp-1* forward, 5'-AAAGTGGGATCGAGTGACGAC; *tdp-1* reverse, 5'-GACAGCGTAACGAATGCAAAGC; *gtbp-1* forward, 5'-TGGATCGCAGGAGATTGTTAAGTT; *gtbp-1* reverse, 5'-CGTGTCCGTTATGACCAGTCG, *act-3* forward, 5'-GTTGCCGCTCTTGTTGTAGAC; *act-3* reverse, 5'-GGAGAGGACAGCTTGGATGG.

Statistics: In all cases, data was compared via two-tailed Student t-test.

REFERENCES

1. Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P (1999) 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: 1431-1442.
2. Sheth U, Parker R (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300: 805-808.
3. Stoecklin G, Kedersha N (2013) Relationship of GW/P-bodies with stress granules. *Adv Exp Med Biol* 768: 197-211.
4. Lavut A, Raveh D (2012) Sequestration of highly expressed mRNAs in cytoplasmic granules, P-bodies, and stress granules enhances cell viability. *PLoS Genet* 8: e1002527.
5. Anderson P, Kedersha N (2008) Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci* 33: 141-150.
6. Brengues M, Teixeira D, Parker R (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310: 486-489.
7. Thomas MG, Loschi M, Desbats MA, Boccaccio GL (2011) RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cell Signal* 23: 324-334.
8. Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD (2013) Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J Cell Biol* 201: 361-372.
9. Strong MJ (2010) The evidence for altered RNA metabolism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neurol Sci* 288: 1-12.
10. Bentmann E, Haass C, Dormann D (2013) Stress granules in neurodegeneration--lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. *FEBS J* 280: 4348-4370.
11. Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, et al. (2009) TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J Neurochem* 111: 1051-1061.
12. Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang YJ, Vanderweyde T, Citro A, et al. (2010) Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS One* 5: e13250.
13. McDonald KK, Aulas A, Destroismaisons L, Pickles S, Beleac E, et al. (2011) TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum Mol Genet* 20: 1400-1410.
14. Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Dries DR, Mayer P, 3rd, et al. (2011) TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor. *Mol Cell Biol* 31: 1098-1108.
15. Bentmann E, Neumann M, Tahirovic S, Rodde R, Dormann D, et al. (2012) Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). *J Biol Chem* 287: 23079-23094.
16. Andersson MK, Stahlberg A, Arvidsson Y, Olofsson A, Semb H, et al. (2008) The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC Cell Biol* 9: 37.
17. Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, et al. (2010) Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum Mol Genet* 19: 4160-4175.
18. Aulas A, Stabile S, Vande Velde C (2012) Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP. *Mol Neurodegener* 7: 54.
19. Kedersha N, Chen S, Gilks N, Li W, Miller IJ, et al. (2002) Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell* 13: 195-210.
20. Kimball SR, Horetsky RL, Ron D, Jefferson LS, Harding HP (2003) Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C273-284.
21. Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, et al. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169: 871-884.
22. Kedersha N, Anderson P (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 30: 963-969.

23. Nover L, Scharf KD, Neumann D (1983) Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol Cell Biol* 3: 1648-1655.
24. Nover L, Scharf KD, Neumann D (1989) Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol* 9: 1298-1308.
25. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E (2007) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 9-22.
26. Collier J, Parker R (2005) General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122: 875-886.
27. Cougot N, Babajko S, Seraphin B (2004) Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol* 165: 31-40.
28. Dang Y, Kedersha N, Low WK, Romo D, Gorospe M, et al. (2006) Eukaryotic initiation factor 2 α -independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J Biol Chem* 281: 32870-32878.
29. Leung AK, Calabrese JM, Sharp PA (2006) Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18125-18130.
30. Parker R, Sheth U (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25: 635-646.
31. Vaccaro A, Tauffenberger A, Ash PE, Carlomagno Y, Petrucelli L, et al. (2012) TDP-1/TDP-43 regulates stress signaling and age-dependent proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 8: e1002806.
32. Higashi S, Kabuta T, Nagai Y, Tsuchiya Y, Akiyama H, et al. (2013) TDP-43 associates with stalled ribosomes and contributes to cell survival during cellular stress. *J Neurochem* 126: 288-300.
33. Martin S, Tazi J (2014) Visualization of G3BP stress granules dynamics in live primary cells. *J Vis Exp*.
34. Tourriere H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, et al. (2003) The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* 160: 823-831.
35. Kwon S, Zhang Y, Matthias P (2007) The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev* 21: 3381-3394.
36. Anderson P, Kedersha N (2002) Stressful initiations. *J Cell Sci* 115: 3227-3234.
37. Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, et al. (2000) Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol* 151: 1257-1268.
38. Bartoli KM, Bishop DL, Saunders WS (2011) The role of molecular microtubule motors and the microtubule cytoskeleton in stress granule dynamics. *Int J Cell Biol* 2011: 939848.
39. Wolozin B (2012) Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 7: 56.
40. Anderson P, Kedersha N (2009) Stress granules. *Curr Biol* 19: R397-398.
41. Buchan JR, Parker R (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 36: 932-941.
42. Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R (2005) Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 11: 371-382.
43. Sheth U, Parker R (2006) Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* 125: 1095-1109.
44. Gkogkas CG, Khoutorsky A, Ran I, Rampakakis E, Nevarko T, et al. (2013) Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature* 493: 371-377.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

AA, NS, NL, JAP, and CVV designed experiments. AA, GC, CGG, NVM and LD performed the experiments, AA and CVV wrote the manuscript. All authors approved the final version.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the members of the Vande Velde lab for helpful discussions and especially S. Peyrard for technical support; A. Prat, N. Arbour, and CRCHUM Cancer Axe for access to equipment; and J. Tazi, P. Anderson, and J. Goodier for plasmids. We thank A. Tauffenberger for help on the *C. elegans* work.

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Neuromuscular Research Partnership, Muscular Dystrophy Association, National Science and Engineering Research Council (NSERC); Canadian Foundation for Innovation (CFI) (all to CVV). CVV is a CIHR New Investigator. AA has received support from the Réseau de Médecine Génétique Appliquée.

COMPETING FINANCIAL INTEREST

Authors declare they have no competing financial interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: SG proteins and polyadenylated mRNA are well recruited to SGs despite impaired SG aggregation. (A - C) HeLa cells were transfected with siControl, siTDP-43, siG3BP1 for 72h. Coverslips were collected at 90 mins after SA treatment (0.5 mM, 30 mins). (A) Representative western blot to show the efficiency of siRNA transfections. (B) Coverslips were labelled for eIF4G, eIF3A or HuR and the SG marker TIA-1. Scale bar, 25 μ m. (C) Polyadenylated mRNA was visualized via fluorescence in situ hybridization with an oligo(dT) probe and HuR and TIA-1 labelling. Scale bar, 10 μ m. Representative micrographs from ≥ 3 independent experiments are shown. Line scans were used to assess colocalization (*histograms*).

Figure 2: TDP-43 and G3BP1 depletion induce a defect in basal translation. (A - C) HeLa cells were transfected with siControl, siTDP-43, siG3BP1 or siFUS for 72 h. Cells were stressed with 0.5 mM SA for 30 mins and collected at 90 (2) and 180 mins (3) and before stress (1). All samples were incubated with 50 μ M 35 S-methionine 30 mins before cell lysis. Samples were prepared in Laemmli Buffer and subjected to SDS-PAGE. (A) Experimental design. (B) Autoradiography of the cell lysates (top) and same gel stained with Coomassie Blue to demonstrate equivalent protein loading (middle). Histogram shows densitometric quantification of the entire lane and expressed relative to the Coomassie stained gel (bottom). The means \pm SEM of 3 independent experiments are plotted. * $p < 0.05$, compared to siControl; # $p < 0.05$, compared to Unstressed sample. (C) Polysome profiles and Polysome/Monosome (P/M) ratio (inset) of HeLa cells transfected with siControl, siTDP-43, siG3BP1 or siFUS for

72 h. The Polysome/Monosome ratios, means \pm SEM, of 3 independent experiments are plotted. * $p < 0.05$, compared to siControl.

Figure 3: Increased mRNA correlates with alterations in PBs in basal conditions. (A – F) HeLa cells were transfected with siControl, siTDP-43, siG3BP1 or siFUS for 72 h. (A) Polyadenylated mRNA was visualized via FISH with an oligo(dT) probe. Total cellular fluorescence was quantified from at least 10 cells per experiment from ≥ 3 experiments (35 cells per sample in total). Scale bar is 10 μm . (B) Whole cell lysates were examined by immunoblot for PB proteins Dcp1a and Xrn-1. Bands were quantified via densitometry and normalized to Actin. (C – F) Unstressed HeLa cells were labelled for Dcp1a (to visualise PBs) and TIA-1 (to visualize the nucleus). This data is extracted from the kinetics presented in Fig. S3C. (C) Representative images of ≥ 3 experiments. Scale bar, 25 μm . (D) Percentage of cells with PBs in basal conditions. (E) Quantification of the number of individual PBs per cell. (F) Quantification of individual PB size. In all cases, the means \pm SEM of 3 independent experiments are plotted. * $p < 0.05$.

Figure 4: SG-PB docking is dependent on SG size. (A – C & E- G) HeLa cells were transfected with siControl, siTDP-43, siG3BP1 or siFUS for 72 h. (C & D) Cortical neurons treated with TDP-43 siRNA. (A) Representative images of docking in siControl and siTDP-43 cells. Cells were labeled for TIA-1 and Dcp1a to follow SGs and PBs, respectively. Scale bar, 10 μm . (B) Quantification of docking between SGs and PBs in HeLa. PBs are considered docked when SGs and PBs were in contact. n = total number of events analyzed. (C) Representative images of transfected cortical neurons. Arrows indicate TDP-43^{Low} cells. Scale

bar, 10 μm . (D) Quantification of SG-PB docking in cortical neurons. TDP-43^{Low}, n = 45 neurons; TDP-43^{Endogenous}, n = 48 neurons. (E) Size of SGs when docked with PBs. (F) Distribution analysis of SG size. SG size was separated between small (0.75 – 2 μm^2) and large (2 – 5 μm^2) SGs in pie charts. (G) Average duration of docking between PBs and SGs analyzed by live stage imaging. All data is representative of ≥ 3 independent experiments and plotted as the mean \pm SEM. *, p<0.05.

Figure 5: Decreased mRNA preservation following stress exposure. (A – C) HeLa cells were transfected with siControl, siTDP-43, siG3BP1 or siFUS for 72 h and then subjected to two consecutive round of stress response induced by SA (SG assembly and disassembly). Coverslips were collected before stress, and after the first and the second round of SG assembly/disassembly. Polyadenylated mRNA was visualized via FISH with an oligo(dT) probe. (A) Experimental design. (B) Representative images labelled with an oligo(dT) probe and quantification of total pixel intensity. Scale bar 10 μm . (C) Representative images and quantification of a similar experiment performed in SH-SY5Y cells and examined only after the second SA stress exposure. Scale bar 10 μm . All data is representative of >3 independent experiments and plotted as the mean \pm SEM. *, p<0.05. Scale bar, 10 μm .

Figure 6: G3BP1 rescues SG-PB interactions and maintains polyadenylated mRNA levels. (A – C) HeLa cells transfected with control (“C”) or TDP-43 (“T”) siRNA for 48 h and transfected with GFP or G3BP1-GFP for 24 h and then subsequently treated with SA. (A) Representative confocal micrograph demonstrating low-level transient expression of G3BP1. Arrow indicates a typical example of a low-expressing cell that was quantified. Asterisks

indicate cells with high levels of G3BP1 expression which were excluded from the analysis. Scale bar, 10 μ m. (B) Coverslips were collected before and at 90 mins after stress and then labelled for Dcp1a and TIA-1 to follow PBs and SGs, respectively. Docking was quantified as before in low fluorescence GFP-expressing cells. (C) Cells were subjected to two consecutive rounds of stress response induced by SA (SG assembly and disassembly). Coverslips were collected before stress, and after the first and second rounds of stress. Polyadenylated mRNA was visualized via fluorescence in situ hybridization with a oligo(dT) probe and quantified as before. All data is representative of ≥ 3 independent experiments and plotted as the mean \pm SEM. *, $p < 0.05$ compared to unstressed siControl, #, $p < 0.05$ compared to unstressed of the same sample.

Figure 7: TDP-43 regulation of G3BP1 is conserved in *C. elegans*. (A) Adults worms fed with RNAi targeting *tdp-1*, *gtbp-1* or empty vector were grown on plates containing 240 μ M juglone. Worm death was counted every 30 mins during the first 2 h and after every 2 h thereafter until 6 h. (B) mRNA from N2 and *tdp-1(ok803)* worms was extracted. *gtbp-1* transcript levels were assessed by semi-quantitative RT-PCR. *act-3* served as the control.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1: Ribopuromycilation shows basal translation defect in siTDP-43 and siG3BP cells. HeLa cells were transfected with siControl, siTDP-43, siG3BP1 or siFUS for 72 h. Cells were pulsed with puromycin 5 mins before lysis. Cell lysates were immunoblotted with anti-puromycin antibody. Whole lanes were quantified and expressed relative to Actin (loading control).

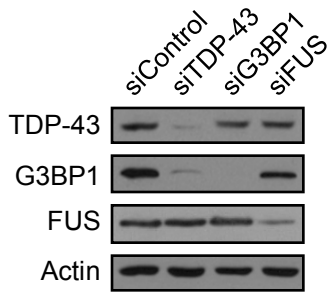
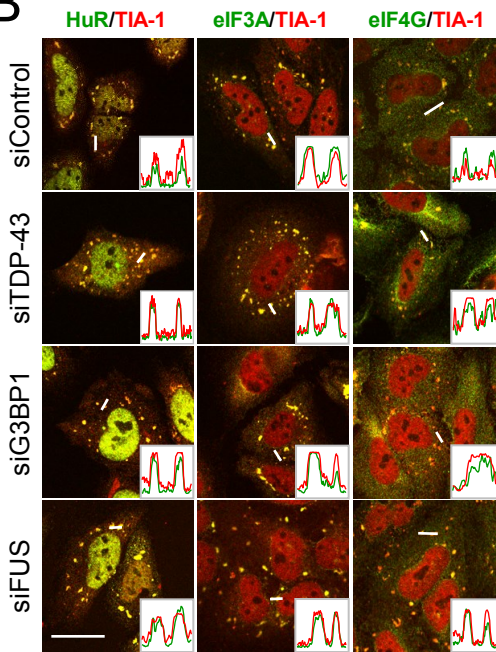
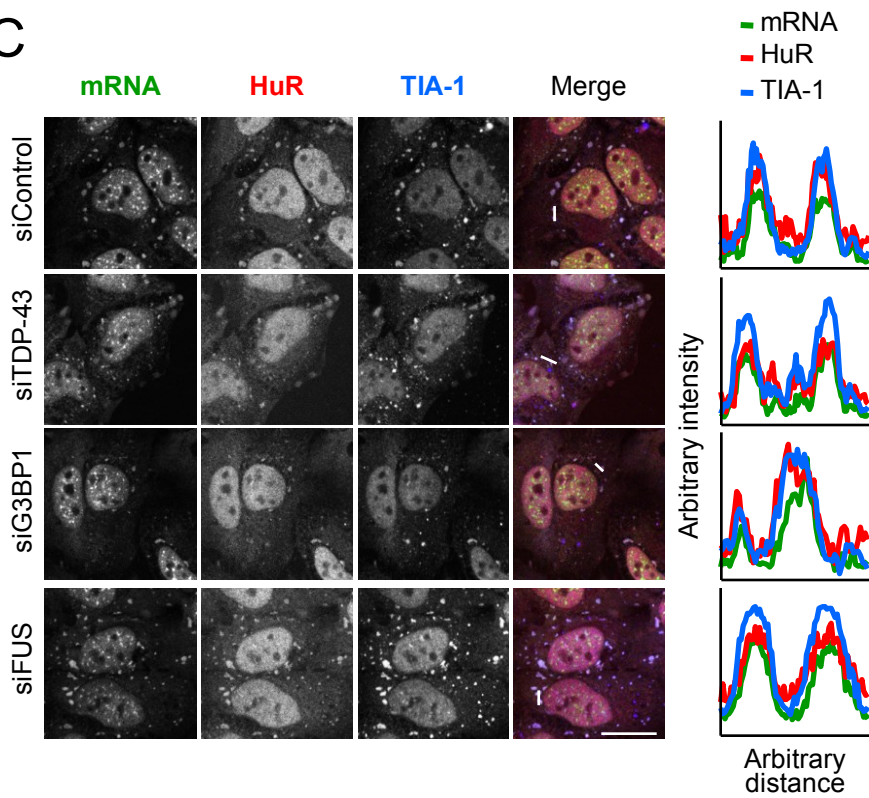
Figure S2: No defect in total RNA levels or mRNA localization in siRNA treated cells. (A) HeLa cells were transfected with siControl and two independent TDP-43 siRNAs. Cells were collected and counted prior to RNA extraction. RNA was measured and RNA quantity per cell was calculated. (B) HeLa cells were transfected with siControl, siTDP-43, siG3BP1 or siFUS for 72 h. Polyadenylated mRNA was visualized via FISH with a oligo(dT) probe. Ratios were made between oligo(dT) probe intensity measurements in the nucleus, cytoplasm and the whole cell.

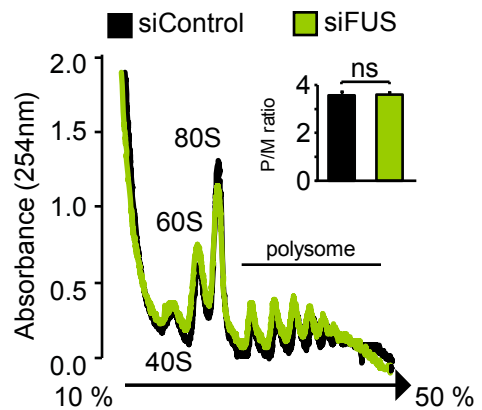
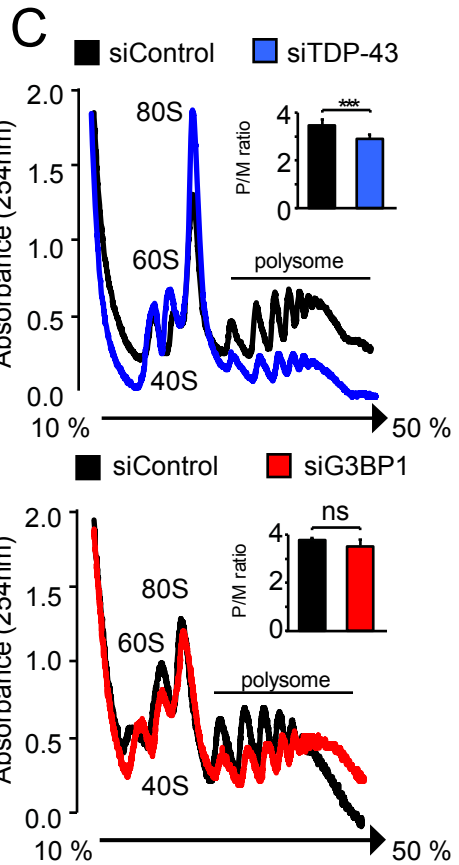
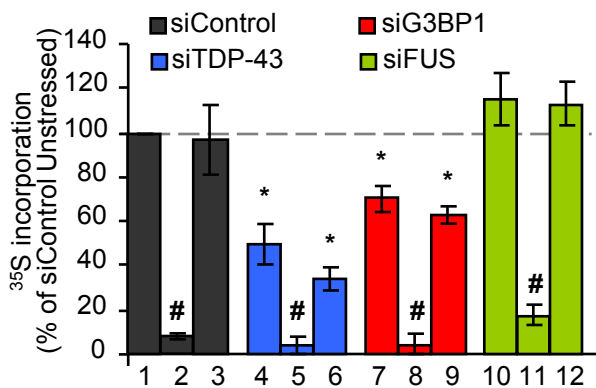
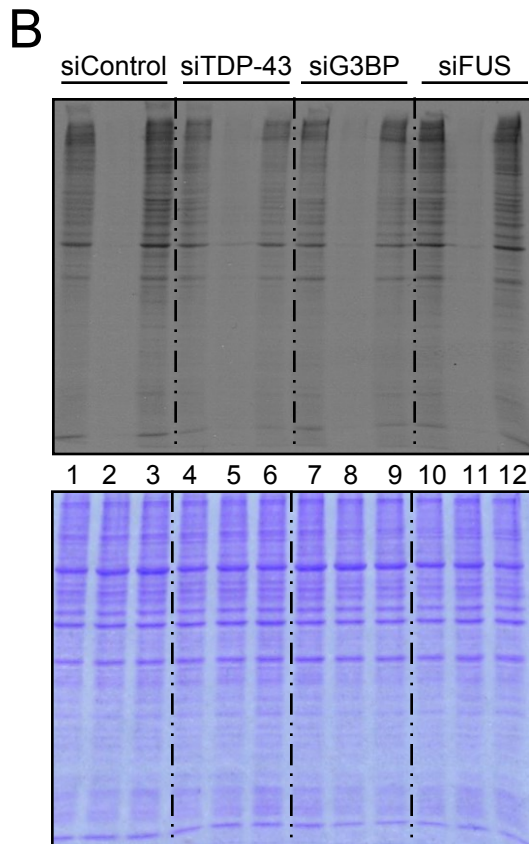
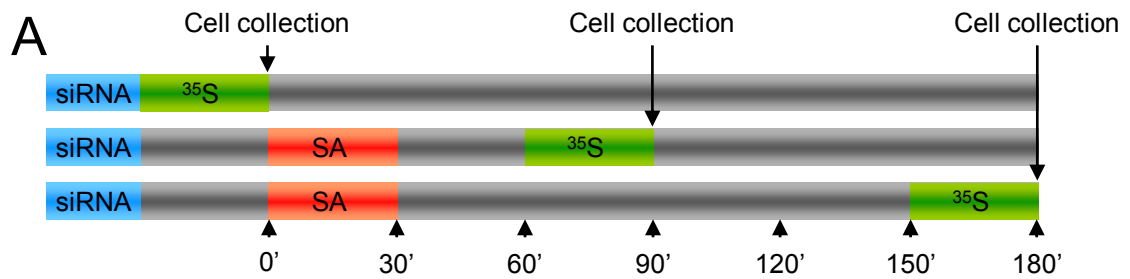
Figure S3: PBs are affected in basal conditions by siTDP-43, siG3BP1 and siFUS treatments. (B - D) HeLa cells were transfected with siControl, siTDP-43, siG3BP1 or siFUS for 72 h. (A - E) HeLa and (F) SH-SY5Y cells were transfected with siControl, siTDP-43#2, siG3BP1#2 or siFUS#2 for 72 h. (A - D) Cells were stained with Dcp1a to follow PBs (E) and TIA-1 to follow SG. (A & C) Coverslips were collected before stress, at 90 mins and 180 mins. (A & D) Cells with ≥ 2 Dcp1a⁺ puncta were counted as PB positive. (B) Coverslips were collected before, during (90 mins) and after (180 mins) the stress. (B - E) Cells were stressed with 0.5 mM SA. (B & C) PB analysis was performed using ImageJ. (C) Coverslips were collected before stress and at 30, 60, 90, 120, 150, 180, and 250 mins. (E - F) Docking Quantification. PBs are considered docked when SGs and PBs were in contact. All data is representative of ≥ 3 independent experiments and plotted as the mean \pm SEM. *, $p < 0.05$ compared to unstressed siControl, #, $p < 0.05$ compared to unstressed of the same sample.

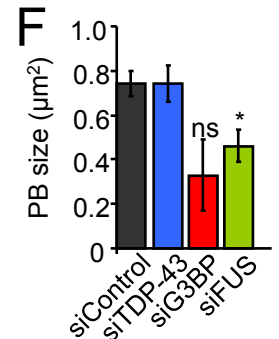
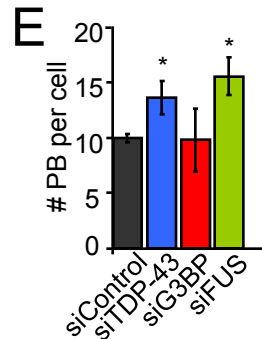
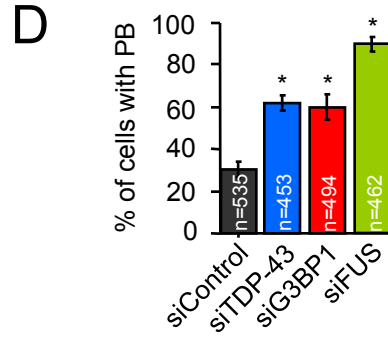
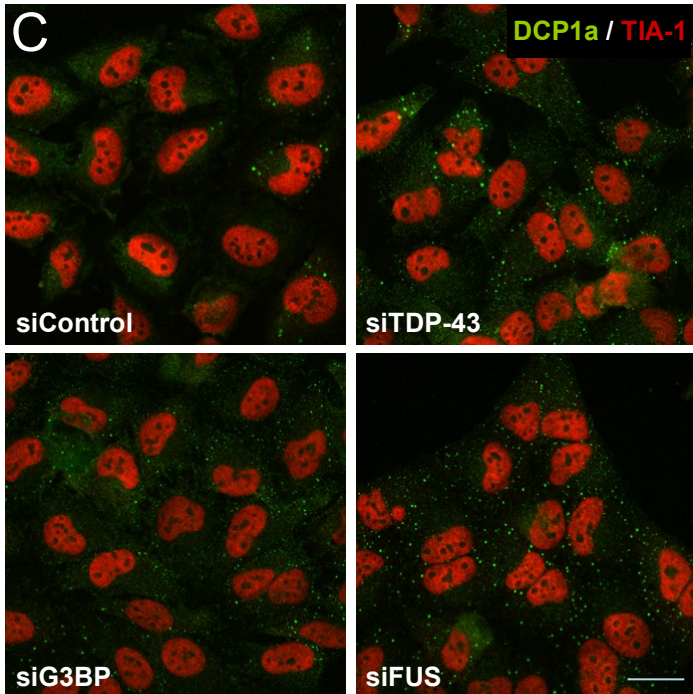
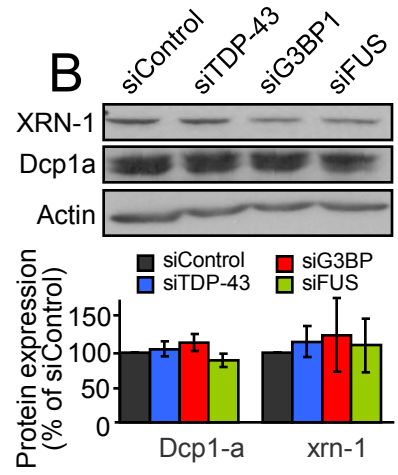
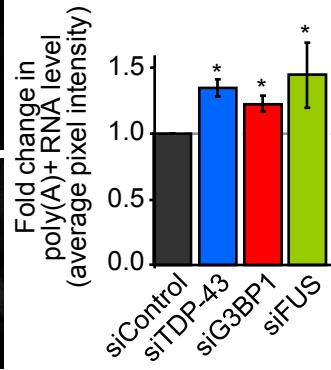
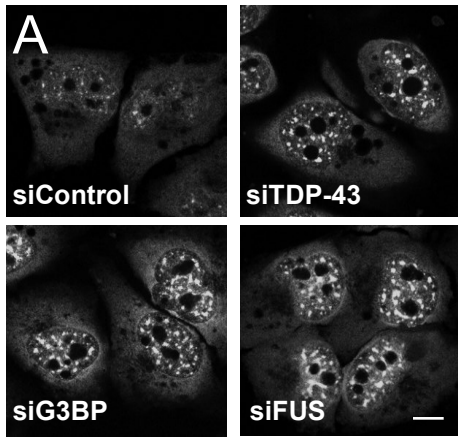
Figure S4: Induction of SGs by sodium arsenite in live HeLa cells. (A – C) HeLa cells were transfected with Control or TDP-43 siRNA for 48 h and then subsequently transfected with GFP-TIA-1 cDNA for 48 h. Cells were treated with 0.5 mM SA. (A) Cells were immediately imaged every 5 mins for 20 mins to observe SG formation. (B) Average number of interactions between PBs and SGs analyzed from live cell imaging. (C) Duration of docking between PBs and small SGs analyzed by live cell imaging. All data is representative of ≥ 3 independent experiments and plotted as the mean \pm SEM.

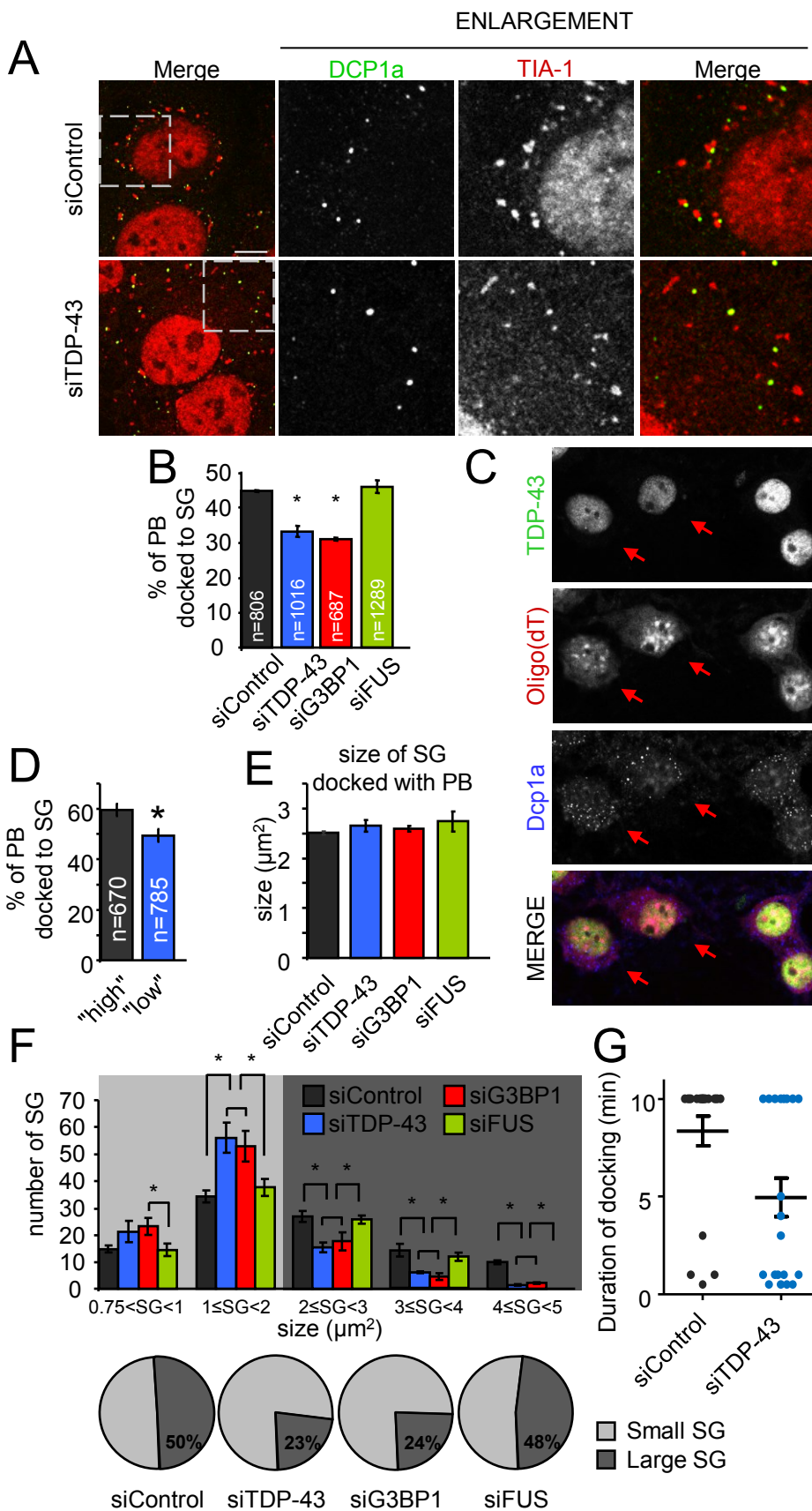
Figure S5: A second set of siRNA show similar results on mRNA preservation. HeLa cells were transfected with siControl, siTDP-43, siG3BP1 or siFUS for 72 h. Cell were subjected to two consecutive rounds of stress induced by SA (SG assembly and disassembly). Coverslips were collected before stress, after the first and the second round of stress. Polyadenylated mRNA was visualized via FISH with an oligo(dT) probe and quantified.

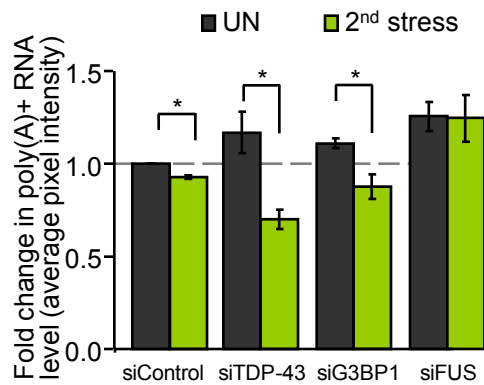
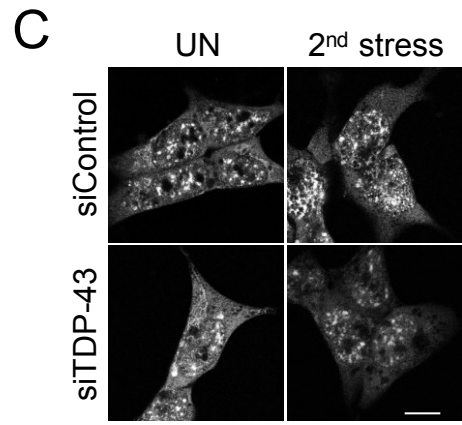
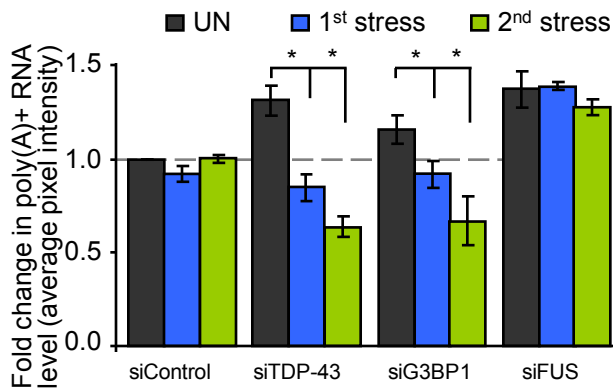
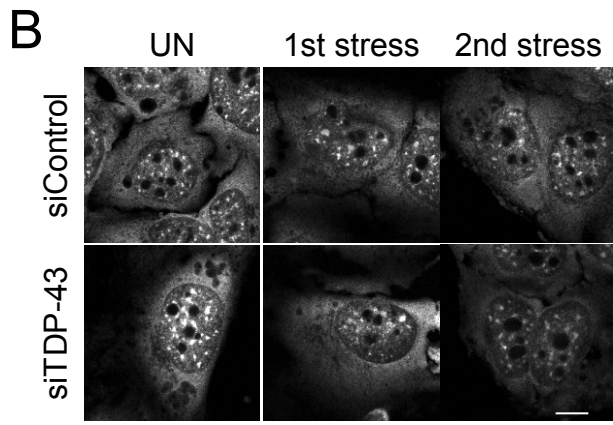
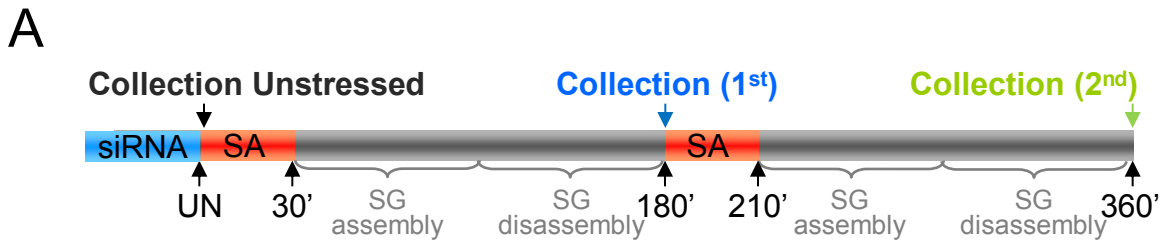
Figure S6: TDP-43 is recruited normally to SGs in G3BP1 and FUS depleted cells. Representative images of HeLa cells transfected with siControl, siTDP-43, siG3BP1 or siFUS for 72 h. Cells were stressed with 0.5 mM SA, 30 mins and fixed at 90 mins after the start of SA treatment. Scale bar, 10 μ m.

A**B****C**

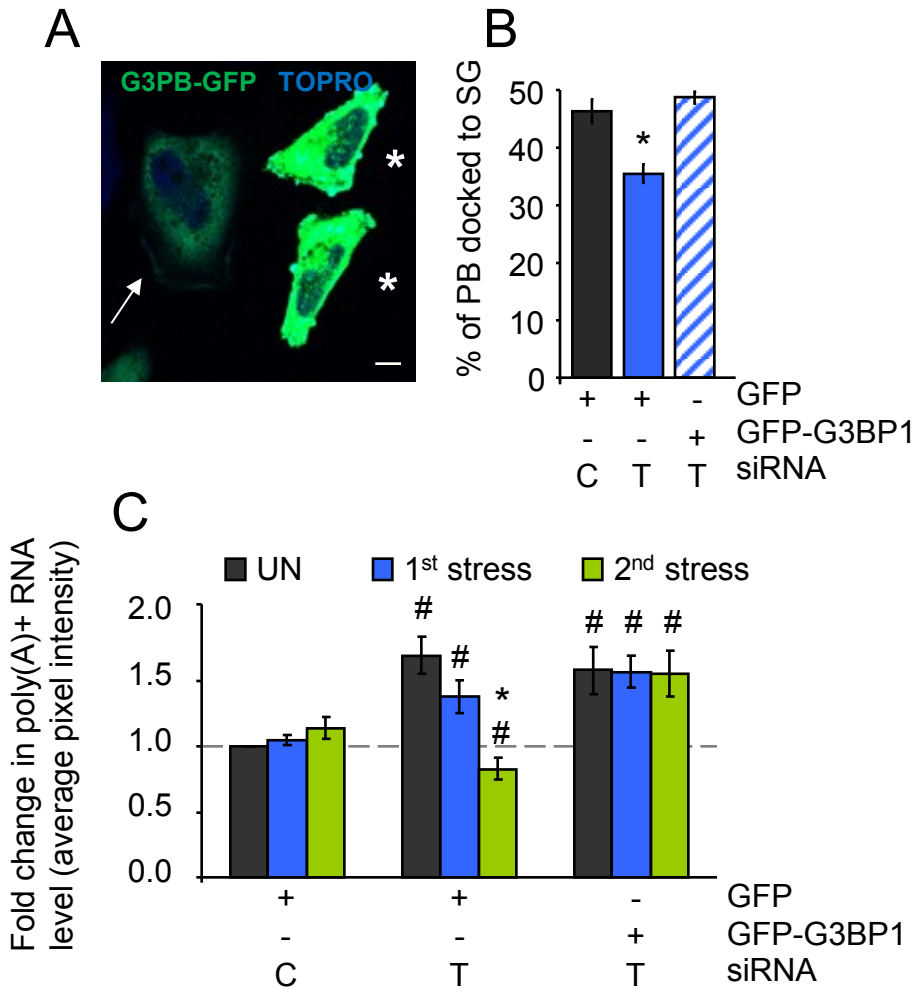




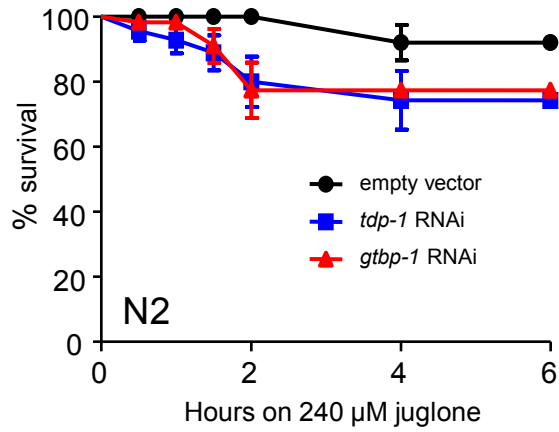
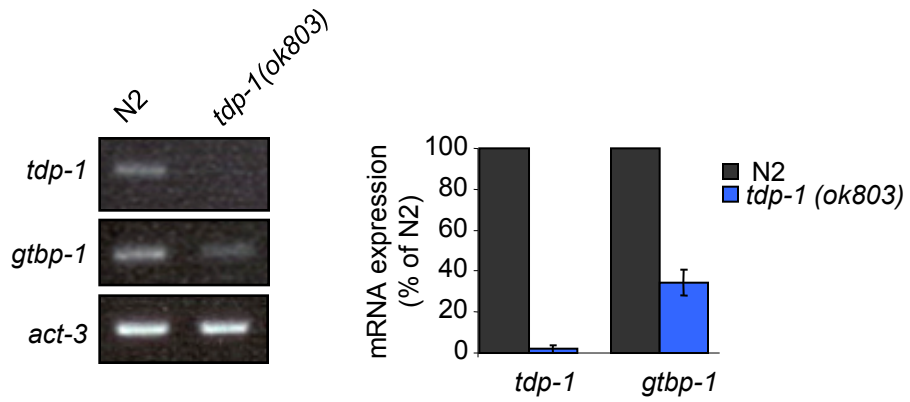


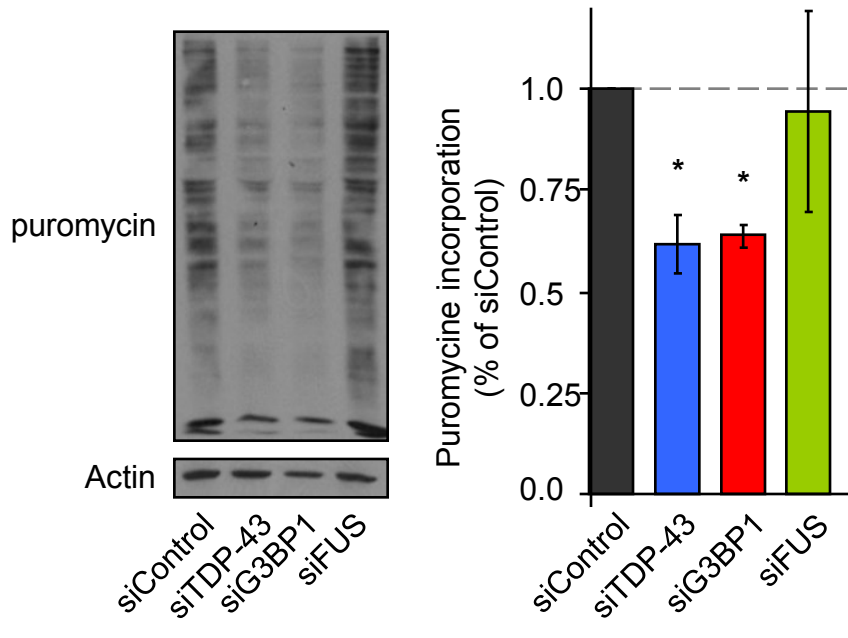


Aulas *et al*, Figure 5

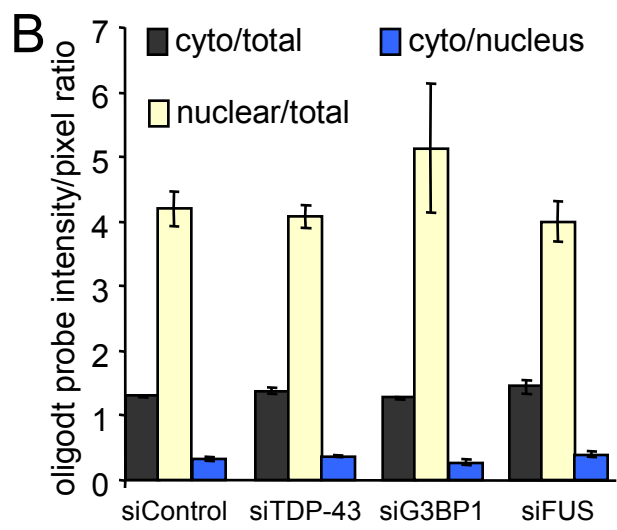
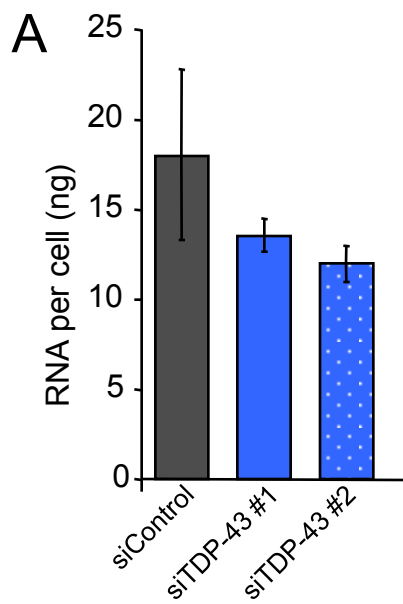


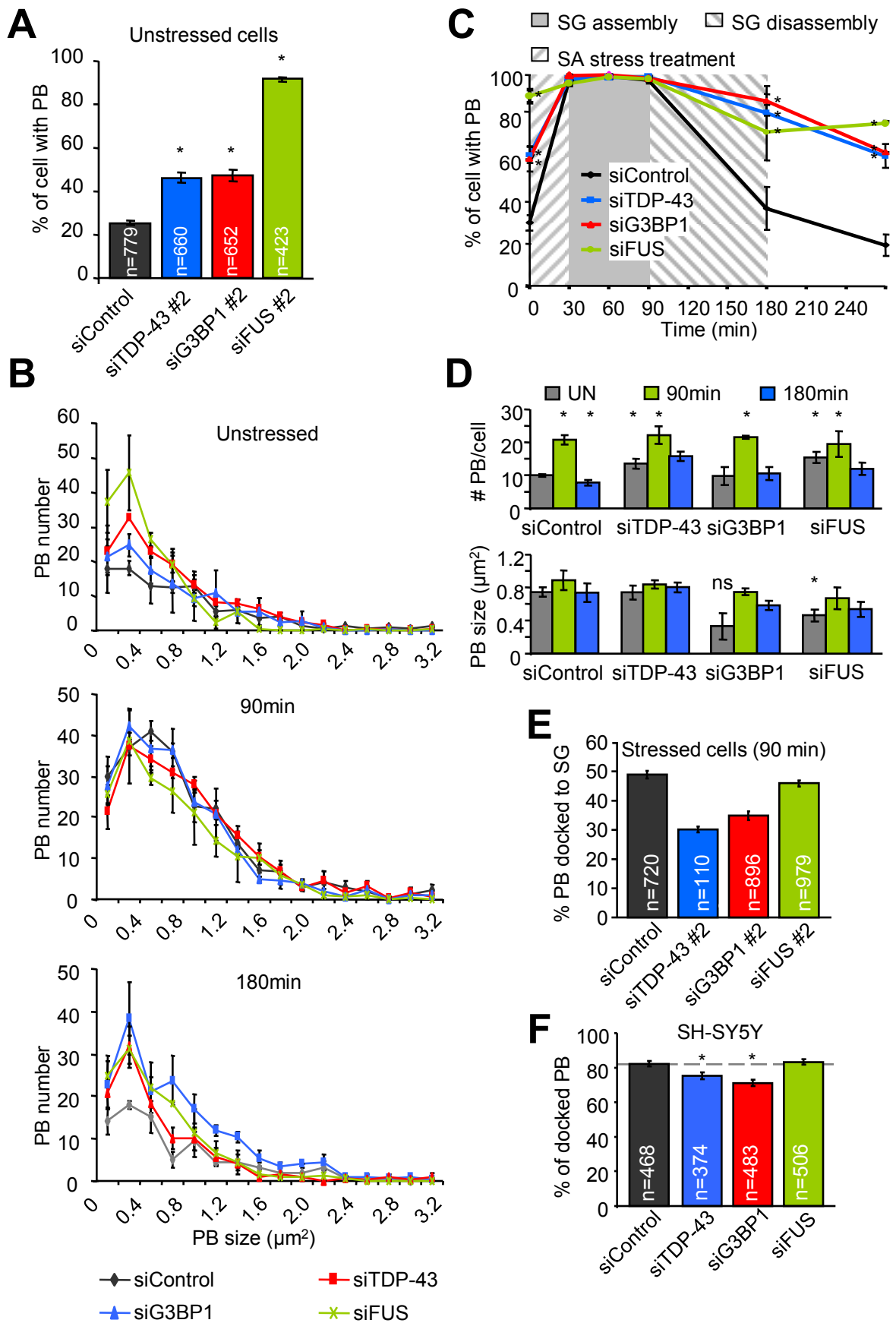
Aulas *et al*, Figure 6

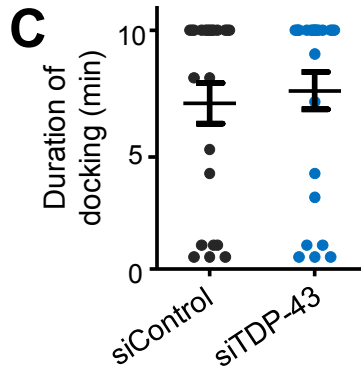
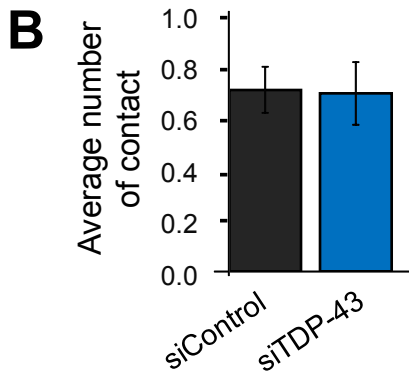
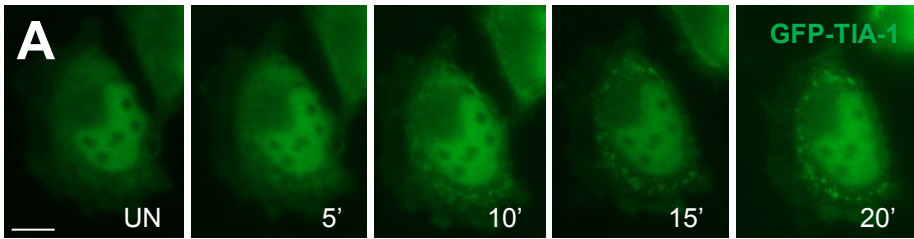
A**B**

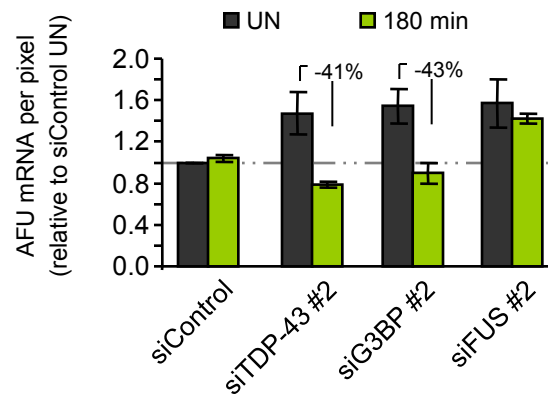


Aulas et al, Figure S1

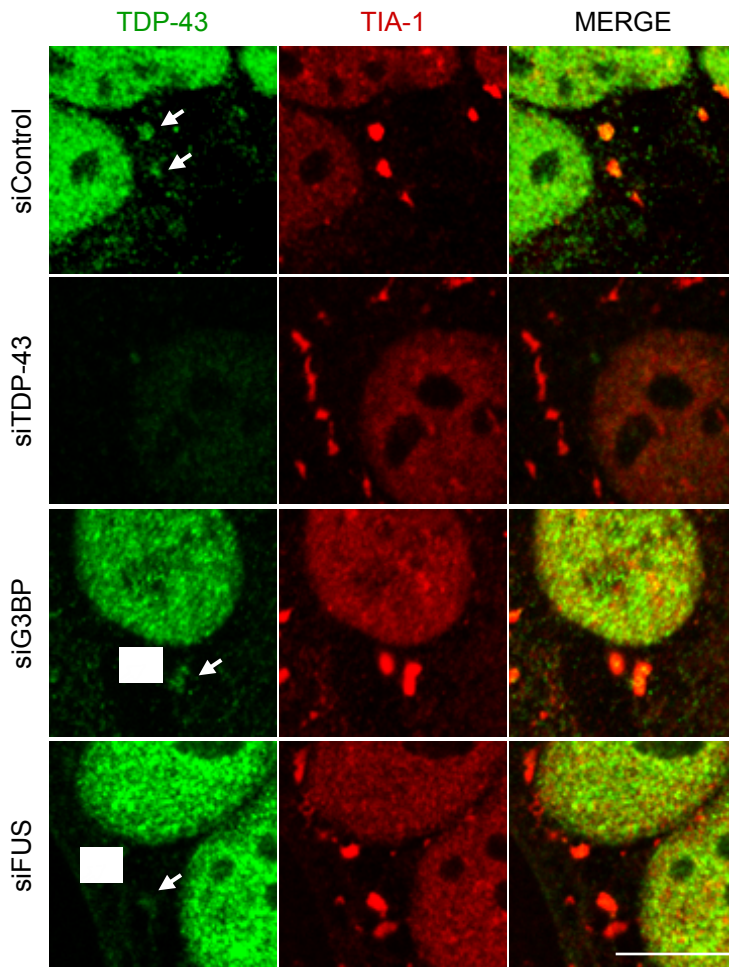








Aulas et al, Figure S5



Aulas *et al*, Figure S6

Discussion

1. G3BP1 régule la dynamique et la fonction des GS

Nos études, initialement basées sur TDP-43, ont peu à peu cherché à élucider les mécanismes moléculaires impliqués. Nous avons ainsi découvert que la régulation qu'exerce TDP-43 sur les GS se fait via G3BP1 (*Schéma 1*).

1.1. TDP-43 est un régulateur de l'expression de TIA-1 et de G3BP1

TDP-43 est le régulateur de l'expression de nombreux gènes [257-259]. De ce fait nous nous sommes demandé si TDP-43 pouvait avoir une action sur l'expression de protéines impliquées dans la formation des GS [11]. TIA-1 est la protéine la plus couramment utilisée comme marqueur des GS. Les raisons sont simples, sa surexpression suffit à la formation d'agrégats protéiques ressemblant à des GS [7] et sa déplétion entraîne une incapacité cellulaire à former des GS [38]. Ainsi, nous avons étudié par Western Blot et par qPCR le niveau d'expression de la protéine et de son ARNm. De manière inattendue, le niveau protéique de TIA-1 est supérieur de 1,3 fois au contrôle et le niveau d'ARNm près de 2,6 fois [11]. De ce fait nous ne pouvions attribuer le défaut de formation des GS à TIA-1. Or dans la littérature, une autre protéine est décrite pour avoir des effets similaires sur la formation des GS ; G3BP1 [37, 44, 45]. Cette fois l'analyse par WB nous avait révélé une perte d'expression de 79 % et la qPCR nous informe que le niveau d'ARNm est minoré de 3 fois par rapport au contrôle [11] (*Schéma 1*).

De la sorte, nous avons mis en évidence que TDP-43 a une action régulatrice différente sur deux des marqueurs des GS les plus couramment utilisés dans le domaine. Alors qu'elle va avoir une action inhibitrice sur l'expression de TIA-1, elle est activatrice pour G3BP1. Nous pensons donc que les mécanismes de régulation en jeux diffèrent qu'il s'agisse de TIA-1 ou de G3BP1. Nous avons montré que TDP-43 ne lie pas l'ARNm de TIA-1 (*Annexe 1, figure 8*). Bien que nous n'ayons aucune donnée à ce sujet, nous pensons que TDP-43 pourrait avoir une action répressive au niveau du promoteur de TIA-1 afin de réprimer sa transcription. Ainsi l'absence de TDP-43 va augmenter la transcription de TIA-1 et son expression. Ou encore, comme dans le cas de sa liaison avec la séquence TAR du VIH, TDP-43 interfère avec le complexe d'initiation de la traduction [139]. Il est aussi possible que l'action de TDP-43 sur l'expression de TIA-1 se fasse de manière indirecte via d'autres partenaire(s) protéique(s).

À l'inverse, TDP-43 lie l'ARNm de G3BP1 via son 3'UTR (*Annexe 1, figure 8, données non publiées*). Ceci nous suggère que TDP-43 pourrait avoir une action de stabilisation du transcrit comme pour l'ARNm de hNFL ou CDK6 [229, 230]. Ainsi la diminution d'expression de TDP-43 aboutirait à un défaut de stabilité de l'ARNm de G3BP1 et à sa dégradation. De plus, nous démontrons que la régulation de G3BP1 par TDP-43 est conservée chez l'organisme modèle *C. elegans* (*Aulas et al, soumis, figure 7*).

1.2. TDP-43 et G3BP1 régule la cinétique de formation et de désassemblage des GS

Dans notre première publication portant sur les GS, nous voulions étudier l'impact de TDP-43 sur la capacité cellulaire à répondre à un stress oxydatif par la formation des GS. La première expérience réalisée fut donc une cinétique. Après avoir déplété TDP-43, nous avons soumis les cellules à un stress oxydatif (0.5 mM SA, 30 min). Les cellules arborant des GS

dans le cytoplasme ont été comptabilisées à différents temps de la cinétique. Nous avons déterminé, d'une part, que la déplétion de TDP-43 aboutissait à un retard dans la formation des GS (moins de cellules sont capables de former des inclusions au début de l'exposition au stress), mais d'autre part, le désassemblage de ces inclusions était aussi plus rapide [11].

A la suite de cette étude, comme la déplétion de TDP-43 aboutit à une diminution d'expression de G3BP1, nous avons voulu savoir si les phénotypes observés devaient être attribués à la déplétion de TDP-43 ou à la perte d'expression de G3BP1. Ainsi nous avons inclus à notre analyse des échantillons traités à l'aide d'ARNi contre G3BP1. Les cellules ayant un niveau réduit de G3BP1 possèdent, elles aussi, un retard dans l'assemblage des GS et un désassemblage accéléré (Annexe 2, figure 9, données non publiées).

1.3. TDP-43 régule l'agrégation secondaire via G3BP1

Par la suite, les GS ont été étudiées de plus près à différents points de la cinétique afin de comprendre les mécanismes aboutissant au défaut de formation. En effet, lors de la formation des GS, après l'étape de nucléation, représentant leur apparition, les nombreux petits GS vont fusionner pour donner des GS plus gros et moins nombreux [7] lors de l'étape de l'agrégation secondaire [31, 51, 69, 73, 74]. Ce phénotype est observé dans le cadre des cellules traitées avec un ARNi contrôle entre 60 et 90 minutes (Aulas *et al*, 2012, figure 1, 2 et 4). Cependant, cette étape est complètement abolie par la déplétion de TDP-43 et de G3BP1 où les GS n'augmentent pas en taille et ne diminuent pas en nombre (Aulas *et al*, 2012, figure 1, 2 et *Schéma 1*). De plus, la réexpression de G3BP1 dans les cellules ayant subi une déplétion de TDP-43 est suffisante pour restaurer intégralement le processus d'agrégation secondaire (Aulas *et al*, 2012, figure 3). Ceci nous incite à penser que l'effecteur de cette étape

est en fait G3BP1. Le fait que TDP-43 soit efficacement recruté au niveau des GS lors de la déplétion de G3BP1 confirme que l'impact de TDP-43 sur l'agrégation secondaire est indirecte et se fait via l'intermédiaire de G3BP1 (Aulas *et al*, soumis, figure S6, *Schéma 1*).

1.4. L'agrégation secondaire est déterminante pour la fonction de préservation des ARNm pendant l'exposition au stress.

Bien que certaines évidences soient présentes pour démontrer un rôle protecteur des GS lors de la réponse au stress [61, 64, 75], le mécanisme de protection n'est pas encore clairement élucidé. Comme mentionné dans l'introduction, le modèle défendu par le laboratoire du Dr. P. Anderson propose que les GS seraient un centre de tri qui va protéger les ARNm en attendant que la cellule ne décide de leur devenir [30]. En protégeant les ARNm de la dégradation due au stress, les GS joueraient ainsi leur rôle protecteur. Ayant un modèle où la formation des GS est affectée, nous avons entrepris de déterminer à l'aide de résultats concrets, si la protection/préservation des ARNm est affectée par la déplétion de TDP-43/G3BP1.

La plupart des études visent à étudier le recrutement d'ARNm spécifique(s) au niveau des GS [88, 260]. Or la fonction de protection accomplie par les GS devrait se faire sur la totalité des ARNm présents dans la cellule. Dans cette optique nous voulions étudier la protection/préservation des ARNm dans leur ensemble. En conséquence les cellules ont été marquées par FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) à l'aide d'une amorce oligo(dT) et l'intensité globale par cellule a été quantifiée comme décrit dans la publication de *Higashi et al*, [253]. Alors que dans les cellules contrôle, le taux d'ARNm polyadénylés reste constant après deux expositions consécutives au stress, dans les cellules traitées par ARNi contre TDP-

43 ou G3BP1, une diminution est observée après chaque exposition au stress (Aulas *et al*, soumis, figure 5 et *Schéma 1*). Ainsi les ARNm ne sont pas correctement préservés de la dégradation induite par l'exposition au stress dans les cellules où l'agrégation secondaire est inefficace mais la réexpression de G3BP1 après déplétion de TDP-43 inhibe la dégradation des ARNm consécutive à l'exposition au stress (Aulas *et al*, soumis, figure 6).

Dans cette expérience, aucune distinction entre les ARNm polyadénylés est possible. Il se peut qu'une fraction d'entre eux soit plus affectée par l'exposition au stress qu'une autre. Mais à l'heure actuelle, aucune équipe n'a effectué d'analyse par microarray ou « RNA sequencing » afin de vérifier quels seraient les ARNm dont la stabilité serait affectée par l'exposition au stress dans le contexte d'une déplétion de TDP-43/G3BP1.

1.5. TDP-43 régule aussi l'interaction entre GS et PB via G3BP1

Lors de la réponse cellulaire au stress, les GS vont alors interagir avec d'autres structures appelées PB. Cette interaction connue sous le nom de « docking », est supposée être le moment clé où les deux structures échangent des ARNm et des protéines [30, 33]. Selon le modèle proposé en cellule de mammifère, les ARNm seraient d'abord dirigés vers les GS. A ce niveau, les GS constitueraient un centre de tri qui orienterait les ARNm vers la dégradation dans les PB, ou vers un retour à la traduction une fois que l'exposition au stress est terminée, ou encore les stockerait dans un but protecteur [33].

A la suite de la déplétion de TDP-43 ou de G3BP1, une baisse de la quantité d'ARNm polyadénylés est observée après exposition(s) au stress. Il est probable que ces ARNm aient été dégradés. De ce fait, si les ARNm sont initialement dirigés vers les GS, le centre de triage,

avant de subir une dégradation dans les PB, on serait alors en mesure d'attendre une augmentation de l'interaction entre les GS et les PB. Or, lors de la perte d'expression de G3BP1 (via ARNi, ou suite à la déplétion de TDP-43), une diminution du « docking » est finalement observée dans deux lignées cellulaires différentes (HeLa et SH-SY5Y). Dans les cultures primaires de neurones corticaux, la déplétion de TDP-43 aboutit au même phénotype (Aulas *et al*, soumis, figure 4). De plus la réexpression de G3BP1 dans les cellules traitées par ARNi contre TDP-43 abolit la diminution de la quantité d'ARNm consécutive à chaque exposition au stress (Aulas *et al*, soumis, figure 6 et *Schéma 1*).

Ces résultats nous ont amené à considérer le modèle défendu par l'équipe du Dr. R. Parker en levure où les ARNm pourraient être recrutés par les PB avant d'être dirigés vers les GS [84]. Dans ce modèle, une diminution du « docking » diminuerait le flux d'ARNm en direction des GS. Ces ARNm seraient alors « piégés » dans les PB et sujets à la dégradation au lieu d'être « protégés » dans les GS.

Plusieurs équipes ont émis l'idée que les deux modèles du flux des ARNm en condition de stress cohabitent [70, 102-104]. De ce fait, en réponse à un stress les ARNm pourraient être recrutés à la fois par les PB et les GS avant d'être échangés. L'équilibre entre ces deux processus serait un facteur déterminant dans la protection des ARNm. Dans le cas de la déplétion de TDP-43 ou de G3BP1, il serait possible que la voie prioritaire envoie les ARNm vers les PB. Le « docking » étant diminué dans ces cellules, alors les ARNm seraient dégradés dans les PB en réponse au stress au lieu d'être protégés dans les GS.

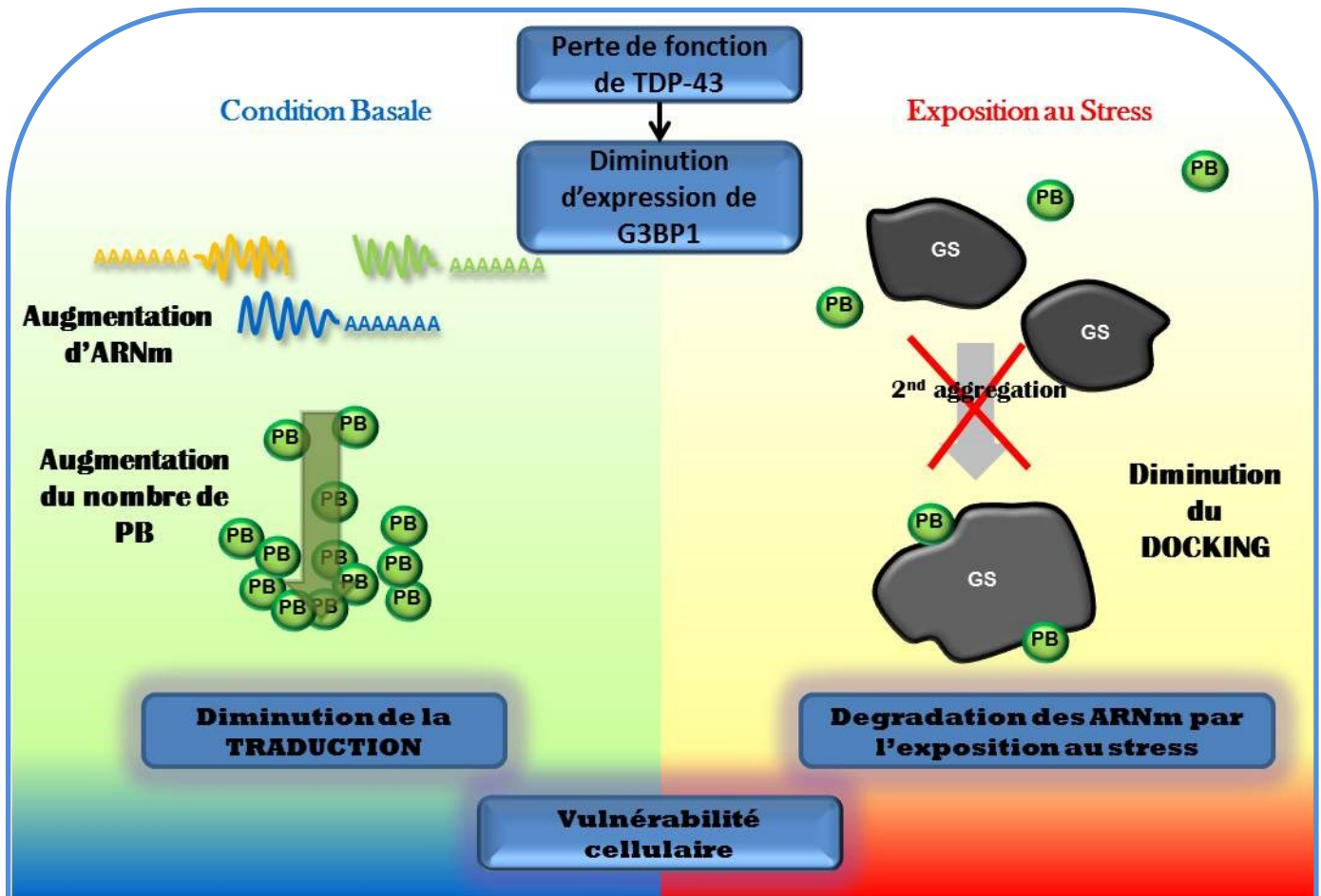


Schéma 1: Modèle récapitulatif

L'action de TDP-43 sur la dynamique et la fonction des GS se fait via la régulation de sa cible G3BP1.

En condition basale, la diminution d'expression de G3BP1 induit une augmentation de la présence d'ARN polyadénylés, qui, à son tour provoque l'augmentation du nombre de PB et une diminution de la traduction aboutissant à un sensibilisation de la cellule.

En condition de stress, la diminution de G3BP1 bloque l'agrégation secondaire induisant une diminution du docking et une augmentation de la dégradation de ARNm induite par l'exposition au stress, aboutissant à une mortalité cellulaire exacerbée.

1.6. G3BP1 essentielle à la survie cellulaire après stress dans les cellules de type neuronal

Dans un organisme complet, la déplétion de TDP-43 ou de G3BP1 est létale au niveau embryonnaire [47, 160-162], démontrant ainsi un rôle majeur dans la survie et /ou le développement. Dans les cellules SK-N-SH, une lignée « neuronale », nous avons démontré que la déplétion de TDP-43 et de G3BP1 induit une augmentation de la mortalité par rapport

aux cellules contrôles, déjà en condition basale (test au bleu trypan). Cette mortalité double après l'exposition à un stress oxydatif (Aulas *et al*, 2012, figure 5 et *Schéma 1*). Nous expliquons cette augmentation par une absence de réponse adéquate au stress. Ainsi, le défaut d'agrégation secondaire des GS, induisant une perte de fonction de protection des GS aboutirait à une augmentation de la mortalité cellulaire. Ce rapport n'est pas le premier liant une altération de formation des GS et une augmentation de la mortalité cellulaire [61, 64, 75]. Ces données vont dans le sens de l'hypothèse selon laquelle l'exposition à un/des stress environnementaux répétés causerait la vulnérabilité cellulaire spécifique accrue dans le cadre de la SLA.

2. La perte de fonction de FUS n'agit ni sur la formation ni sur la fonction des GS

De nombreuses études relient TDP-43 et FUS dans les mêmes processus cellulaires [125, 138, 158, 195, 261, 262]. De ce fait nous avons étendu notre étude, initialement portée sur TDP-43, sur FUS. Travaillant sur une hypothèse de perte de fonction pour TDP-43, l'étude sur FUS a été réalisée dans la même optique.

2.1. La déplétion de FUS n'entrave pas la formation des GS

Dans un premier temps nous avons fait une cinétique du nombre de cellules formant des GS suite à l'exposition d'une demi-heure à l'arsénite de sodium. De manière imprévue, la capacité à former des GS dans les cellules ayant une baisse d'expression de FUS n'est pas différente des cellules contrôles jusqu'à 90 minutes (Annexe 3, figure 10, données non

publiées). Les GS vont aussi effectuer l'étape d'agrégation secondaire ; diminution du nombre de GS et augmentation de leur taille (Aulas *et al*, 2012, figure 4). Ces résultats ont été confirmés par une autre équipe [263]. Cependant, les GS sont légèrement plus petits que ceux dans les cellules contrôles à 90 minutes. Cette différence de taille nous porte à croire que FUS pourrait avoir un rôle dans le maintien des GS ; sa déplétion pourrait aboutir à un désassemblage accéléré. De plus amples investigations sont à prévoir sur cet aspect.

TDP-43 et FUS sont certes souvent impliqués dans les mêmes mécanismes cellulaires [125, 138, 158, 195, 261, 262], ces deux protéines n'ont que très peu de cibles en commun [138, 195, 206]. Ainsi nous avons pu mettre en évidence que la déplétion de FUS n'a aucune influence sur l'expression protéique de TIA-1 ni de la protéine effectrice G3BP1 (Aulas *et al*, 2012, figure 4), expliquant de ce fait que la déplétion de FUS n'ai pas d'impact sur la formation des GS.

2.2. La déplétion de FUS n'altère pas la fonction des GS

La déplétion de FUS n'a pas d'effet sur la formation de GS. Afin de nous assurer que la taille des GS est bien déterminante dans l'établissement de leur fonction, nous avons étudié si la déplétion de FUS régule la fonction des GS. Ainsi, nous avons pu constater que l'interaction entre les GS et les PB, ne sont nullement affectés par la déplétion en FUS (Aulas *et al*, soumis, figure 4). Nous pouvons en déduire que les échanges en ARNm et en protéines entre les deux structures cytoplasmiques ne sont donc pas altérées. De plus, FUS semble être ne pas être essentiel pour la préservation des ARNm en réponse à un stress (Aulas *et al*, soumis 5), figure 4). Dernièrement les cellules ayant une diminution de l'expression de FUS

ne présentent aucune augmentation de la mortalité cellulaire en condition basale et suite à l'exposition à un stress oxydatif (Aulas *et al*, 2012, figure 5).

2.3. Mécanisme potentiel de toxicité de FUS

Nous avons démontré que la déplétion de FUS n'altère pas la fonction des GS. Bien que la protéine sauvage ne soit pas recrutée au niveau des GS [29], elle aurait pu avoir une action indirecte sur les GS. Cependant, les mutations reliées à la SLA affectant la protéine induisent son inclusion dans les GS. De ce fait, nous pouvons penser que FUS pourrait agir sur la fonction des GS via un mécanisme de gain de fonction. En effet certains phénotypes sont communs entre les cellules traitées par ARNi contre TDP-43 et celles qui surexpriment un mutant FUS ; les cellules présentent un retard de formation des GS et un désassemblage plus rapide [11, 241]. De ce fait, même si les mutations affectant FUS ne semblent pas avoir d'effet sur l'expression de G3BP1 [241], il se pourrait qu'elles aient un impact sur les modifications post-traductionnelles qui altèrent les fonctions de la protéine [37, 42, 43].

L'équipe du Dre. D. Bosco montre que la déplétion de FUS n'empêche pas la formation de GS. Les lignées stables déplétées en FUS établies en cellule NSC34 présentent une augmentation de la mortalité cellulaire 2 fois supérieure aux cellules contrôles [242].

3. Dérégulation du niveau d'ARNm et traduction

Bien que TDP-43 et FUS n'aient pas la même action sur la formation et la fonction des GS, toutes deux sont impliquées à diverses étapes dans le métabolisme des ARNm [264]. Ainsi dans le cadre de notre dernière publication nous avons pu mettre en évidence que leur déplétion respective entraîne une augmentation du niveau d'ARNm en condition basale (Aulas

et al, soumis, figure 3 et 5). Le niveau d'ARNm dans la cellule est normalement, un mécanisme extrêmement contrôlé où le taux de transcription est très étroitement relié au taux de dégradation des ARNm [265, 266]. A ce stade de nos investigations, nous ne pouvons pas déterminer si cette dérégulation est le fait d'une augmentation de la transcription ou une diminution de la dégradation en absence de stress.

Si la relation entre le taux d'ARNm présent dans le cytoplasme et la traduction était linéaire, nous pourrions nous attendre à obtenir une traduction supérieure après déplétion de TDP-43 ou de FUS par rapport aux cellules contrôles. Cependant, bien que le niveau d'ARNm soit équivalent entre les cellules traitées pas ARNi contre TDP-43 ou FUS, nous constatons que la traduction est différemment affectée. En effet, après déplétion de FUS la traduction n'est pas significativement différente de celle observée dans les cellules contrôles. Or la déplétion de TDP-43 entraîne une réduction significative de la traduction par rapport au contrôle (*Aulas et al, soumis, figure 2 et S1*). En résumé, dans les deux cas la traduction est plus basse qu'attendue, mais l'effet est d'autant plus marqué après déplétion de TDP-43.

Les PB sont des structures impliquées à la fois dans la répression de la traduction et dans la dégradation des ARNm [84-87]. Cependant, les ARNm « aberrants » ciblés pour la dégradation sont recrutés au niveau des PB [255]. De plus l'inhibition de plusieurs étapes dans la dégradation des ARNm (déplétion de XRN1 ou DCP1a) aboutit à l'accumulation des ARNm provoquant, ici encore, la formation de PB [84, 85, 252]. Ainsi suite à la déplétion de TDP-43 ou de FUS, le nombre de cellules arborant des PB dans leur cytoplasme en condition basale est augmenté respectivement de deux et trois fois (*Aulas et al, soumis, figure 3D et S3*). Nous avons démontré que le niveau des protéines XRN1 et DCP1a n'est pas affecté par la

déplétion de TDP-43 ou celle de FUS (*Aulas et al, soumis, figure 3B*). Cependant, il se pourrait que les déplétions de TDP-43 et de FUS interfèrent avec la dégradation des ARNm aboutissant à l'accumulation des ARNm « défectueux » dans la cellule provoquant ainsi une augmentation des PB aboutissant à une répression de la traduction.

4. Implications des microtubules ?

4.1. La déplétion de TDP-43 ne perturbe pas le réseau de microtubule

Les microtubules sont impliqués dans l'ensemble de la cinétique de formation des GS. En effet certaines étapes, comme la coalescence ou le désassemblage sont des processus actifs qui font intervenir les protéines motrices et les microtubules [73, 108]. La déplétion de protéines impliquées dans le transport par microtubule peut à la fois affecter la formation des GS et des PB [28, 267, 268]. De plus une déstabilisation des microtubules engendre à la fois un défaut d'agrégation secondaire des GS et un désassemblage accéléré [105, 107], mais aussi une augmentation de la présence de PB [81, 109, 267, 268]. Ces phénotypes sont retrouvés lors de la déplétion de TDP-43 et/ou G3BP, or nous avons mis en évidence que le réseau de microtubule ne semble pas être affecté par la déplétion de TDP-43 (Annexe 4, figure 11). Cependant, d'autres partenaires protéiques sont nécessaires au transport via les microtubules, comme par exemple les protéines motrices ou adaptatrices.

4.2. Lien fonctionnel entre TDP-43 et les protéines motrices et adaptatrices

L'analyse des résultats de l'expérience de CLIP (Cross Linked Immuno Precipitation) effectuée dans le laboratoire du Dr. DW. Cleveland démontre que TDP-43 lie les ARNm de huit protéines de la famille des kinésines ou en interaction avec des kinésines (Track1, Track2,

Kcl1, Kifap3, Kif3c, Kif3a, Kif5a, Kif5c) et trois protéines de la famille des dynéines (DynII2, Dync1li2, BicD1) [198]. En tenant compte du rôle de régulation des ARNm de TDP-43, nous pouvons supposer que sa déplétion pourrait avoir un impact sur l'expression de ces protéines et ainsi sur le transport via les microtubules. De surcroît un lien fonctionnel a été mis en évidence via des analyses bioinformatiques entre TDP-43 et les deux protéines motrices Kif1c et BicD2 [269].

En addition de son rôle potentiel sur les protéines motrices, TDP-43 régule certaines protéines adaptatrices essentielles au « chargement » des GS sur les microtubules. En effet, d'après le modèle défendu par Kwon *et al*, les GS interagiraient avec les protéines motrices par l'intermédiaire de G3BP1 et de HDAC6, deux cibles de TDP-43 [11, 24, 259]. Ainsi lors de la déplétion de TDP-43, les GS perdent deux des protéines cargo impliquées dans leur transport via les microtubules. C'est pourquoi, même si les microtubules en eux-mêmes ne sont pas affectés par la déplétion de TDP-43, le transport via les microtubules peut l'être.

Un défaut de transport via les microtubules a été observé sur plusieurs modèles de SLA ou les auteurs concluent aussi à une potentielle déficience des protéines motrices ou adaptatrices [154, 270, 271]. Ceci pourrait potentiellement être un des mécanismes de toxicité dans le cadre de la pathologie de la SLA.

5. Inclusions pathologiques / granules d'ARNm

5.1. Co-localisation avec des marqueurs des GS

Tableau 3 : Récapitulatif des marqueurs des GS et PB retrouvés dans les inclusions pathologiques

Protéine SLA	Marqueur des GS		marqueur des PB	type de patients	Tissus	références
	positif	Négatif				
TDP-43		TIA-1, HuR		3 SLAs	moelle épinière	[17]
TDP-43	TIA-1			SLAs		[272]
			XRN1, peu fréquent			
FUS	PABP1, eIF4g			1 SLAf FUS _{R521C} 7 FUS-DFTs	moelle épinière	[273]
TDP-43		PABP1, eIF4g		2 TDP-43-DFTs		
TDP-43	eIF3, TIA-1		négatif pour Dcp1a (non montré)	SLA DFT	moelle épinière cortex frontal	[124]
TDP-43	PABP1 (66 % des cas)			TDP-43-SLA	moelle épinière	[27]
		PABP1		TDP-43-DFT	Hippocampe	

Chez les patients atteints de SLA, des inclusions pathologiques sont retrouvées dans le cytoplasme des neurones et des cellules gliales [137]. En 2006, deux équipes découvrent que TDP-43 est un constituant majeur de ces inclusions [123, 140]. En 2009, TDP-43 est identifié en tant que composant des GS pour la première fois [17]. Dans le but d'essayer de comprendre le mécanisme de formation des inclusions pathologiques, certaines équipes ont avancé l'hypothèse selon laquelle ces inclusions pourraient être le résultat de GS qui ne se seraient pas désassemblés. De ce fait, plusieurs équipes ont tenté de trouver des marqueurs des GS dans les inclusions pathologiques (Tableau 3). La question reste encore ouverte, car certaines études montrent une co-localisation entre TDP-43 ou FUS et les marqueurs des GS [27, 124, 272, 273], tandis que d'autres n'en trouvent pas [17, 273]. Cependant, certains marqueurs des GS sont aussi retrouvés dans les PB, comme TIA-1 et HuR [21, 26].

5.2. Manque d'évidence de « non désassemblage »

Nos données, basées sur l'hypothèse de perte de fonction, prouvent que l'absence de TDP-43 accélère le désassemblage des GS. Des données préliminaires nous amènent à penser que l'absence de FUS pourrait éventuellement avoir le même effet. De ce fait, l'hypothèse de gain de fonction voudrait que les GS ne se désassemblent peu/pas après l'exposition au stress en présence de mutation affectant TDP-43 ou FUS et forment les inclusions cytoplasmiques pathologiques observées chez les patients.

L'expression de protéines mutantes, qu'il s'agisse de TDP-43 ou de FUS, induit une augmentation de la taille des GS formés en réponse à l'exposition au stress [8, 241]. Les GS étant plus gros, il serait raisonnable de penser que leur désassemblage pourrait être plus long ou ne pas survenir. Cependant, l'équipe du Dre. Bosco a démontré que la présence de mutants FUS dans les GS s'accompagne d'un désassemblage plus rapide et d'une labilité plus importante de TIA-1 et G3BP1, allant à l'inverse de cette théorie. Actuellement, aucune étude n'a pu démontrer la persistance d'inclusions qui seraient reliées à l'expression d'un mutant TDP-43 ou FUS après la fin de la réponse au stress.

Les inclusions pathologiques retrouvées chez les patients restent encore un mystère. La formation de ces inclusions serait déclenchée par la cellule afin d'éviter la présence de protéines non fonctionnelles dans la cellule qui perturberait ensuite le bon fonctionnement cellulaire. Bien que d'après nos données ces inclusions ne dérivent pas d'une absence de désassemblage des GS, nous pensons que ces inclusions sont le fait d'une réponse cellulaire au stress inadaptée couplée à un défaut d'élimination/recyclage des protéines « non-fonctionnelles ». La présence de protéines comme TDP-43, FUS ou des marqueurs de GS se

ferait de manière non spécifique via leurs domaines non-structurés. Cependant ce recrutement se ferait au niveau de « primo-agrégats » dont la nature et la composition reste à définir.

5.3. Stress chronique et formation d'inclusions positives pour TDP-43

A ce jour, une seule équipe a réussi à provoquer la formation d'inclusions « stables » contenant TDP-43. Les conditions expérimentales utilisées sont très différentes de celles généralement retrouvées dans les études reliant TDP-43 et les GS. Premièrement, les auteurs se basent sur une hypothèse ni de perte ni de gain de fonction. Les cellules utilisées sont uniquement stressées avec 1 mM de Paraquat pendant 24 heures. Ce stress est de faible intensité mais sur une période assez longue (stress chronique) ce qui très différents des autres modèles utilisés, où le stress est très aigu sur de courtes périodes de temps. Ce modèle permet de récapituler certains aspects de la pathologie comme la déplétion nucléaire de TDP-43 et l'accumulation dans des agrégats cytoplasmiques. Les auteurs argumentent que ces inclusions sont effectivement des GS car elles co-localisent éventuellement avec HuR et TIAR, deux marqueurs communément utilisés pour suivre ces inclusions [274, 275]. Le traitement au Paraquat entraîne la formation de deux types d'inclusions ; certaines positives pour TDP-43 et d'autres pour HuR. Les deux types d'inclusions n'ont pas les mêmes propriétés de désassemblage. Les inclusions positives pour HuR vont se désassembler une fois que les cellules ne sont plus exposées au Paraquat ou encore lorsque du Cycloheximide est ajouté dans le milieu [274]. A l'inverse, ces deux traitements n'ont qu'un effet mineur sur les inclusions positives pour TDP-43 indiquant que ces dernières inclusions ne seraient pas des GS selon a définition initiale [7, 274].

Bien que le stress chronique au Paraquat induise la formation d'inclusions positives pour TDP-43, nous ne pouvons pas être sûrs qu'il s'agisse vraiment de GS. Ce modèle d'étude est, toutefois, très intéressant car il récapitule de nombreux aspects moléculaires de la pathologie. Cependant, les auteurs ne démontrent pas si la formation de ces inclusions ou l'inhibition de leur apparition a une quelconque influence sur la mortalité cellulaire en réponse au stress.

5.4. Définition de Granule de Stress / agrégat non-spécifique

La première définition des GS présente dans la littérature les définit comme (1) des « *foci* » cytoplasmiques, (2) contenant des ARN polyadénylés, (3) des petites sous-unités ribosomales, (4) les facteurs d'initiation de la traduction eIF3, eIF4E, eIF4G et (5) les protéines liant l'ARN TIA-1, HuR, PABP, TTP, (6) formés à la suite de la phosphorylation de eIF2 α , (7) formant de nombreuses inclusions qui fusionnent au cours du temps et se désassemblent une fois le stress résolu, (8) dont la formation est inhibée par le traitement au Cycloheximide [7].

Or, à l'heure actuelle, de nombreuses équipes décrivent pour la première fois le recrutement d'une protéine au niveau des GS par sa co-localisation avec un ou deux marqueurs des GS, précédemment identifiés dans la littérature. En raison de la définition initiale des GS, la présence de protéines « marqueur » des GS, n'est pas suffisante pour définir une inclusion comme un GS. En effet une grande partie de ces protéines est composée d'un domaine non structuré [70] qui peut amener la protéine à s'agréger de manière non spécifique et former des agrégats [276]. TDP-43 interagit avec de nombreuses protéines contenues dans les granules de stress [144], savoir si son recrutement au niveau des inclusions pathologiques

est une cause ou une conséquence de leur formation est une question encore très ouverte. De plus, savoir si la formation de ces inclusions à une fonction protectrice ou toxique n'est pas encore définie.

Conclusion et perspectives

La SLA est une maladie neurodégénérative particulièrement agressive provoquant une paralysie progressive des patients et non curable à ce jour. L'exposition à des stress environnementaux serait un facteur de risque dans la survenue de la maladie [132]. De plus de nombreuses protéines reliées à la pathologie sont recrutées au niveau des GS. Parmi celles-ci les plus communes dans la SLA ; TDP-43 et FUS. Alors que plusieurs groupes se sont penchés sur l'étude du gain de fonction toxique de TDP-43 et FUS dans le contexte des GS, nous avons basé l'ensemble de nos études sur la perte de fonction de ces protéines via l'utilisation d'ARNi.

Nous avons démontré que l'ensemble de ces phénotypes induits par la déplétion de TDP-43, le sont aussi suite à celle de G3BP1, la cible en aval de TDP-43. Qu'il s'agisse de l'agrégation secondaire, du docking, ou de la protection/préservation des ARNm polyadénylés, l'expression de G3BP1 dans les cellules déplétées en TDP-43 induit une restauration complète du phénotype. L'impact de TDP-43 sur les GS et son rôle dans la survie cellulaire après exposition au stress se ferait ainsi via sa cible en aval, G3BP1. Nous pensons, d'une part, que G3BP1 permet la fusion des petits GS en de plus grosses inclusions. D'autre part, qu'elle serait une plateforme stabilisatrice pour l'interaction entre les GS et les PB afin de permettre les échanges d'ARNm en vue de leur protection. De plus, nous avons confirmé que l'axe TDP-43/G3BP1 est conservé chez l'organisme modèle *C. elegans*. En effet, l'absence de *tdp-1* régule négativement l'expression de *gtbp-1*. De surcroit l'utilisation d'ARNi contre leur homologue respectif *tdp-1* et *gtbp-1* induit une diminution significative de la survie suite à

l'exposition à un stress oxydatif. A l'inverse la déplétion de FUS n'altère pas la réponse au stress en cellule de mammifère.

Ainsi, nous proposons que TDP-43 induit un défaut de réponse au stress aboutissant à une augmentation de la mortalité cellulaire via une perte de fonction, alors que FUS agit via un gain de fonction. Cette réponse au stress non efficace serait le point de départ de la vulnérabilisation cellulaire aboutissant à la pathologie.

Néanmoins cette étude laisse encore des questions en suspens. Maintenant que nous avons défini au moins l'une des fonctions des GS, il serait intéressant de connaître l'impact des mutations de TDP-43 et de FUS sur la fonction des GS. Premièrement il faudrait mettre au point des lignées cellulaires stables inductibles surexprimant un faible niveau des protéines mutantes afin d'éviter les artefacts dus à une trop forte expression. Par l'hétérogénéité des mutations, il serait précieux de pouvoir comparer les lignées mères, avec celles exprimant les protéines sauvages et des mutants de chacune des protéines. Ces mutants seraient choisis en fonction de leur impact sur la fonction de la protéine (localisation dans le signal d'import cytoplasmique, dans un domaine de liaison à l'ARNm, troncation...). Il faudrait essayer de trouver une corrélation entre les mutations affectant la fonction des GS avec une mortalité accrue 24 à 48 heures après exposition au stress. Ensuite, et afin de déterminer si les inclusions sont le résultat d'un défaut de désassemblage des GS ou si elles se forment de manière indépendante, il pourrait être judicieux de transfecter des neurones ou des cellules gliales primaires avec les mutants sélectionnés. Par la suite, suivre ces cellules en microscopie « live » nous permettrait de savoir si les inclusions pathologiques pour TDP-43 ou FUS se forment suite à la réponse au stress et si elles seraient en lien avec la mortalité cellulaire. Ce

projet nous permettrait d'apporter les réponses clés qui sont actuellement en suspens dans le domaine.

Deuxièmement, nous avons mis en évidence le rôle fondamental que joue G3BP1 dans la formation et la fonction des GS. Ainsi il pourrait être intéressant de déterminer comment TDP-43 régule l'expression de G3BP1 et identifier les mutations de TDP-43 ou de FUS qui pourraient avoir le même effet. De plus ayant des collaborations avec deux laboratoires ayant accès à des échantillons de patients, notre équipe pourrait étudier si l'expression de G3BP1 est affectée chez les patients permettant ainsi de relier le défaut de réponse au stress au déclenchement de la pathologie.

Cette étude, ainsi que les perspectives de travail qui en découlent, se placent dans un contexte très actuel. Ce domaine est très jeune et dynamique et des questions fondamentales restent encore en suspens. Après avoir identifié la fonction des GS affectée par la déplétion de TDP-43, replacer cette découverte dans un contexte pathologique nous permettrait peut-être de comprendre (un des) les mécanismes aboutissant à la vulnérabilisation des neurones moteurs dans la SLA.

Bibliographie

1. Kultz, D., *Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response*. Annu Rev Physiol, 2005. **67**: p. 225-57.
2. Fulda, S., et al., *Cellular stress responses: cell survival and cell death*. Int J Cell Biol, 2010. **2010**: p. 214074.
3. Ritossa, F., *Discovery of the heat shock response*. Cell Stress Chaperones, 1996. **1**(2): p. 97-8.
4. Ritossa, F., *A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila*. Experiencia, 1962. **18**: p. 571-573.
5. Tissieres, A., H.K. Mitchell, and U.M. Tracy, *Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs*. J Mol Biol, 1974. **84**(3): p. 389-98.
6. Nover, L., K.D. Scharf, and D. Neumann, *Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves*. Mol Cell Biol, 1983. **3**(9): p. 1648-55.
7. Kedersha, N.L., et al., *RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules*. J Cell Biol, 1999. **147**(7): p. 1431-42.
8. Dewey, C.M., et al., *TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(5): p. 1098-108.
9. Goulet, I., et al., *TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(19): p. 3055-74.
10. Stohr, N., et al., *ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress*. J Cell Biol, 2006. **175**(4): p. 527-34.
11. McDonald, K.K., et al., *TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(7): p. 1400-10.
12. Kimball, S.R., et al., *Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(2): p. C273-84.
13. Goodier, J.L., et al., *LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(18): p. 6469-83.
14. Emará, M.M. and M.A. Brinton, *Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 9041-6.
15. Raaben, M., et al., *Mouse hepatitis coronavirus replication induces host translational shutoff and mRNA decay, with concomitant formation of stress granules and processing bodies*. Cell Microbiol, 2007. **9**(9): p. 2218-29.
16. Mazroui, R., et al., *Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(7): p. 2603-18.
17. Colombrita, C., et al., *TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult*. J Neurochem, 2009. **111**(4): p. 1051-61.
18. Fournier, M.J., C. Gareau, and R. Mazroui, *The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules*. Cancer Cell Int, 2010. **10**: p. 12.
19. Stoecklin, G., et al., *MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay*. EMBO J, 2004. **23**(6): p. 1313-24.
20. Chalupnikova, K., et al., *Recruitment of the RNA helicase RHAU to stress granules via a unique RNA-binding domain*. J Biol Chem, 2008. **283**(50): p. 35186-98.
21. Dang, Y., et al., *Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32870-8.
22. Mazroui, R., et al., *Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(10): p. 4212-9.
23. Pothof, J., et al., *MicroRNA responses and stress granule formation modulate the DNA damage response*. Cell Cycle, 2009. **8**(21): p. 3462-8.

24. Kwon, S., Y. Zhang, and P. Matthias, *The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response*. Genes Dev, 2007. **21**(24): p. 3381-94.
25. Bravard, A., et al., *Inactivation by oxidation and recruitment into stress granules of hOGG1 but not APE1 in human cells exposed to sub-lethal concentrations of cadmium*. Mutat Res, 2010. **685**(1-2): p. 61-9.
26. Leung, J.H., et al., *Fluid structure interaction of patient specific abdominal aortic aneurysms: a comparison with solid stress models*. Biomed Eng Online, 2006. **5**: p. 33.
27. Bentmann, E., et al., *Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)*. J Biol Chem, 2012. **287**(27): p. 23079-94.
28. Ohn, T., et al., *A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(10): p. 1224-31.
29. Bosco, D.A., et al., *Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(21): p. 4160-75.
30. Kedersha, N. and P. Anderson, *Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(Pt 6): p. 963-9.
31. Kedersha, N., et al., *Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules*. J Cell Biol, 2000. **151**(6): p. 1257-68.
32. Nover, L., K.D. Scharf, and D. Neumann, *Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(3): p. 1298-308.
33. Kedersha, N., et al., *Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling*. J Cell Biol, 2005. **169**(6): p. 871-84.
34. Kedersha, N., et al., *Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(1): p. 195-210.
35. Li, C.H., et al., *eIF5A promotes translation elongation, polysome disassembly and stress granule assembly*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e9942.
36. Farny, N.G., N.L. Kedersha, and P.A. Silver, *Metazoan stress granule assembly is mediated by P-eIF2alpha-dependent and -independent mechanisms*. RNA, 2009. **15**(10): p. 1814-21.
37. Tourriere, H., et al., *The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules*. J Cell Biol, 2003. **160**(6): p. 823-31.
38. Gilks, N., et al., *Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(12): p. 5383-98.
39. Reineke, L.C., et al., *Large G3BP-induced granules trigger eIF2alpha phosphorylation*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(18): p. 3499-510.
40. Parker, F., et al., *A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(6): p. 2561-9.
41. Martin, S., et al., *Deficiency of G3BP1, the stress granules assembly factor, results in abnormal synaptic plasticity and calcium homeostasis in neurons*. J Neurochem, 2013.
42. Tourriere, H., et al., *RasGAP-associated endoribonuclease G3Bp: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(22): p. 7747-60.
43. Gallouzi, I.E., et al., *A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 3956-65.
44. Piotrowska, J., et al., *Stable formation of compositionally unique stress granules in virus-infected cells*. J Virol, 2010. **84**(7): p. 3654-65.
45. White, J.P., et al., *Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(5): p. 295-305.
46. Jedrusik-Bode, M., et al., *The sirtuin SIRT6 regulates stress granule formation in C. elegans and mammals*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 22): p. 5166-77.
47. Zekri, L., et al., *Control of fetal growth and neonatal survival by the RasGAP-associated endoribonuclease G3BP*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(19): p. 8703-16.
48. Matsuki, H., et al., *Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation*. Genes Cells, 2013. **18**(2): p. 135-46.

49. Kobayashi, T., et al., *PKCalpha binds G3BP2 and regulates stress granule formation following cellular stress*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35820.
50. Ohn, T. and P. Anderson, *The role of posttranslational modifications in the assembly of stress granules*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2010. **1**(3): p. 486-93.
51. Anderson, P. and N. Kedersha, *Stress granules*. Curr Biol, 2009. **19**(10): p. R397-8.
52. Yoon, J.H., et al., *Tyrosine phosphorylation of HuR by JAK3 triggers dissociation and degradation of HuR target mRNAs*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(2): p. 1196-208.
53. Tsai, N.P., P.C. Ho, and L.N. Wei, *Regulation of stress granule dynamics by Grb7 and FAK signalling pathway*. EMBO J, 2008. **27**(5): p. 715-26.
54. De Leeuw, F., et al., *The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor*. Exp Cell Res, 2007. **313**(20): p. 4130-44.
55. Dolzhanskaya, N., et al., *Methylation regulates the intracellular protein-protein and protein-RNA interactions of FMRP*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 9): p. 1933-46.
56. Xie, W. and R.B. Denman, *Protein methylation and stress granules: posttranslational remodeler or innocent bystander?* Mol Biol Int, 2011. **2011**: p. 137459.
57. Jongjitwimol, J., et al., *The S. pombe Translation Initiation Factor eIF4G Is Sumoylated and Associates with the SUMO Protease Ulp2*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e94182.
58. Singleton, R.S., et al., *OGFOD1 catalyzes prolyl hydroxylation of RPS23 and is involved in translation control and stress granule formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(11): p. 4031-6.
59. Wehner, K.A., S. Schutz, and P. Sarnow, *OGFOD1, a novel modulator of eukaryotic translation initiation factor 2alpha phosphorylation and the cellular response to stress*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(8): p. 2006-16.
60. Carpio, M.A., et al., *The arginylation-dependent association of calreticulin with stress granules is regulated by calcium*. Biochem J, 2010. **429**(1): p. 63-72.
61. Eisinger-Mathason, T.S., et al., *Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival*. Mol Cell, 2008. **31**(5): p. 722-36.
62. Thedieck, K., et al., *Inhibition of mTORC1 by astrin and stress granules prevents apoptosis in cancer cells*. Cell, 2013. **154**(4): p. 859-74.
63. Arimoto, K., et al., *Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(11): p. 1324-32.
64. Takahashi, M., et al., *Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(4): p. 815-29.
65. Bevilacqua, E., et al., *eIF2alpha phosphorylation tips the balance to apoptosis during osmotic stress*. J Biol Chem, 2010. **285**(22): p. 17098-111.
66. Mangiardi, D.A., et al., *Progression of hair cell ejection and molecular markers of apoptosis in the avian cochlea following gentamicin treatment*. J Comp Neurol, 2004. **475**(1): p. 1-18.
67. Sun, Y., et al., *A genome-wide RNAi screen identifies genes regulating the formation of P bodies in C. elegans and their functions in NMD and RNAi*. Protein Cell, 2011. **2**(11): p. 918-39.
68. Mokas, S., et al., *Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(11): p. 2673-83.
69. Anderson, P. and N. Kedersha, *Stressful initiations*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 16): p. 3227-34.
70. Li, Y.R., et al., *Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis*. J Cell Biol, 2013. **201**(3): p. 361-72.
71. Han, T.W., et al., *Cell-free formation of RNA granules: bound RNAs identify features and components of cellular assemblies*. Cell, 2012. **149**(4): p. 768-79.
72. Kato, M., et al., *Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels*. Cell, 2012. **149**(4): p. 753-67.
73. Bartoli, K.M., D.L. Bishop, and W.S. Saunders, *The role of molecular microtubule motors and the microtubule cytoskeleton in stress granule dynamics*. Int J Cell Biol, 2011. **2011**: p. 939848.
74. Wolozin, B., *Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration*. Mol Neurodegener, 2012. **7**: p. 56.
75. Carpio, M.A., et al., *Calreticulin-dimerization induced by post-translational arginylation is critical for stress granules scaffolding*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(7): p. 1223-35.

76. Tanaka, T., S. Ohashi, and S. Kobayashi, *Roles of YB-1 under arsenite-induced stress: translational activation of HSP70 mRNA and control of the number of stress granules*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1840**(3): p. 985-92.
77. Seguin, S.J., et al., *Inhibition of autophagy, lysosome and VCP function impairs stress granule assembly*. *Cell Death Differ*, 2014.
78. Buchan, J.R., et al., *Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function*. *Cell*, 2013. **153**(7): p. 1461-74.
79. Thomas, M.G., et al., *RNA granules: the good, the bad and the ugly*. *Cell Signal*, 2011. **23**(2): p. 324-34.
80. Jain, S. and R. Parker, *The discovery and analysis of P Bodies*. *Adv Exp Med Biol*, 2013. **768**: p. 23-43.
81. Bashkirov, V.I., et al., *A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates*. *J Cell Biol*, 1997. **136**(4): p. 761-73.
82. Ingelfinger, D., et al., *The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci*. *RNA*, 2002. **8**(12): p. 1489-501.
83. van Dijk, E., et al., *Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures*. *EMBO J*, 2002. **21**(24): p. 6915-24.
84. Sheth, U. and R. Parker, *Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies*. *Science*, 2003. **300**(5620): p. 805-8.
85. Long, R.M. and M.T. McNally, *mRNA decay: x (XRN1) marks the spot*. *Mol Cell*, 2003. **11**(5): p. 1126-8.
86. Parker, R. and U. Sheth, *P bodies and the control of mRNA translation and degradation*. *Mol Cell*, 2007. **25**(5): p. 635-46.
87. Kulkarni, M., S. Ozgur, and G. Stoecklin, *On track with P-bodies*. *Biochem Soc Trans*, 2010. **38**(Pt 1): p. 242-51.
88. Lavut, A. and D. Raveh, *Sequestration of highly expressed mRNAs in cytoplasmic granules, P-bodies, and stress granules enhances cell viability*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(2): p. e1002527.
89. Yao, B., S. Li, and E.K. Chan, *Function of GW182 and GW bodies in siRNA and miRNA pathways*. *Adv Exp Med Biol*, 2013. **768**: p. 71-96.
90. Sen, G.L. and H.M. Blau, *Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(6): p. 633-6.
91. Liu, J., et al., *MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(7): p. 719-23.
92. Fritzler, M.J. and E.K. Chan, *The discovery of GW bodies*. *Adv Exp Med Biol*, 2013. **768**: p. 5-21.
93. Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, and E. Izaurralde, *P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(1): p. 9-22.
94. Teixeira, D., et al., *Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs*. *RNA*, 2005. **11**(4): p. 371-82.
95. Brengues, M., D. Teixeira, and R. Parker, *Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies*. *Science*, 2005. **310**(5747): p. 486-9.
96. Wickens, M. and A. Goldstrohm, *Molecular biology. A place to die, a place to sleep*. *Science*, 2003. **300**(5620): p. 753-5.
97. Perez-Ortin, J.E., et al., *Eukaryotic mRNA decay: methodologies, pathways, and links to other stages of gene expression*. *J Mol Biol*, 2013. **425**(20): p. 3750-75.
98. Chen, C.Y. and A.B. Shyu, *Deadenylation and P-bodies*. *Adv Exp Med Biol*, 2013. **768**: p. 183-95.
99. Leung, A.K., J.M. Calabrese, and P.A. Sharp, *Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(48): p. 18125-30.
100. Wasserman, T., et al., *A novel c-Jun N-terminal kinase (JNK)-binding protein WDR62 is recruited to stress granules and mediates a nonclassical JNK activation*. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(1): p. 117-30.
101. Buchan, J.R. and R. Parker, *Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation*. *Mol Cell*, 2009. **36**(6): p. 932-41.
102. Balagopal, V. and R. Parker, *Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(3): p. 403-8.

103. von Roretz, C., et al., *Turnover of AU-rich-containing mRNAs during stress: a matter of survival*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011. **2**(3): p. 336-47.
104. Strong, M.J., *The evidence for altered RNA metabolism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)*. J Neurol Sci, 2010. **288**(1-2): p. 1-12.
105. Nadezhkina, E.S., et al., *Microtubules govern stress granule mobility and dynamics*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(3): p. 361-71.
106. Hamada, T., et al., *RNA processing bodies, peroxisomes, Golgi bodies, mitochondria, and endoplasmic reticulum tubule junctions frequently pause at cortical microtubules*. Plant Cell Physiol, 2012. **53**(4): p. 699-708.
107. Ivanov, P.A., E.M. Chudinova, and E.S. Nadezhkina, *Disruption of microtubules inhibits cytoplasmic ribonucleoprotein stress granule formation*. Exp Cell Res, 2003. **290**(2): p. 227-33.
108. Loschi, M., et al., *Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 21): p. 3973-82.
109. Sweet, T.J., et al., *Microtubule disruption stimulates P-body formation*. RNA, 2007. **13**(4): p. 493-502.
110. Reineke, L.C. and R.E. Lloyd, *Diversification of stress granules and P-bodies during viral infection*. Virology, 2013. **436**(2): p. 255-67.
111. Khapersky, D.A., T.F. Hachette, and C. McCormick, *Influenza A virus inhibits cytoplasmic stress granule formation*. FASEB J, 2012. **26**(4): p. 1629-39.
112. Dougherty, J.D., J.P. White, and R.E. Lloyd, *Poliovirus-mediated disruption of cytoplasmic processing bodies*. J Virol, 2011. **85**(1): p. 64-75.
113. Ward, A.M., et al., *Quantitative mass spectrometry of DENV-2 RNA-interacting proteins reveals that the DEAD-box RNA helicase DDX6 binds the DB1 and DB2 3' UTR structures*. RNA Biol, 2011. **8**(6): p. 1173-86.
114. Szostak, E. and F. Gebauer, *Translational control by 3'-UTR-binding proteins*. Brief Funct Genomics, 2013. **12**(1): p. 58-65.
115. Misquitta, C.M., et al., *The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology*. Mol Cell Biochem, 2001. **224**(1-2): p. 53-67.
116. Simpson-Holley, M., et al., *Formation of antiviral cytoplasmic granules during orthopoxvirus infection*. J Virol, 2011. **85**(4): p. 1581-93.
117. Takahara, T. and T. Maeda, *Transient sequestration of TORC1 into stress granules during heat stress*. Mol Cell, 2012. **47**(2): p. 242-52.
118. Kim, W.J., et al., *Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(6): p. 2450-62.
119. Selenius, M., et al., *Selenium and the selenoprotein thioredoxin reductase in the prevention, treatment and diagnostics of cancer*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(7): p. 867-80.
120. Fujimura, K., A.T. Sasaki, and P. Anderson, *Selenite targets eIF4E-binding protein-1 to inhibit translation initiation and induce the assembly of non-canonical stress granules*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(16): p. 8099-110.
121. Waelter, S., et al., *Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(5): p. 1393-407.
122. Vanderweyde, T., et al., *Contrasting pathology of the stress granule proteins TIA-1 and G3BP in tauopathies*. J Neurosci, 2012. **32**(24): p. 8270-83.
123. Arai, T., et al., *TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(3): p. 602-11.
124. Liu-Yesucevitz, L., et al., *Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13250.
125. Bentmann, E., C. Haass, and D. Dormann, *Stress granules in neurodegeneration--lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma*. FEBS J, 2013. **280**(18): p. 4348-70.
126. Mulligan, V.K. and A. Chakrabarty, *Protein misfolding in the late-onset neurodegenerative diseases: common themes and the unique case of amyotrophic lateral sclerosis*. Proteins, 2013. **81**(8): p. 1285-303.

127. Dunkel, P., et al., *Clinical utility of neuroprotective agents in neurodegenerative diseases: current status of drug development for Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases, and amyotrophic lateral sclerosis*. Expert Opin Investig Drugs, 2012. **21**(9): p. 1267-308.
128. ALS-CANADA. Available from: <http://www.als.ca/>.
129. FRANCE-SLA.
130. Les-papillons-de-Charcot. Available from: <http://www.lespapillonsdecharcot.com/>.
131. Lomen-Hoerth, C., *Amyotrophic lateral sclerosis from bench to bedside*. Semin Neurol, 2008. **28**(2): p. 205-11.
132. D'Amico, E., et al., *Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 509-27.
133. Boillee, S., C. Vande Velde, and D.W. Cleveland, *ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 39-59.
134. Lochouarn, M., *Enquête sur la maladie de Charcot*. Le Figaro Santé, 2010.
135. (ARSLA), A.p.l.R.s.l.S.L.A.e.l.a.M.d.m.
136. Alzheimer, A.F. *Les démence fronto-temporale (DFT), maladies apparentées à la maladie d'Alzheimer*. 2011.
137. Oda, M., et al., *A sporadic juvenile case of the amyotrophic lateral sclerosis with neuronal intracytoplasmic inclusions*. Acta Neuropathol, 1978. **44**(3): p. 211-6.
138. Ling, S.C., M. Polymenidou, and D.W. Cleveland, *Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis*. Neuron, 2013. **79**(3): p. 416-38.
139. Ou, S.H., et al., *Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs*. J Virol, 1995. **69**(6): p. 3584-96.
140. Neumann, M., et al., *Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis*. Science, 2006. **314**(5796): p. 130-3.
141. Sreedharan, J., et al., *TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. Science, 2008. **319**(5870): p. 1668-72.
142. Kabashi, E., et al., *TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 572-4.
143. Da Cruz, S. and D.W. Cleveland, *Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond*. Curr Opin Neurobiol, 2011. **21**(6): p. 904-19.
144. Freibaum, B.D., et al., *Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery*. J Proteome Res, 2010. **9**(2): p. 1104-20.
145. Panagopoulos, I., et al., *Fusion of the FUS gene with ERG in acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22)*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. **11**(4): p. 256-62.
146. Kanazawa, T., et al., *TLS/FUS-ERG fusion gene in acute lymphoblastic leukemia with t(16;21)(p11;q22) and monitoring of minimal residual disease*. Leuk Lymphoma, 2005. **46**(12): p. 1833-5.
147. Rabbitts, T.H., et al., *Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma*. Nat Genet, 1993. **4**(2): p. 175-80.
148. Crozat, A., et al., *Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma*. Nature, 1993. **363**(6430): p. 640-4.
149. Mills, K.I., et al., *High FUS/TLS expression in acute myeloid leukaemia samples*. Br J Haematol, 2000. **108**(2): p. 316-21.
150. Kwiatkowski, T.J., Jr., et al., *Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis*. Science, 2009. **323**(5918): p. 1205-8.
151. Vance, C., et al., *Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6*. Science, 2009. **323**(5918): p. 1208-11.
152. Xu, Y.F., et al., *Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice*. J Neurosci, 2010. **30**(32): p. 10851-9.
153. Węgorzewska, I., et al., *TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(44): p. 18809-14.

154. Swarup, V., et al., *Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments*. *Brain*, 2011. **134**(Pt 9): p. 2610-26.
155. Herdewyn, S., et al., *Prevention of intestinal obstruction reveals progressive neurodegeneration in mutant TDP-43 (A315T) mice*. *Mol Neurodegener*, 2014. **9**(1): p. 24.
156. Estes, P.S., et al., *Wild-type and A315T mutant TDP-43 exert differential neurotoxicity in a Drosophila model of ALS*. *Hum Mol Genet*, 2011. **20**(12): p. 2308-21.
157. Hanson, K.A., et al., *Ubiquilin modifies TDP-43 toxicity in a Drosophila model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(15): p. 11068-72.
158. Vaccaro, A., et al., *Mutant TDP-43 and FUS cause age-dependent paralysis and neurodegeneration in C. elegans*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e31321.
159. Liachko, N.F., C.R. Guthrie, and B.C. Kraemer, *Phosphorylation promotes neurotoxicity in a Caenorhabditis elegans model of TDP-43 proteinopathy*. *J Neurosci*, 2010. **30**(48): p. 16208-19.
160. Sephton, C.F., et al., *TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(9): p. 6826-34.
161. Wu, L.S., et al., *TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis*. *Genesis*, 2010. **48**(1): p. 56-62.
162. Kraemer, B.C., et al., *Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis*. *Acta Neuropathol*, 2010. **119**(4): p. 409-19.
163. Wu, L.S., W.C. Cheng, and C.K. Shen, *Targeted depletion of TDP-43 expression in the spinal cord motor neurons leads to the development of amyotrophic lateral sclerosis-like phenotypes in mice*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(33): p. 27335-44.
164. Iguchi, Y., et al., *Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration*. *Brain*, 2013. **136**(Pt 5): p. 1371-82.
165. Feiguin, F., et al., *Depletion of TDP-43 affects Drosophila motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(10): p. 1586-92.
166. Lu, Y., J. Ferris, and F.B. Gao, *Frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis-associated disease protein TDP-43 promotes dendritic branching*. *Mol Brain*, 2009. **2**: p. 30.
167. Zhang, T., et al., *Caenorhabditis elegans RNA-processing protein TDP-1 regulates protein homeostasis and life span*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(11): p. 8371-82.
168. Vaccaro, A., et al., *TDP-1/TDP-43 regulates stress signaling and age-dependent proteotoxicity in Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(7): p. e1002806.
169. Qiu, H., et al., *ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(3): p. 981-99.
170. Shelkownikova, T.A., et al., *Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(35): p. 25266-74.
171. Lanson, N.A., Jr., et al., *A Drosophila model of FUS-related neurodegeneration reveals genetic interaction between FUS and TDP-43*. *Hum Mol Genet*, 2011. **20**(13): p. 2510-23.
172. Xia, R., et al., *Motor neuron apoptosis and neuromuscular junction perturbation are prominent features in a Drosophila model of Fus-mediated ALS*. *Mol Neurodegener*, 2012. **7**: p. 10.
173. Hicks, G.G., et al., *Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death*. *Nat Genet*, 2000. **24**(2): p. 175-9.
174. Kuroda, M., et al., *Male sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS(-/-) mice*. *EMBO J*, 2000. **19**(3): p. 453-62.
175. Sasayama, H., et al., *Knockdown of the Drosophila fused in sarcoma (FUS) homologue causes deficient locomotive behavior and shortening of motoneuron terminal branches*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e39483.
176. Vaccaro, A.T., A.; Parker, J.A., *Development of C. elegans models for Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2011.
177. Therrien, M. and J.A. Parker, *Worming forward: amyotrophic lateral sclerosis toxicity mechanisms and genetic interactions in Caenorhabditis elegans*. *Front Genet*, 2014. **5**: p. 85.

178. Chiang, P.M., et al., *Deletion of TDP-43 down-regulates Tbc1d1, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(37): p. 16320-4.
179. Ayala, Y.M., et al., *Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43.* J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 22): p. 3778-85.
180. Buratti, E. and F.E. Baralle, *Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9.* J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36337-43.
181. Winton, M.J., et al., *Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation.* J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 13302-9.
182. Lagier-Tourenne, C. and D.W. Cleveland, *Rethinking ALS: the FUS about TDP-43.* Cell, 2009. **136**(6): p. 1001-4.
183. Iko, Y., et al., *Domain architectures and characterization of an RNA-binding protein, TLS.* J Biol Chem, 2004. **279**(43): p. 44834-40.
184. Liu, X., et al., *The RRM domain of human fused in sarcoma protein reveals a non-canonical nucleic acid binding site.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(2): p. 375-85.
185. Kino, Y., et al., *Intracellular localization and splicing regulation of FUS/TLS are variably affected by amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations.* Nucleic Acids Res, 2011. **39**(7): p. 2781-98.
186. Zinszner, H., et al., *TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling.* J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 15)**: p. 1741-50.
187. Belzil, V.V., et al., *Mutations in FUS cause FALS and SALS in French and French Canadian populations.* Neurology, 2009. **73**(15): p. 1176-9.
188. Daigle, J.G., et al., *RNA-binding ability of FUS regulates neurodegeneration, cytoplasmic mislocalization and incorporation into stress granules associated with FUS carrying ALS-linked mutations.* Hum Mol Genet, 2013. **22**(6): p. 1193-205.
189. Ito, D., et al., *Nuclear transport impairment of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations in FUS/TLS.* Ann Neurol, 2011. **69**(1): p. 152-62.
190. Gal, J., et al., *Nuclear localization sequence of FUS and induction of stress granules by ALS mutants.* Neurobiol Aging, 2011. **32**(12): p. 2323 e27-40.
191. Dreyfuss, G., *Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles.* Annu Rev Cell Biol, 1986. **2**: p. 459-98.
192. Dreyfuss, G., et al., *hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA.* Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 289-321.
193. Takahama, K., et al., *Identification of DNA binding specificity for TLS.* Nucleic Acids Symp Ser (Oxf), 2009(53): p. 247-8.
194. Lagier-Tourenne, C., M. Polymenidou, and D.W. Cleveland, *TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(R1): p. R46-64.
195. Honda, D., et al., *The ALS/FTLD-related RNA-binding proteins TDP-43 and FUS have common downstream RNA targets in cortical neurons.* FEBS Open Bio, 2013. **4**: p. 1-10.
196. Ayala, Y.M., et al., *TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop.* EMBO J, 2011. **30**(2): p. 277-88.
197. Bembich, S., et al., *Predominance of spliceosomal complex formation over polyadenylation site selection in TDP-43 autoregulation.* Nucleic Acids Res, 2013.
198. Polymenidou, M., et al., *Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43.* Nat Neurosci, 2011. **14**(4): p. 459-68.
199. Zhou, Y., et al., *ALS-associated FUS mutations result in compromised FUS alternative splicing and autoregulation.* PLoS Genet, 2013. **9**(10): p. e1003895.
200. Kuo, P.H., et al., *Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions.* Nucleic Acids Res, 2009. **37**(6): p. 1799-808.
201. Takahama, K., et al., *Regulation of telomere length by G-quadruplex telomere DNA- and TERRA-binding protein TLS/FUS.* Chem Biol, 2013. **20**(3): p. 341-50.

202. Baechtold, H., et al., *Human 75-kDa DNA-pairing protein is identical to the pro-oncoprotein TLS/FUS and is able to promote D-loop formation.* J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 34337-42.
203. Prasad, D.D., et al., *TLS/FUS fusion domain of TLS/FUS-erg chimeric protein resulting from the t(16;21) chromosomal translocation in human myeloid leukemia functions as a transcriptional activation domain.* Oncogene, 1994. **9**(12): p. 3717-29.
204. Lerga, A., et al., *Identification of an RNA binding specificity for the potential splicing factor TLS.* J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6807-16.
205. Orozco, D., et al., *Loss of fused in sarcoma (FUS) promotes pathological Tau splicing.* EMBO Rep, 2012. **13**(8): p. 759-64.
206. Rogelj, B., et al., *Widespread binding of FUS along nascent RNA regulates alternative splicing in the brain.* Sci Rep, 2012. **2**: p. 603.
207. Sephton, C.F., et al., *Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes.* J Biol Chem, 2011. **286**(2): p. 1204-15.
208. Xiao, S., et al., *RNA targets of TDP-43 identified by UV-CLIP are deregulated in ALS.* Mol Cell Neurosci, 2011. **47**(3): p. 167-80.
209. Lagier-Tourenne, C., et al., *Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs.* Nat Neurosci, 2012. **15**(11): p. 1488-97.
210. Tollervey, J.R., et al., *Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43.* Nat Neurosci, 2011. **14**(4): p. 452-8.
211. Colombrita, C., et al., *TDP-43 and FUS RNA-binding proteins bind distinct sets of cytoplasmic messenger RNAs and differently regulate their post-transcriptional fate in motoneuron-like cells.* J Biol Chem, 2012. **287**(19): p. 15635-47.
212. Hoell, J.I., et al., *RNA targets of wild-type and mutant FET family proteins.* Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(12): p. 1428-31.
213. Ishigaki, S., et al., *Position-dependent FUS-RNA interactions regulate alternative splicing events and transcriptions.* Sci Rep, 2012. **2**: p. 529.
214. Ishigaki, S., et al., *ERRATUM: Position-dependent FUS-RNA interactions regulate alternative splicing events and transcriptions.* Sci Rep, 2013. **3**: p. 3301.
215. Nakaya, T., et al., *FUS regulates genes coding for RNA-binding proteins in neurons by binding to their highly conserved introns.* RNA, 2013. **19**(4): p. 498-509.
216. Black, D.L., *Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing.* Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 291-336.
217. Leff, S.E., M.G. Rosenfeld, and R.M. Evans, *Complex transcriptional units: diversity in gene expression by alternative RNA processing.* Annu Rev Biochem, 1986. **55**: p. 1091-117.
218. Chow, L.T., et al., *An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA.* Cell, 1977. **12**(1): p. 1-8.
219. Ayala, Y.M., et al., *Human, Drosophila, and C.elegans TDP43: nucleic acid binding properties and splicing regulatory function.* J Mol Biol, 2005. **348**(3): p. 575-88.
220. Zuccato, E., et al., *An intronic polypyrimidine-rich element downstream of the donor site modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 alternative splicing.* J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 16980-8.
221. Buratti, E., et al., *Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping.* EMBO J, 2001. **20**(7): p. 1774-84.
222. Prudencio, M., et al., *Misregulation of human sortilin splicing leads to the generation of a nonfunctional progranulin receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(52): p. 21510-5.
223. Shiga, A., et al., *Alteration of POLDIP3 splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS.* PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43120.
224. Fiesel, F.C., et al., *TDP-43 regulates global translational yield by splicing of exon junction complex component SKAR.* Nucleic Acids Res, 2012. **40**(6): p. 2668-82.
225. Passoni, M., et al., *UG repeats/TDP-43 interactions near 5' splice sites exert unpredictable effects on splicing modulation.* J Mol Biol, 2012. **415**(1): p. 46-60.

226. Hutton, M., et al., *Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17*. *Nature*, 1998. **393**(6686): p. 702-5.
227. Meissner, M., et al., *Proto-oncoprotein TLS/FUS is associated to the nuclear matrix and complexed with splicing factors PTB, SRm160, and SR proteins*. *Exp Cell Res*, 2003. **283**(2): p. 184-95.
228. Yang, L., et al., *Oncoprotein TLS interacts with serine-arginine proteins involved in RNA splicing*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(43): p. 27761-4.
229. Strong, M.J., et al., *TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein*. *Mol Cell Neurosci*, 2007. **35**(2): p. 320-7.
230. Liu, X., et al., *Long non-coding RNA gadd7 interacts with TDP-43 and regulates Cdk6 mRNA decay*. *EMBO J*, 2012. **31**(23): p. 4415-27.
231. Tan, A.Y. and J.L. Manley, *TLS inhibits RNA polymerase III transcription*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(1): p. 186-96.
232. Schwartz, J.C., et al., *FUS binds the CTD of RNA polymerase II and regulates its phosphorylation at Ser2*. *Genes Dev*, 2012. **26**(24): p. 2690-5.
233. Gascon, E. and F.B. Gao, *Cause or Effect: Misregulation of microRNA Pathways in Neurodegeneration*. *Front Neurosci*, 2012. **6**: p. 48.
234. Haramati, S., et al., *miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(29): p. 13111-6.
235. Buratti, E., et al., *Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels*. *FEBS J*, 2010. **277**(10): p. 2268-81.
236. Di Carlo, V., et al., *TDP-43 regulates the microprocessor complex activity during in vitro neuronal differentiation*. *Mol Neurobiol*, 2013. **48**(3): p. 952-63.
237. Kawahara, Y. and A. Mieda-Sato, *TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(9): p. 3347-52.
238. Morlando, M., et al., *FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment*. *EMBO J*, 2012. **31**(24): p. 4502-10.
239. Walker, A.K., et al., *ALS-associated TDP-43 induces endoplasmic reticulum stress, which drives cytoplasmic TDP-43 accumulation and stress granule formation*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e81170.
240. Andersson, M.K., et al., *The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response*. *BMC Cell Biol*, 2008. **9**: p. 37.
241. Baron, D.M., et al., *Amyotrophic lateral sclerosis-linked FUS/TLS alters stress granule assembly and dynamics*. *Mol Neurodegener*, 2013. **8**: p. 30.
242. Sama, R.R., et al., *FUS/TLS assembles into stress granules and is a prosurvival factor during hyperosmolar stress*. *J Cell Physiol*, 2013. **228**(11): p. 2222-31.
243. Abramzon, Y., et al., *Valosin-containing protein (VCP) mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. *Neurobiol Aging*, 2012. **33**(9): p. 2231 e1-2231 e6.
244. Piao, Y., et al., *Survival motor neuron (SMN) protein in the spinal anterior horn cells of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. *Brain Res*, 2011. **1372**: p. 152-9.
245. Hua, Y. and J. Zhou, *Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules*. *FEBS Lett*, 2004. **572**(1-3): p. 69-74.
246. Kim, H.J., et al., *Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS*. *Nature*, 2013. **495**(7442): p. 467-73.
247. Couthouis, J., et al., *A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(52): p. 20881-90.
248. Stoecklin, G. and N. Kedersha, *Relationship of GW/P-bodies with stress granules*. *Adv Exp Med Biol*, 2013. **768**: p. 197-211.
249. Anderson, P. and N. Kedersha, *Stress granules: the Tao of RNA triage*. *Trends Biochem Sci*, 2008. **33**(3): p. 141-50.
250. Aulas, A., S. Stabile, and C. Vande Velde, *Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP*. *Mol Neurodegener*, 2012. **7**: p. 54.

251. Coller, J. and R. Parker, *General translational repression by activators of mRNA decapping*. Cell, 2005. **122**(6): p. 875-86.
252. Cougot, N., S. Babajko, and B. Seraphin, *Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells*. J Cell Biol, 2004. **165**(1): p. 31-40.
253. Higashi, S., et al., *TDP-43 associates with stalled ribosomes and contributes to cell survival during cellular stress*. J Neurochem, 2013. **126**(2): p. 288-300.
254. Martin, S. and J. Tazi, *Visualization of G3BP stress granules dynamics in live primary cells*. J Vis Exp, 2014(87).
255. Sheth, U. and R. Parker, *Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies*. Cell, 2006. **125**(6): p. 1095-109.
256. Gkogkas, C.G., et al., *Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control*. Nature, 2013. **493**(7432): p. 371-7.
257. Igaz, L.M., et al., *Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 726-38.
258. Yu, Z., et al., *Neurodegeneration-associated TDP-43 interacts with fragile X mental retardation protein (FMRP)/Staufen (STAU1) and regulates SIRT1 expression in neuronal cells*. J Biol Chem, 2012. **287**(27): p. 22560-72.
259. Fiesel, F.C., et al., *Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6*. EMBO J, 2010. **29**(1): p. 209-21.
260. Gareau, C., et al., *p21(WAF1/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to bortezomib-mediated apoptosis*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20254.
261. Kim, S.H., et al., *Amyotrophic lateral sclerosis-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to co-regulate HDAC6 mRNA*. J Biol Chem, 2010. **285**(44): p. 34097-105.
262. Tauffenberger, A., et al., *Reduction of polyglutamine toxicity by TDP-43, FUS and progranulin in Huntington's disease models*. Hum Mol Genet, 2013. **22**(4): p. 782-94.
263. Blechingberg, J., et al., *Gene expression responses to FUS, EWS, and TAF15 reduction and stress granule sequestration analyses identifies FET-protein non-redundant functions*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e46251.
264. Fiesel, F.C. and P.J. Kahle, *TDP-43 and FUS/TLS: cellular functions and implications for neurodegeneration*. FEBS J, 2011. **278**(19): p. 3550-68.
265. Huch, S. and T. Nissan, *Interrelations between translation and general mRNA degradation in yeast*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2014.
266. Dori-Bachash, M., E. Shema, and I. Tirosh, *Coupled evolution of transcription and mRNA degradation*. PLoS Biol, 2011. **9**(7): p. e1001106.
267. Aizer, A. and Y. Shav-Tal, *Intracellular trafficking and dynamics of P bodies*. Prion, 2008. **2**(4): p. 131-4.
268. Aizer, A., et al., *The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(10): p. 4154-66.
269. Novarino, G., et al., *Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders*. Science, 2014. **343**(6170): p. 506-11.
270. Alami, N.H., et al., *Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations*. Neuron, 2014. **81**(3): p. 536-43.
271. Gal, J., et al., *HDAC6 regulates mutant SOD1 aggregation through two SMIR motifs and tubulin acetylation*. J Biol Chem, 2013. **288**(21): p. 15035-45.
272. Volkening, K., et al., *Tar DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43), 14-3-3 proteins and copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) interact to modulate NFL mRNA stability. Implications for altered RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)*. Brain Res, 2009. **1305**: p. 168-82.
273. Dormann, D., et al., *ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import*. EMBO J, 2010. **29**(16): p. 2841-57.
274. Parker, S.J., et al., *Endogenous TDP-43 localized to stress granules can subsequently form protein aggregates*. Neurochem Int, 2012. **60**(4): p. 415-24.
275. Meyerowitz, J., et al., *C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress*. Mol Neurodegener, 2011. **6**: p. 57.

276. Olszewska, M., J.J. Bujarski, and M. Kurpisz, *P-bodies and their functions during mRNA cell cycle: mini-review*. *Cell Biochem Funct*, 2012. **30**(3): p. 177-82.

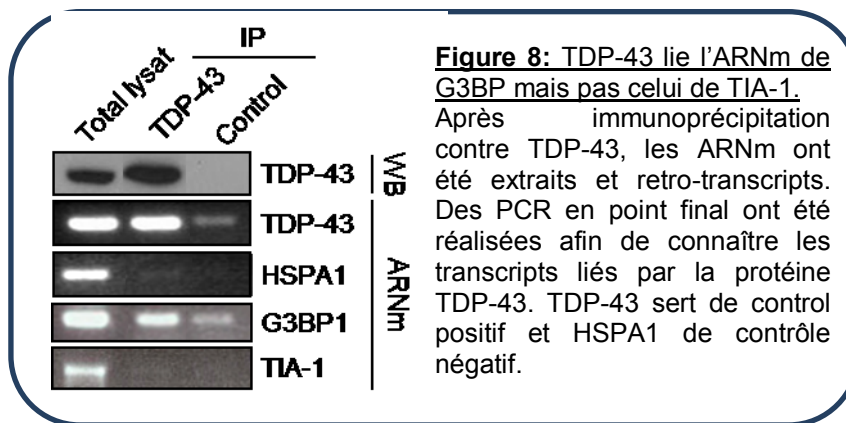
Annexe 1 : TDP-43 lie l'ARNm de G3BP1 mais pas celui de TIA-1.

Nous avons démontré dans une précédente publication, que TDP-43 possède une action régulatrice sur deux protéines majeures des GS ; TIA-1 et G3BP1 [11]. Alors que la déplétion de TDP-43 induit une augmentation d'expression de TIA-1 de 1.3 fois par rapport au control, l'expression de G3BP1

est diminuée de 79 %.

De ce fait nous suspectons que les mécanismes de régulation empruntés par TDP-43 diffèrent qu'il

s'agisse de TIA-1 ou de G3BP1.



TDP-43 est une protéine liant un tiers des ARNm du cerveau [138, 195]. Cette interaction peut aboutir à la stabilisation du transcrit comme dans le cadre de l'ARNm de hNF-L ou de CDK6 [229, 230]. De ce fait, nous avons effectué une immuno-précipitation de TDP-43 et extrait les ARNm qui se liaient à la protéine. Ainsi nous avons pu mettre en évidence que TDP-43 lie l'ARNm de G3BP1 et non celui de TIA-1.

Annexe 2 : L'absence de G3BP1 induit un retard dans l'assemblage des GS et un désassemblage accéléré.

La déplétion de TDP-43 induit un retard de formation des GS et un désassemblage accéléré [11]. Comme l'absence de TDP-43 induit une diminution d'expression de G3BP1 de 79 % [11], nous nous sommes demandé si l'effet de TDP-43 sur la cinétique de formation/désassemblage des GS pouvait être attribuée à la déplétion de G3BP1.

Ainsi après trois jours de traitement par ARNi, les cellules ont été stressées avec 0.5 mM SA 30 minutes et collectées toutes les demi-heures jusqu'à 90 minutes. Ensuite, à l'aide d'un marquage TIA-1, le pourcentage de cellules formant des GS dans leur cytoplasme a été quantifié à chaque point de la cinétique.

La déplétion de G3BP1 induit un retard d'assemblage 30 minutes après exposition au stress, seulement 80% des cellules forment des GS (contre ~ 100 %

pour les cellules contrôles). De manière assez surprenante il s'agit exactement du même retard de formation observé dans les cellules n'exprimant pas TDP-43 [11]. La déplétion de G3BP1, tout comme celle de TDP-43 entraîne, elle aussi une accélération du désassemblage.

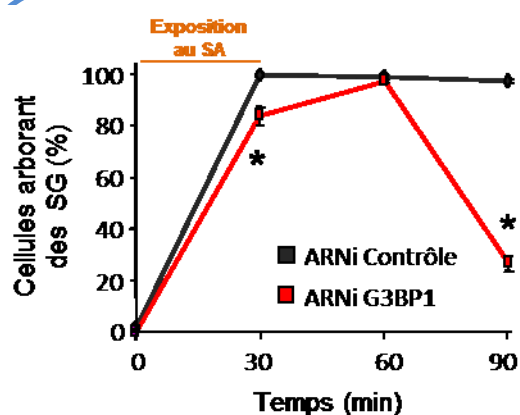


Figure 9: l'absence de G3BP induit un retard dans l'assemblage des GS et un désassemblage accéléré.

Les cellules ont été transfectées avec des ARNi control ou ciblant G3BP1 pendant 72 h. Les cellules ont été soumises à un stress (0,5 Mm SA, 30 min) et collectées à 30, 60 et 90 min. Le suivi des GS a été effectué en utilisant le marqueur TIA-1. Les courbes sont le résultat de la moyenne de 3 expériences indépendantes, les barres d'erreurs correspondent aux erreurs standards. * $p > 0,05$

Annexe 3 : La déplétion de FUS n'a aucun impact sur la cinétique de formation des GS

De nombreuses études relient TDP-43 et FUS dans les mêmes processus cellulaires [125, 138, 158, 195, 261, 262]. De ce fait, nous avons voulu savoir si la déplétion de FUS pouvait induire les mêmes phénotypes que celle de TDP-43.

Ainsi, après trois jours de traitement par ARNi, les cellules ont été stressées avec 0.5 mM SA 30 minutes et collectées toutes les demi-heures jusqu'à 90 minutes. Ensuite, à l'aide d'un marquage TIA-1, le pourcentage de cellules formant des GS dans leur cytoplasme a été quantifié à chaque point de la cinétique.

Nous nous attendions à obtenir un retard de formation et un désassemblage accéléré comparable aux cellules déplétées

en TDP-43 ou G3BP1 (Annexe 2, [11]). Or, de manière surprenante, aucune différence n'est observée entre les cellules contrôles et celles déplétées en FUS.

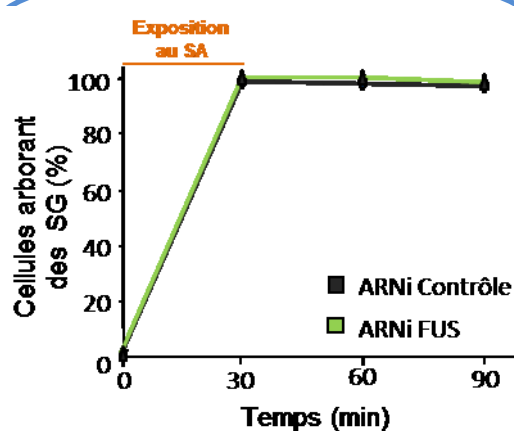


Figure 10: l'absence de FUS induit un retard dans l'assemblage des GS et un désassemblage accéléré.

Les cellules ont été transfectées avec des ARNi control ou ciblant FUS pendant 72 h. Les cellules ont été soumises à un stress (0,5 Mm SA, 30 min) et collectées à 30, 60 et 90 min. Le suivi des GS a été effectué en utilisant le marqueur TIA-1. Les courbes sont le résultat de la moyenne de 3 expériences indépendantes, les barres d'erreurs correspondent aux erreurs standards. * $p > 0,05$

Annexe 4 : La déplétion de TDP-43 ne semble pas affecter le réseau de microtubule

Qu'il s'agisse de l'assemblage ou du désassemblage, ces deux processus sont actifs et font intervenir le transport via les microtubules [73, 108]. La déplétion de TDP-43 induit de fortes perturbations au niveau de la cinétique de (dé)assemblage des GS [11]. Nous nous sommes demandé si le retard de formation et la dissolution accélérée observées lors de la déplétion de TDP-43 pouvait être expliquée par un atteinte du réseau de microtubule.

Après 72 heures de transfection par ARNi contre TDP-43, les cellules ont été stressées (0,5 mM SA, 30 minutes), collectées à différents temps de la cinétique d'assemblage et marquées à l'aide d'un anticorps reconnaissant l' α -tubuline.

Globalement, le réseau de microtubules ne semble pas être affecté par la déplétion de TDP-43.

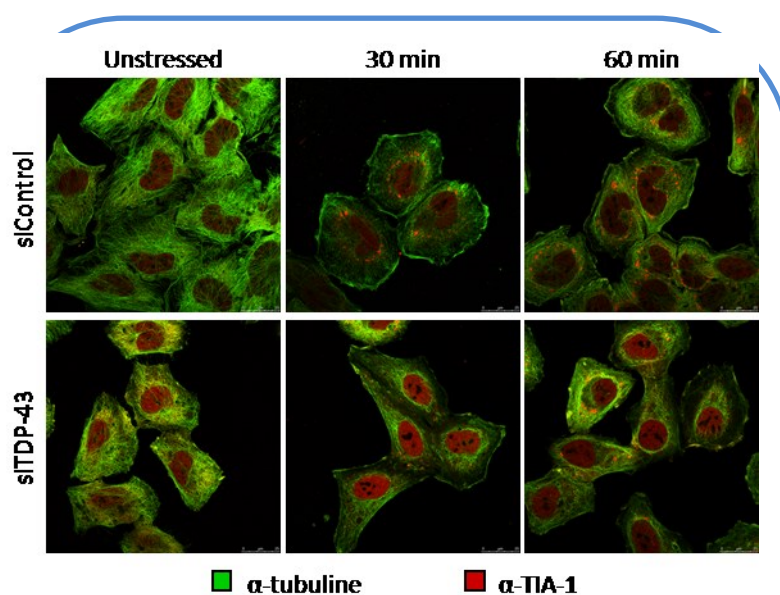


Figure 11: la déplétion de TDP-43 ne semble pas affecter le réseau de microtubules.

Après 72 h de traitement par ARNi, les cellules sont stressées 30 min avec 0,5 mM SA, collectées et fixées à différents temps de la cinétique de formation des GS. Les microtubules et les GS sont respectivement marqués à l'aide d'anticorps reconnaissant l' α -tubuline et TIA-1.

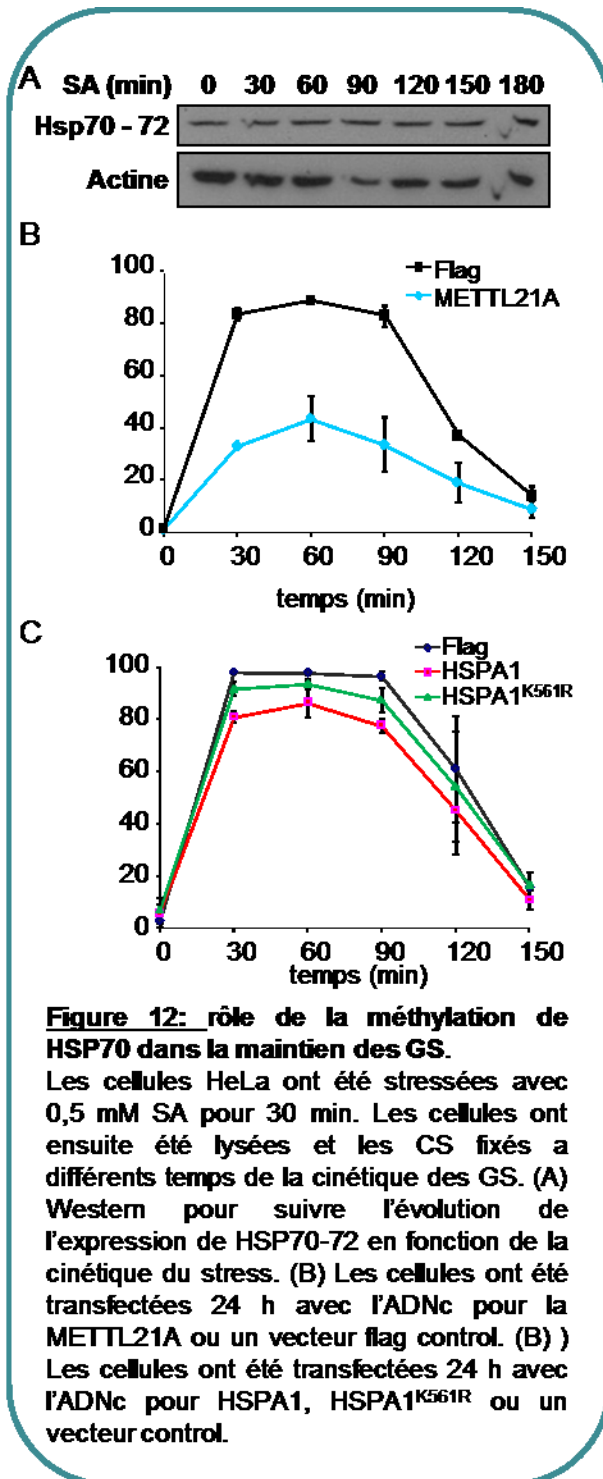
Annexe 5 : Le rôle de la méthylation dans le désassemblage des GS.

Lors de notre étude nous nous sommes principalement intéressés à l'assemblage des GS. Or les mécanismes de désassemblages sont encore très peu connus. Le plus développé dans la littérature fait intervenir la protéine chaperonne HSP70 et il a été observé que l'exposition au stress va provoquer l'induction de son expression dans le cadre d'une inhibition du protéasome [22]. Cette augmentation d'expression est supposément impliquée dans le désassemblage des GS via l'interaction entre HSP70 et TIA-1 [30, 38]. Toutefois ce résultat n'a pas été reproduit en réponse à des types de stress différents.

Dans un premier temps nous avons cherché à déterminer si l'exposition à l'arsénite de sodium engendrait une augmentation de l'expression de HSP70-72. Nous avons donc utilisé des cellules HeLa traitées avec 0.5 mM de SA pendant 30 minutes. Par la suite, les cellules ont été collectées toutes les 30 minutes sur une période de 3 heures (temps nécessaire pour le désassemblage des GS). Nous n'avons pas été en mesure de voir une augmentation de l'expression de HSP70, ni même une relocalisation protéique au niveau des GS. Cependant, si l'expression de HSP70 n'est pas activée en réponse à la présence d'un stress oxydatif, il est possible que la protéine soit activée par une modification post-traductionnelle. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. B. Coulombe nous avons eu la chance de pouvoir étudier l'impact de METTL21A sur la cinétique de formation des GS. METTL21A est une méthyl-transférase nouvellement identifiée dans le laboratoire du Dr. Coulombe qui a pour cible HSP70. La méthylation semble importante dans l'étape de désassemblage des GS (voir

paragraphe A, ii, 6, b, Méthylation), et nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle *lors d'une réponse cellulaire à un stress oxydatif la METTL21A active HSP70 via son action de méthylation en vue du désassemblage des GS.*

Dans un premier temps nous avons surexprimé la METTL21A et quantifié le nombre de cellules formant des GS tout au long d'une cinétique. Nous avons ainsi pu observer que l'expression de cette méthyltransférase va avoir un effet d'inhibition sur la capacité cellulaire à former des GS. Entre 83 % et 88 % des cellules contrôle présentent des GS dans leur cytoplasme à partir de 30 min et jusqu'à 90 min. Or, lors de l'expression de la METTL21A, la formation des GS est grandement altérée, seulement 43 % des cellules sont capables de former des GS au plus fort de la réponse cellulaire au stress.

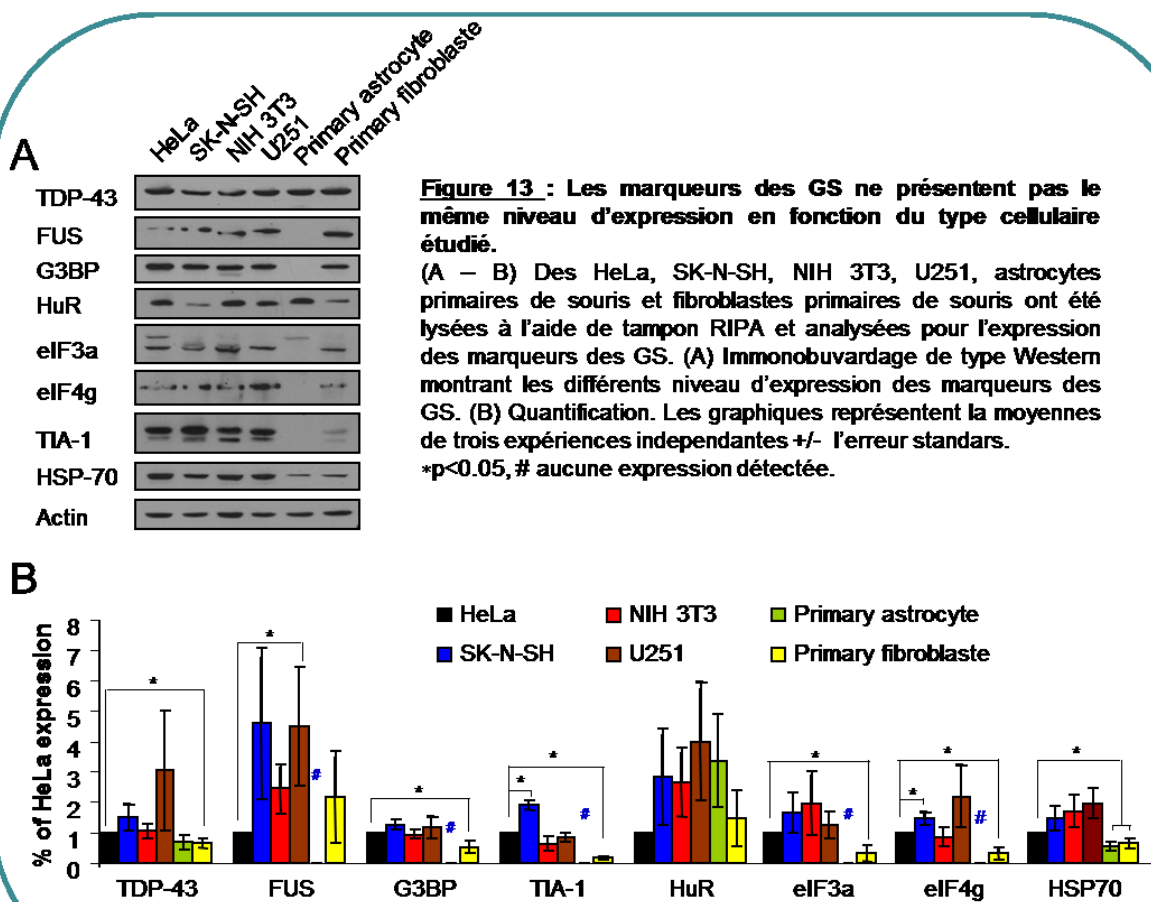


Afin de confirmer que cet effet est dû à la méthylation de HSPA1, nous avons exprimé la protéine sauvage méthylable et un mutant HSPA1^{K561R} non méthylable. Puis, de nouvelles quantifications ont été entreprises. De manière assez intéressante, l'expression de HSP70 entraîne un délai de formation des GS avec une accélération du désassemblage qui n'est pas présente chez le mutant. Cependant, ce défaut n'est pas aussi prononcé que lors de l'expression de METTL21A. Ainsi, il est possible que la boucle de régulation de HSP70 empêche le niveau total d'expression des membres de la famille HSP70 d'augmenter de façon trop importante, limitant ainsi l'effet observé. Cet effet n'est pas observé lors de l'expression du mutant non méthylable.

Cette étude préliminaire sur l'implication de la méthylation dans le désassemblage des GS via HSP70 nous permet de mieux comprendre un mécanisme peu étudié à l'heure actuelle.

Annexe 6 : Détermination du niveau d'expression de certains marqueurs des GS dans différentes lignées cellulaires

Toutes les cellules n'ont pas forcément la même faculté à répondre à l'exposition au stress. Nous nous sommes demandé si cette différence de réponse pouvait être attribuée au niveau d'expression de certaines protéines recrutée au niveau des GS. Nous avons ainsi étudié l'expression de TDP-43, FUS, G3BP, TIA-1, HuR, eIF3a, eIF4g et HSP70 dans différentes lignées cellulaires humaines (HeLa, SK-N-SH), murine (NIH 3T3, U251) et en lignées primaires de souris (astrocyte et fibroblastes).

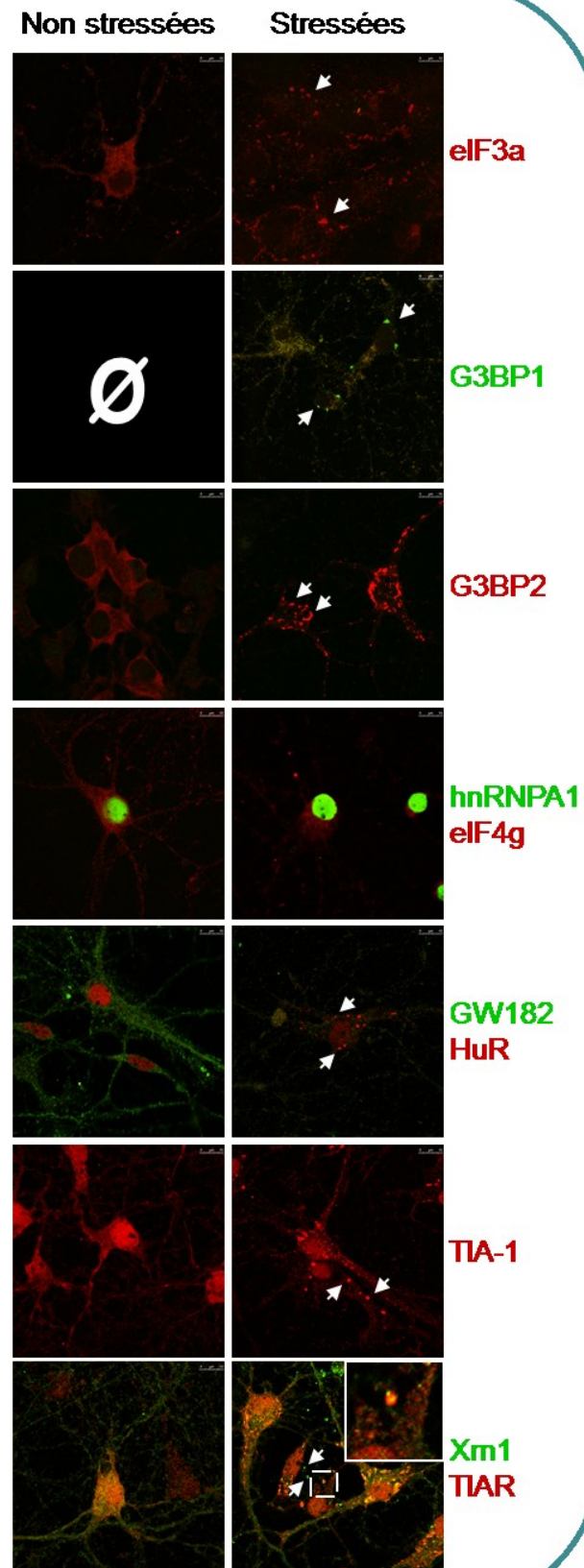


De manière assez surprenante, les astrocytes ne semblent pas exprimer certains des marqueurs clés des GS comme G3BP1, TIA-1, eIF3a, eIF4g et FUS. Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence que les astrocytes sont capables de former des GS (suivis à l'aide du marqueur des GS HuR). Nous ne sommes pas en mesure d'expliquer cette observation actuellement, mais elle est le point de départ d'un nouveau projet dans le laboratoire.

Annexe 7 : Protéine recrutées au GS en culture primaire de neurones

Il est communément admis que les GS puissent avoir différentes compositions en fonction du type cellulaire et des stress auxquelles elles sont exposées. Ici, après une exposition au sodium arsenite, nous avons étudié le recrutement de certains facteurs connus pour être recrutés au niveau des GS. Ainsi nous avons mis en

Figure 14:
Protéines recrutées au niveau des GS en culture primaire de neurones corticaux.
Après 10 jours en culture les neurones corticaux primaires ont été stressés 60 min avec 0,5 mM SA puis fixés à 120 min. Les cellules ont en suite été marquées avec les différents anticorps spécifiés sur la figure. Les flèches pointent les GS.



évidence que eIF3a, G3BP1, G3BP2, HuR, TIA-1 et TIAR sont recrutés au niveau des GS dans les neurones corticaux primaires en réponse à une exposition au sodium arsenite.

Annexe 8 : Protéines recrutées aux GS

Comme mentionné dans l'introduction les GS sont composés de nombreuses protéines. Ces inclusions n'étant pas délimitées par une membrane, il n'existe pas encore de méthode publiée sur le moyen de les purifier. Nous avons ainsi entrepris de recenser les protéines dont le recrutement au GS est mentionné dans la littérature. Nous avons analysé 150 publications effectuées en cellules de mammifères dont les GS se sont formés en réponse à l'exposition à un stress exogène.

Ce tableau récapitule notre étude par ordre alphabétique des protéines recrutées au niveau des GS. Puis nous avons inscrit si les protéines lient l'ARN (RBP, RNA Binding Protein). Différentes colonnes nous informent en réponse à quel stress ces protéines sont recrutées au niveau des GS. La dixième colonne, traite du (des)marqueur(s) de PB avec lequel la protéine en question colocalise (ou ne colocalise pas si le marqueur est entre parenthèse). Pour terminer cette annexe possède sa propre bibliographie.

Protéine	RBP	Stress oxydatif	Stress thermique	Stress du RE	Infection virale	Traitement anti-cancereu	Stress osmotique	Autres stress	Marqueur PB	Type cellulaire	références	
ADAR1	Y	sodium arsenite								HeLa	[1]	
Ago1	Y	sodium arsenite								HEK293T	[2]	
Ago2	Y					hippuristanol		UV	Dcp1	HeLa	[3]	
									HeLa	[4]		
		arsenic oxide							HEK293T	[5]		
		sodium arsenite							HEK293T	[2]		
						selenite			U2OS	[6]		
Aha1	N					hippuristanol			HeLa	[7]		
AKAP350	N	sodium arsenite							HepG2	[8]		
Ataxin-2	N		Heat shock						(Dcp1)	DU145	[9, 10]	
		sodium arsenite							(Dcp1)	DU145	[9, 10]	
Ataxin-2-Like	Y	sodium arsenite								HeLa, HEK293T	[11]	
		DTT								HeLa	[11]	
		Hydrogen peroxide								HeLa	[11]	
			Heat shock							HeLa	[11]	
									sorbitol		HeLa	[11]
								selenite			HeLa	[11]
								5-FU		HeLa	[11]	
APOBEC 3G	Y		Heat shock							HeLa	[12]	
									Mov10, Ago1, Ago2, rck/p54, Dcp1, GW182, YB1	HeLa	[12]	

CCAR1	N	sodium arsenite								HeLa, HepG2	[8]
Cdc37	N					hippuristanol				HeLa	[7]
CIRP	Y	sodium arsenite		DTT			sorbitol	(Dcp1)	NIH/3T3, COS7	[13]	
									COS7	[13]	
									COS7	[13]	
CUGBP-1	Y		Heat shock			bortezomide		(Dcp1a)	HeLa	[14]	
									HeLa	[15]	
CPEB1	Y	sodium arsenite						Dcp1, rck/p54 (no stress)	HeLa	[16]	
Caprin1	Y	sodium arsenite			Japanese Encephalitis Virus 24h				HeLa, NIH3T3, HepG2, F11, huh7	[8, 17-19]	
									huh7	[19]	
DAZL	Y		Heat shock						testis section	[20]	
DDX1	Y	sodium arsenite							F11, HeLa	[18, 21]	
DDX3	Y	sodium arsenite					sorbitol	(dcp1)	U2OS	[22]	
								(dcp1)	U2OS	[22]	
DDX6	Y	sodium arsenite	Heat shock		HCV-JFH1 hepatitis C			5-FU		DU145	[9]
										DU145	[9]
										RSc cells	[23]
									dcp1	HeLa	[11]
DIC	N	sodium arsenite							COS7	[24]	
DHC	N	sodium arsenite							NIH3T3	[24]	

eIF2-phospho	Y	sodium arsenite		thapsigargin						NIH/3T3	[25]		
									(hedls)	Human bone marrow-derived CD34+ hematopoietic cells, HeLa	[26, 27]		
								Furd	HeLa	[11]			
eIF3	N	sodium arsenite							(Dcp1) (p54) (hedls)	DU145, BE-M17, NIH/3T3, HeLa, U2OS, SR2+, HeLa, HEK293T, MEF, Vero cells, Human bone marrow-derived CD34+ hematopoietic cells	[13, 27-36]		
										Semliki Forest virus infection	MEF	[37]	
										LeC virus	HEp-02	[38]	
										TMEV, vesicular stomatitis virus, mammalian orthoreovirus (MRV)	(Dcp1a)	HeLa	[39-41]
										thapsigargin		teratocarcin	[35, 42]

			Heat shock							oma cells, MEF		
										HeLa, SR2+, HeLa, S2, MEF	[30, 33-35, 43]	
								clotrimazole	(Dcp1)	U2OS	[32]	
								pateamine A	(Dcp1)	U2OS, S2, MEF	[32, 33, 43, 44]	
								CCCP		HeLa	[45]	
								MG132		MEF	[35]	
eIF3a	N	sodium arsenite							poliovirus	HeLa	[46]	
										huh7, HeLa	[19, 47]	
eIF3b	N	sodium arsenite							(rck)	U2OS, COS7	[48-50]	
		Hydrogen peroxide								U2OS	[51]	
			Heat shock					Clotrimazol	(rck)	COS7	[49]	
			cold shock						(rck)	COS7, MEF	[49, 52]	
										COS7	[50]	
eIF4E	N	sodium arsenite								Dcp1	DU145, HeLa, SR2+, U2OS, Human bone marrow-derived CD34+ hematopoietic cells	[27, 28, 33, 48, 51, 53-55]
		Hydrogen peroxide									U2OS	[51]
				thapsigargin							NIH/3T3	[25]

					mammalian orthoreovirus (MRV), poliovirus					HeLa	[41, 46]
								pateamine A	Dcp1	U2OS	[33, 56]
								CCCPC		HeLa	[45]
			Heat shock							HeLa, YAMC, SR2+, MEF	[33, 57-59]
							sorbitol		(dcp1)	U2OS	[22]
						bortezomide				HeLa	[55, 60]
						selenite				U2OS	[6]
eIF4A	N							pateamine A		U2OS, HeLa	[56, 61]
								MG132		HeLa	[62]
						selenite				U2OS	[6]
						hippuristanol				HeLa	[61]
		sodium arsenite								HeLa	[61, 63]
			Heat shock							HeLa	[63]
eIF4B	Y							pateamine A		U2OS	[56]
					poliovirus					HeLa	[46]
		sodium arsenite								huh7	[19]
eIF4G	N	sodium arsenite								DU145	[28]
		sodium arsenite								U2OS	[6]
		sodium arsenite								HeLa	[64]
		sodium arsenite								HeLa	[65]
		sodium arsenite								HeLa	[11]

		sodium arsenite								Primary normal foreskin fibroblasts	[66]
				thapsigargin						NIH/3T3	[25]
					poliovirus					HeLa	[65, 67]
			Heat shock							COS7, Primary normal foreskin fibroblasts, HeLa	[57, 65, 66, 68]
			cold shock							COS7	[50]
								5-FU		HeLa	[11]
						selenite				U2OS	[6]
eIF5a	Y	sodium arsenite							(rck)	COS7	[49]
			Heat shock						(rck)	COS7	[49]
								clotrimazol	(rck)	COS7	[49]
						selenite				U2OS	[6]
EWS	Y	sodium arsenite								HT-1080	[69]
			Heat shock							HT-1080	[69]
FAK	N		Heat shock							P19	[70]
FAST	N	sodium arsenite							GW182	DU145	[71]
FMRP	Y		Heat shock							STEK, HeLa, P19	[63, 70, 72]
								MG132		HeLa	[62]
		sodium arsenite								HeLa, F11	[18, 55, 63, 73-75]
								NSC 119839		MEF	[76]
						bortezomide				HeLa	[15, 55, 60]

FMR1	Y	sodium arsenite				selenite				U2OS	[6]	
									(Dcp1)	SR2+	[33]	
			Heat shock						(Dcp1)	SR2+	[33]	
FUS	Y	sodium arsenite							(Hedls-GE-1)	HT-1080, neurone hippocamp aux primaire, HEK293T, SH-SY5Y	[69, 77-79]	
				thapsigargine							HEK293T	[77]
			Heat shock								HT-1080, neurone hippocamp aux primaire, SH-SY5Y, cellule embryonnaires de poisson, HEK293T	[69, 77, 78]
									clotrimazol		SH-SY5Y, neurone hippocamp aux primaire	[78]
								sorbitol			HeLa	[80]
FXR1	Y	sodium arsenite	Heat shock							STEK, HeLa, Ha-Cat	[72, 81]	
										HeLa, NIH3T3, Ha-Cat, IDH4	[55, 81-83]	
									pateamine A		U2 OS	[56]
									MG132		HeLa, MEF	[62]

								NSC 119839		MEF	[76]
						bortezomide				HeLa	[55, 60]
FXR2P	Y		Heat shock							STEK, HeLa	[72]
G3BP1	Y		Heat shock							HeLa, Ha-Cat, MEF, NMuMG	[35, 59, 80, 81, 84-88]
			cold shock							COS7	[50]
		sodium arsenite								HeLa, 3T3, Ha-Cat, RAS, HepG2, IDH4, U2OS, HEK293T, Jurkat, HuH7, Vero cells	[2, 6, 8, 10, 17, 19, 26, 36, 45, 48, 55, 61, 75, 80-82, 85-87, 89-97]
		arsenic acide								HeLa	[35]
		Hydrogen peroxide								HeLa, U2OS	[51, 80]
							hippuristanol			HeLa, MEF	[61]
							bortezomide			HeLa	[15, 55, 60]
							selenite			U2OS	[6]
							poliovirus			HeLa, HEK293T, MCF7, Vero cells	[67]
							RVS virus			HEp-2	[98]
							HCV-JFH1 hepatitis C			RSc cells, HuH7	[23, 99]
					CVB3, mammalian orthoreovirus (MRV), coxsackievir			HeLa	[35, 41, 100]		

					s B3 (CVB3), mengovirus (Zn domaine mutant)					
					mengovirus				MEF	[35]
					measles virus				HeLa	[101]
					Japanese Encephalitis Virus 24h				huh7	[19]
					Semliki Forest virus infection 8h				MEF	[44]
					Chikungunya				Vero cells	[36]
					West Nile Virus				BHK	[102]
				thapsigargin					HeLa	[80, 90]
									MEF	[76]
							NSC 119839			
							1 µM carbonyl cyanide 3- chlorophenylh ydrazone		HeLa	[45]
							MG132		HeLa	[62]
							CCCP		HeLa	[86]
							UV		HeLa	[86]
							pateamine A		HeLa	[61]
							5-FU		HeLa	[11]
							sorbitol		HeLa	[80]
G3BP2	Y	sodium arsenite							HeLa	[96]
			Heat shock					(Dcp1)	SK-N-BE	[103]
Ge-1	Y									[104]
Grb7	Y		Heat shock						P19	[70]

HDAC6	N	sodium arsenite	Heat shock					CCCP	HeLa	[86]	
									HeLa	[86]	
								UV	HeLa	[86]	
									HeLa	[86]	
hnRNPA 1	Y	sodium arsenite	Heat shock				sorbitol		NIH 3T3	[105]	
									NIH 3T3	[105, 106]	
									NIH 3T3, cortical glia, HEK293T, teratocarcinoma cells	[42, 105, 107]	
hnRNPA 2	Y	sodium arsenite							HeLa	[108]	
hnRNPK	Y	sodium arsenite					sorbitol		MTD-1	[109]	
									(Dcp1)	MTD-1	[109]
hnRNPQ	Y	sodium arsenite	Heat shock	thapsigargin					GW182	HeLa	[110]
									GW182	COS7	[110]
									GW182	COS7, HuH7	[19, 110]
										huh7	[19]
HOP	N					hippuristanol			HeLa	[7]	
HSP27	N		Heat shock						DU145, HeLa	[65, 111]	
HSP90	N					hippuristanol			HeLa	[7]	
HuD	Y		Heat shock						PC12	[112]	
HuR	Y	sodium arsenite							DU145, NSC34, RAS, HeLa, IDH4, NRK, NIH3T3,	[10, 28, 30, 82, 83, 113-117]	

									oligodendrocytes	
		Diethyl maleate							HeLa	[117]
		paraquat							HeLa	[118]
						sorbitol			HEK293T	[107]
						sorbitol			cortical glia	[107]
			Heat shock						NSC34, NMuMG, COS7, P19, HeLa	[12, 30, 68, 70, 113, 117]
							MG132		NSC34, HeLa, MEF	[62, 113]
							FCCP		DU145, HeLa, COS7	[119]
							pateamine A		HeLa, MEF	[6, 61]
							NSC 119839		MEF	[76]
						selenite			U2OS	[6]
						hippuristanol			HeLa, MEF	[61]
						bortezomide			HeLa	[60]
					RVS virus				HEp-2	[98]
					CVB3				HeLa	[100]
IGF2BP3	Y		Heat shock						SK-N-BE	[103]
importin alpha1	N	sodium arsenite							HeLa	[117, 120]
			Heat shock						HeLa	[117, 120]
						hippuristanol			HeLa	[120]
		Diethyl maleate						(dcp1)	HeLa	[117]
importin alpha4	N	Diethyl maleate						(dcp1)	HeLa	[117]

		sodium arsenite								HeLa	[117]
			Heat shock							HeLa	[117]
importin alpha 5	N	Diethyl maleate							(dcp1)	HeLa	[117]
		sodium arsenite								HeLa	[117]
			Heat shock							HeLa	[117]
importin beta1	N	Diethyl maleate								HeLa	[117]
		sodium arsenite						(dcp1a)		HeLa	[115, 117]
phospho-JNK	N	sodium arsenite							Dcp1	HEK293T	[121]
			Heat shock						Dcp1	HEK293T	[121]
KHC	N	sodium arsenite								NIH3T3	[24]
KLC	N	sodium arsenite								NIH3T3	[24]
LC3	N							MG132		HeLa	[92]
		sodium arsenite								HeLa	[92]
			Heat shock							HeLa	[92]
Lin28	Y		Heat shock						Dcp1	P19	[122]
LGP2		sodium arsenite								HeLa	[97]
MBNL1	Y	sodium arsenite							(Dcp1a)	HeLa, COS7	[21]
MLN51	Y	sodium arsenite							(Dcp1)	HeLa	[63, 73]
NF90	Y	sodium arsenite								HEK293	[94]
OGG1	N							Cadmium Chloride		MCF7	[123]
OAS	Y	sodium arsenite								HeLa	[97]

OGFOD1	N	sodium arsenite								HeLa	[90]
				thapsigargin						HeLa	[90]
OGN	N							clotrimazole	(Dcp1)	U2OS	[32]
								pateamine A	(Dcp1)	U2OS	[32]
		sodium arsenite							(Dcp1)	U2OS	[32]
PABP	Y		Heat shock							STEK, HeLa, SR2+, S2, COS7, NMuMG	[12, 33, 50, 72, 88]
								pateamine A		U2OS, HeLa, S2	[43, 56, 61]
								MG132		HeLa	[62]
								CCCP		HeLa	[45]
							hippuristanol			HeLa	[61]
							selenite			U2OS	[6]
						thapsigargin				teratocarcinoma cells	[42]
							poliovirus			HeLa	[67]
		sodium arsenite							HEK293T, oligodendrocytes, HeLa, SR2+, COS7, S2, U2OS	[24, 31, 33, 43, 51, 96, 114, 115, 124]	
		Hydrogen peroxide							U2OS	[51]	
PABP1	Y	sodium arsenite								HeLa, Jurkat, HEK293T	[2, 94]
							sorbitol		(dcp1)	U2OS	[22]
PABPC1	Y		Heat shock							SK-N-BE	[103]

		sodium arsenite								SK-N-BE	[103]
PACT	Y					hippuristanol				HeLa	[7]
PCBP2	Y	sodium arsenite							(Dcp1)	HeLa	[14]
			Heat shock							HeLa	[14]
				DTT							HeLa
PKC	N		Heat shock							SK-N-BE	[103]
		sodium arsenite								SK-N-BE	[103]
PKR	Y	sodium arsenite								HeLa	[97]
PKP3	N		Heat shock							Ha-Cat	[81]
		sodium arsenite								Ha-Cat	[81]
PMRT		sodium arsenite								SH-SY5Y	[125]
PQBP1	N	sodium arsenite								primary neuron	[18]
profilin-1	N	sodium arsenite								HeLa	[10]
			Heat shock							HeLa	[10]
profilin-2	N	sodium arsenite								HeLa	[10]
QKI-5	Y	arsenic oxide								A343	[5]
QKI-6	Y	arsenic oxide								A343, primary rat oligodendrocyte	[5]
Ran	Y	sodium arsenite								HeLa	[120]
			Heat shock							HeLa	[120]
						hippuristanol				HeLa	[120]
RAP55	Y	sodium arsenite						Dcp1	Hep-2	[126]	

					influenza virus NS1					HEK293T	[126]
RACK1	Y	sodium arsenite							Dcp1	HeLa, HEK293T	[2, 64]
								5-FU		HeLa	[11]
RBM4	Y	sodium arsenite								HeLa	[127]
RBM42	Y	sodium arsenite					sorbitol			MTD-1	[109]
								(Dcp1)		MTD-1	[109]
RHAU	Y							CCCP		HeLa	[30]
						hippuristanol				HeLa	[30]
		sodium arsenite								HeLa	[30]
			Heat shock								HeLa
RIG-1	Y	sodium arsenite								HeLa	[97]
RhoA	N		Heat shock							P19	[70]
RNase-L	Y	sodium arsenite								HeLa	[97]
Rin	N							pateamine A		drosophila S2	[43]
		sodium arsenite								drosophila S2	[43]
			Heat shock							drosophila S2	[43]
ROCK1	N		Heat shock							P19	[70]
roquin	Y	sodium arsenite								HEK293T, jurkat	[128]
RPL10	Y	sodium arsenite								SR2+	[33]
			Heat shock							SR2+	[33]
RPL-PO	Y	sodium arsenite								SR2+	[33]
			Heat shock							SR2+	[33]

RSK2	N	sodium arsenite								MCF7, MDA-MB-231, T47D, MCF-10A, HME	[129]
ribosomal subunit S3	N			thapsigargin						NIH/3T3	[25]
ribosomal subunit S6	N			thapsigargin					pateamine A	NIH/3T3	[25]
		sodium arsenite								U2OS	[56]
ribosomal subunit S18	N	sodium arsenite								Oligodendrocytes	[54]
			Heat shock							SR2+	[33]
ribosomal subunit S19	N	sodium arsenite								SR2+	[33]
ribosomal subunit S19	N	sodium arsenite								DU145	[28]
Sam68	Y	sodium arsenite								HEK293T, HeLa	[65, 124]
			Heat shock		poliovirus 4h					HeLa	[65]
										HeLa	[65]
SERBP1	Y	sodium arsenite								HeLa	[106]
Smg1	Y	Hydrogen peroxide								COS7, HeLa, BHK	[130]
			Heat shock							Primary normal foreskin fibroblasts	[66]
										Primary normal foreskin fibroblasts	[66]
SMN	Y		Heat shock							HeLa	[84]
		sodium arsenite								HeLa	[84]

								Cadmium Chloride		MCF7	[123]	
SGNP	Y	sodium arsenite								LHCNM2 human myoblasts	[131]	
SRp20					poliovirus infection 3h					SK-N-SH	[132]	
Stau1	Y	sodium arsenite		thapsigargin					(Dcp1)	NIH/3T3	[54]	
										HeLa, oligodendrocytes, NIH3T3	[24, 54]	
						hippuristanol				U2OS	[54]	
stau2	Y	sodium arsenite							oligodendrocytes	[54]		
T1L	N				mammalian orthoreovirus (MRV) infection 2-6h				(Dcp1)	HeLa	[41]	
TAF15	Y	sodium arsenite								HT-1080, HEK293T	[69, 79]	
			Heat shock							HT-1080	[69]	
TDP-43	Y	sodium arsenite					sorbitol			HEK293T, cortical glia	[107]	
							Hanks balanced solution			HEK293, BE-M17	[29]	
										(GW182)	BE-M17, HEK293T, NSC34, HeLa, SK-N-SH	[29, 108, 113]
			Heat shock								HeLa, NSC34	[108, 113]
					thapsigargin					MG132		NSC34
									HeLa	[108]		
Tdrd3	N	sodium							(GW182)	HeLa	[48, 74]	

		arsenite	Heat shock							HeLa	[48]
							sorbitol			HeLa	[75]
TIA-1	Y		Heat shock						Dcp1	DU145, HeLa, Bladder carcinoma cell, normal uroepithelial cells, NIH3T3, bladder cancer cell lines 5637 and 639v, A549, testis section, COS7, NSC34, P19, HEK293T, SH-SY5Y, YAMC, neurone hippocamp aux primaire	[9, 12, 14, 20, 30, 58, 63, 65, 68, 70, 75, 78, 87, 92, 108, 110, 111, 113, 120-122, 133-137]
		sodium arsenite							(GW182, hedls), Dcp1	COS7, BE-M17, U2OS, NSC34, DU145, HeLa, NIH3T3, MDA-MB-231, MCF-10A, T47D, HME, HEK293T, neurone hippocamp aux	[9, 17-19, 21, 26-32, 34, 51, 63, 65, 66, 75, 78, 79, 92, 106, 108, 110, 111, 113, 115, 120, 121, 128, 129, 132, 134,

									primaire, SH-SY5Y, Jurkat, RES, Vero, F11, HuH7, SK-N-SH, NG108-15, Human bone marrow-derived CD34+ hematopoietic cells	138-142]	
									Hydrogen peroxide	Primary normal foreskin fibroblasts	[66]
									Hydrogen peroxide	U2OS	[51]
									arsenic oxide	primary rat oligodendrocyte	[5]
			thapsigargin							HeLa, NIH3T3, ma cells	[25, 42, 108, 110]
							FCCP			DU145	[28]
							DPI			DU145	[28]
							oligomycine			DU145	[122]
							FCCP			DU145, HeLa, COS7	[119]
							pateamine A	Dcp1		U2OS, HeLa, MEF	[44, 56, 61]
							Guanabenz			HuH7	[143]
							MG132			NSC34, HeLa	[62, 113]
							CCCP			HeLa	[30]

							clotrimazol	neurone hippocamp aux primaire, SH-SY5Y	[78]
							MG132	HeLa	[144]
							UV	HeLa, NIH3T3	[4, 134]
					sorbitol			HeLa	[75]
				hippuristanol			Dcp1	HeLa, U2OS, A549	[3, 7, 30, 54, 61, 120, 136]
			Semliki Forest virus infection					MEF	[37]
			West Nile virus					BHK	[145]
			mammalian orthoreovirus (MRV) infection 2-6h					MEF, HeLa	[41]
			poliovirus					COS7, HeLa	[65]
			RVS virus					HEp-2	[98]
			TMEV					HeLa	[40]
			poliovirus					SK-N-SH, HeLa	[46, 132]
			CVB3					HeLa	[100]
			mengovirus					HeLa	[35]
			Japanese Encephalitis Virus 24h					huh7	[19]
			Semliki Forest virus infection 8h					MEF	[44]

					vesicular stomatitis virus 5h				HeLa	[39]	
					Hepatitis C				HuH7	[99]	
					Herpes simplex virus 2 8-20h				HeLa	[146]	
TIAR	Y		Heat shock						DU145, HeLa, U2OS, COS7, HEK293T, MEF	[52, 68, 77, 84, 111, 147]	
			sodium arsenite					(Dcp1, Dcp2)	COS7, BE-M17, HeLa, U2OS, MTD-1, HEK293T, NIH3T3, L929, SH-SY5Y, LHCNM2 human myoblasts, oligodendrocytes	[1, 6, 13, 24, 29, 41, 74, 77, 84, 95, 109, 111, 114, 125, 131, 147]	
						West Nile virus				BHK	[145]
						Mouse hepatitis coronavirus				LR7	[148]
						poliovirus				HeLa	[67]
						mammalian orthoreovirus (MRV)				CV-1, DU-145, HeLa, COS7	[41]
						vesicular stomatitis virus 5h				HeLa	[39]
						Hepatitis C				HuH7	[99]

					virus			sorbitol		MTD-1, HeLa	[80, 109]
				thapsigargin					(Dcp1)	NIH3T3, HEK293T	[24, 54, 77]
								5-FU		HeLa	[11]
								FUrd		HeLa	[11]
								5-azacytidine	(Dcp1)	HeLa	[11]
								6-thioguanine	(Dcp1)	HeLa	[11]
								pateamine A		MEF	[6]
						selenite				U2OS	[6]
TIS11	Y		Heat shock							COS7	[68]
TNS	N	sodium arsenite							(Dcp1)	HeLa	[95]
TRAF2	N	sodium arsenite	Heat shock							HeLa	[149]
									HeLa	[149]	
TRN	N	sodium arsenite							DCP1a, EDC4 (non stressed)	HeLa	[115]
TTP	Y	sodium arsenite						FCCP		DU145, HeLa, COS7	[119]
										DU145, HeLa, COS7	[115, 119]
			Heat shock							NMuMG cells	[88]
Tudor-SN	Y	sodium arsenite	Heat shock							HeLa	[87]
										HeLa	[87]
USP10	N	sodium								HeLa,	[2, 19]

		arsenite							Jurkat, HEK293T, HuH7	
WDR62	Y	sodium arsenite						(Dcp1)	HEK293T	Wasserman , Mol Biol Cell. 2010
			Heat shock					(Dcp1)	HEK293T	Wasserman , Mol Biol Cell. 2010
xrn1	Y	sodium arsenite							DU145	Kedersha, MBC, 2002
YB-1	Y	sodium arsenite							HeLa, NG108-15, NRK	[21, 116, 142, 150]
			Heat shock						HeLa, NMuMG	[57, 88]
ZBP1	Y	sodium arsenite						(Dcp1, Dcp2)	HeLa, U2OS	[85, 147]
			Heat shock						HeLa, U2OS	[85, 147]

1. Ng, S.K., et al., *Proteins that contain a functional Z-DNA-binding domain localize to cytoplasmic stress granules*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(21): p. 9786-99.
2. Takahashi, M., et al., *Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(4): p. 815-29.
3. Leung, A.K., J.M. Calabrese, and P.A. Sharp, *Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18125-30.
4. Pothof, J., et al., *MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response*. EMBO J, 2009. **28**(14): p. 2090-9.
5. Wang, Y., et al., *The QKI-6 RNA binding protein localizes with the MBP mRNAs in stress granules of glial cells*. PLoS One, 2010. **5**(9).
6. Fujimura, K., A.T. Sasaki, and P. Anderson, *Selenite targets eIF4E-binding protein-1 to inhibit translation initiation and induce the assembly of non-canonical stress granules*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(16): p. 8099-110.
7. Pare, J.M., et al., *Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(14): p. 3273-84.
8. Kolobova, E., et al., *Microtubule-dependent association of AKAP350A and CCAR1 with RNA stress granules*. Exp Cell Res, 2009. **315**(3): p. 542-55.
9. Nonhoff, U., et al., *Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(4): p. 1385-96.
10. Figley, M.D., et al., *Profilin 1 associates with stress granules and ALS-linked mutations alter stress granule dynamics*. J Neurosci, 2014. **34**(24): p. 8083-97.
11. Kaehler, C., et al., *5-Fluorouracil affects assembly of stress granules based on RNA incorporation*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(10): p. 6436-47.
12. Gallois-Montbrun, S., et al., *Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules*. J Virol, 2007. **81**(5): p. 2165-78.

13. De Leeuw, F., et al., *The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor.* Exp Cell Res, 2007. **313**(20): p. 4130-44.
14. Fujimura, K., F. Kano, and M. Murata, *Dual localization of the RNA binding protein CUGBP-1 to stress granule and perinucleolar compartment.* Exp Cell Res, 2008. **314**(3): p. 543-53.
15. Gareau, C., et al., *p21(WAF1/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to bortezomib-mediated apoptosis.* PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20254.
16. Wilczynska, A., et al., *The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 981-92.
17. Solomon, S., et al., *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, 2007. **27**(6): p. 2324-42.
18. Kunde, S.A., et al., *The X-chromosome-linked intellectual disability protein PQBP1 is a component of neuronal RNA granules and regulates the appearance of stress granules.* Hum Mol Genet, 2011. **20**(24): p. 4916-31.
19. Katoh, H., et al., *Japanese encephalitis virus core protein inhibits stress granule formation through an interaction with Caprin-1 and facilitates viral propagation.* J Virol, 2013. **87**(1): p. 489-502.
20. Kim, B., H.J. Cooke, and K. Rhee, *DAZL is essential for stress granule formation implicated in germ cell survival upon heat stress.* Development, 2012. **139**(3): p. 568-78.
21. Onishi, H., et al., *MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules.* J Neurosci Res, 2008. **86**(9): p. 1994-2002.
22. Shih, J.W., et al., *Critical roles of RNA helicase DDX3 and its interactions with eIF4E/PABP1 in stress granule assembly and stress response.* Biochem J, 2012. **441**(1): p. 119-29.
23. Ariumi, Y., et al., *Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets.* J Virol, 2011. **85**(14): p. 6882-92.
24. Loschi, M., et al., *Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 21): p. 3973-82.
25. Kimball, S.R., et al., *Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes.* Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(2): p. C273-84.
26. Fujimura, K., et al., *Microscopic dissection of the process of stress granule assembly.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(11): p. 1728-37.
27. Lavut, A. and D. Raveh, *Sequestration of highly expressed mRNAs in cytoplasmic granules, P-bodies, and stress granules enhances cell viability.* PLoS Genet, 2012. **8**(2): p. e1002527.
28. Kedersha, N., et al., *Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(1): p. 195-210.
29. Liu-Yesucevitz, L., et al., *Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue.* PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13250.
30. Chalupnikova, K., et al., *Recruitment of the RNA helicase RHAU to stress granules via a unique RNA-binding domain.* J Biol Chem, 2008. **283**(50): p. 35186-98.
31. Nadezhdina, E.S., et al., *Microtubules govern stress granule mobility and dynamics.* Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(3): p. 361-71.
32. Ohn, T., et al., *A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly.* Nat Cell Biol, 2008. **10**(10): p. 1224-31.
33. Farny, N.G., N.L. Kedersha, and P.A. Silver, *Metazoan stress granule assembly is mediated by P-eIF2alpha-dependent and -independent mechanisms.* RNA, 2009. **15**(10): p. 1814-21.
34. Souquere, S., et al., *Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 20): p. 3619-26.
35. Langerreis, M.A., Q. Feng, and F.J. van Kuppeveld, *MDA5 localizes to stress granules, but this localization is not required for the induction of type I interferon.* J Virol, 2013. **87**(11): p. 6314-25.
36. Fros, J.J., et al., *Chikungunya virus nsP3 blocks stress granule assembly by recruitment of G3BP into cytoplasmic foci.* J Virol, 2012. **86**(19): p. 10873-9.
37. McInerney, G.M., et al., *Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation.* Mol Biol Cell, 2005. **16**(8): p. 3753-63.

38. Hanley, L.L., et al., *Roles of the respiratory syncytial virus trailer region: effects of mutations on genome production and stress granule formation*. *Virology*, 2010. **406**(2): p. 241-52.
39. Dinh, P.X., et al., *Induction of stress granule-like structures in vesicular stomatitis virus-infected cells*. *J Virol*, 2013. **87**(1): p. 372-83.
40. Borghese, F. and T. Michiels, *The leader protein of cardioviruses inhibits stress granule assembly*. *J Virol*, 2011. **85**(18): p. 9614-22.
41. Qin, Q., C. Hastings, and C.L. Miller, *Mammalian orthoreovirus particles induce and are recruited into stress granules at early times postinfection*. *J Virol*, 2009. **83**(21): p. 11090-101.
42. Goodier, J.L., et al., *LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(18): p. 6469-83.
43. Khong, A. and E. Jan, *Modulation of stress granules and P bodies during dicistrovirus infection*. *J Virol*, 2011. **85**(4): p. 1439-51.
44. Panas, M.D., et al., *Sequestration of G3BP coupled with efficient translation inhibits stress granules in Semliki Forest virus infection*. *Mol Biol Cell*, 2012. **23**(24): p. 4701-12.
45. Qi, D., et al., *Monocyte chemotactic protein-induced protein 1 (MCP1P1) suppresses stress granule formation and determines apoptosis under stress*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(48): p. 41692-700.
46. White, J.P. and R.E. Lloyd, *Poliovirus unlinks TIA1 aggregation and mRNA stress granule formation*. *J Virol*, 2011. **85**(23): p. 12442-54.
47. Chudinova, E.M., E.S. Nadezhdina, and P.A. Ivanov, *Cellular acidosis inhibits assembly, disassembly, and motility of stress granules*. *Biochemistry (Mosc)*, 2012. **77**(11): p. 1277-84.
48. Emara, M.M., et al., *Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(14): p. 10959-68.
49. Li, C.H., et al., *eIF5A promotes translation elongation, polysome disassembly and stress granule assembly*. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e9942.
50. Hofmann, S., et al., *Translation suppression promotes stress granule formation and cell survival in response to cold shock*. *Mol Biol Cell*, 2012. **23**(19): p. 3786-800.
51. Emara, M.M., et al., *Hydrogen peroxide induces stress granule formation independent of eIF2alpha phosphorylation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **423**(4): p. 763-9.
52. Buchan, J.R., et al., *Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function*. *Cell*, 2013. **153**(7): p. 1461-74.
53. Kedersha, N., et al., *Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling*. *J Cell Biol*, 2005. **169**(6): p. 871-84.
54. Thomas, M.G., et al., *Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 4): p. 563-73.
55. Fournier, M.J., et al., *Inactivation of the mTORC1-eukaryotic translation initiation factor 4E pathway alters stress granule formation*. *Mol Cell Biol*, 2013. **33**(11): p. 2285-301.
56. Dang, Y., et al., *Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(43): p. 32870-8.
57. Suzuki, Y., et al., *The Hsp90 inhibitor geldanamycin abrogates colocalization of eIF4E and eIF4E-transporter into stress granules and association of eIF4E with eIF4G*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(51): p. 35597-604.
58. Hu, S., et al., *Stress granule formation mediates the inhibition of colonic Hsp70 translation by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010. **298**(4): p. G481-92.
59. Sukarieh, R., N. Sonenberg, and J. Pelletier, *The eIF4E-binding proteins are modifiers of cytoplasmic eIF4E relocalization during the heat shock response*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **296**(5): p. C1207-17.
60. Fournier, M.J., C. Gareau, and R. Mazroui, *The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules*. *Cancer Cell Int*, 2010. **10**: p. 12.
61. Mazroui, R., et al., *Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(10): p. 4212-9.
62. Mazroui, R., et al., *Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(7): p. 2603-18.
63. Didiot, M.C., et al., *Cells lacking the fragile X mental retardation protein (FMRP) have normal RISC activity but exhibit altered stress granule assembly*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(1): p. 428-37.

64. Arimoto, K., et al., *Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(11): p. 1324-32.
65. Piotrowska, J., et al., *Stable formation of compositionally unique stress granules in virus-infected cells*. J Virol, 2010. **84**(7): p. 3654-65.
66. Brown, J.A., et al., *A novel role for hSMG-1 in stress granule formation*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(22): p. 4417-29.
67. White, J.P., et al., *Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(5): p. 295-305.
68. Murata, T., et al., *Recruitment of mRNA-destabilizing protein TIS11 to stress granules is mediated by its zinc finger domain*. Exp Cell Res, 2005. **303**(2): p. 287-99.
69. Andersson, M.K., et al., *The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response*. BMC Cell Biol, 2008. **9**: p. 37.
70. Tsai, N.P., P.C. Ho, and L.N. Wei, *Regulation of stress granule dynamics by Grb7 and FAK signalling pathway*. EMBO J, 2008. **27**(5): p. 715-26.
71. Kedersha, N. and P. Anderson, *Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(Pt 6): p. 963-9.
72. Mazroui, R., et al., *Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(24): p. 3007-17.
73. Baguet, A., et al., *The exon-junction-complex-component metastatic lymph node 51 functions in stress-granule assembly*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 16): p. 2774-84.
74. Linder, B., et al., *Tdrd3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(20): p. 3236-46.
75. Goulet, I., et al., *TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(19): p. 3055-74.
76. Mokas, S., et al., *Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(11): p. 2673-83.
77. Bosco, D.A., et al., *Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(21): p. 4160-75.
78. Bentmann, E., et al., *Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)*. J Biol Chem, 2012. **287**(27): p. 23079-94.
79. Blechingberg, J., et al., *Gene expression responses to FUS, EWS, and TAF15 reduction and stress granule sequestration analyses identifies FET-protein non-redundant functions*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e46251.
80. Sama, R.R., et al., *FUS/TLS assembles into stress granules and is a prosurvival factor during hyperosmolar stress*. J Cell Physiol, 2013. **228**(11): p. 2222-31.
81. Hofmann, I., et al., *Identification of the junctional plaque protein plakophilin 3 in cytoplasmic particles containing RNA-binding proteins and the recruitment of plakophilins 1 and 3 to stress granules*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(3): p. 1388-98.
82. Lian, X.J. and I.E. Gallouzi, *Oxidative Stress Increases the Number of Stress Granules in Senescent Cells and Triggers a Rapid Decrease in p21waf1/cip1 Translation*. J Biol Chem, 2009. **284**(13): p. 8877-87.
83. Sahoo, P.K., et al., *Wnt signalling antagonizes stress granule assembly through a Dishevelled-dependent mechanism*. Biol Open, 2012. **1**(2): p. 109-19.
84. Hua, Y. and J. Zhou, *Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules*. FEBS Lett, 2004. **572**(1-3): p. 69-74.
85. Deigendesch, N., F. Koch-Nolte, and S. Rothenburg, *ZBP1 subcellular localization and association with stress granules is controlled by its Z-DNA binding domains*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(18): p. 5007-20.
86. Kwon, S., Y. Zhang, and P. Matthias, *The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response*. Genes Dev, 2007. **21**(24): p. 3381-94.
87. Gao, X., et al., *Tudor-SN interacts with and co-localizes with G3BP in stress granules under stress conditions*. FEBS Lett, 2010. **584**(16): p. 3525-32.
88. Bann, D.V., A.R. Beyer, and L.J. Parent, *A murine retrovirus co-Opts YB-1, a translational regulator and stress granule-associated protein, to facilitate virus assembly*. J Virol, 2014. **88**(8): p. 4434-50.
89. Tourriere, H., et al., *The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules*. J Cell Biol, 2003. **160**(6): p. 823-31.
90. Wehner, K.A., S. Schutz, and P. Sarnow, *OGFOD1, a novel modulator of eukaryotic translation initiation factor 2alpha phosphorylation and the cellular response to stress*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(8): p. 2006-16.
91. Hinton, S.D., et al., *The pseudophosphatase MK-STYX interacts with G3BP and decreases stress granule formation*. Biochem J, 2010. **427**(3): p. 349-57.
92. Seguin, S.J., et al., *Inhibition of autophagy, lysosome and VCP function impairs stress granule assembly*. Cell Death Differ, 2014.
93. Singleton, R.S., et al., *OGFOD1 catalyzes prolyl hydroxylation of RPS23 and is involved in translation control and stress granule formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(11): p. 4031-6.

94. Wen, X., et al., *NF90 exerts antiviral activity through regulation of PKR phosphorylation and stress granules in infected cells*. J Immunol, 2014. **192**(8): p. 3753-64.
95. Weissbach, R. and A.D. Scadden, *Tudor-SN and ADAR1 are components of cytoplasmic stress granules*. RNA, 2012. **18**(3): p. 462-71.
96. Matsuki, H., et al., *Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation*. Genes Cells, 2013. **18**(2): p. 135-46.
97. Onomoto, K., et al., *Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43031.
98. Lindquist, M.E., et al., *Respiratory syncytial virus induces host RNA stress granules to facilitate viral replication*. J Virol, 2010. **84**(23): p. 12274-84.
99. Garaigorta, U., et al., *Hepatitis C virus (HCV) induces formation of stress granules whose proteins regulate HCV RNA replication and virus assembly and egress*. J Virol, 2012. **86**(20): p. 11043-56.
100. Fung, G., et al., *Production of a dominant-negative fragment due to G3BP1 cleavage contributes to the disruption of mitochondria-associated protective stress granules during CVB3 infection*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79546.
101. Okonski, K.M. and C.E. Samuel, *Stress granule formation induced by measles virus is protein kinase PKR dependent and impaired by RNA adenosine deaminase ADAR1*. J Virol, 2013. **87**(2): p. 756-66.
102. Courtney, S.C., et al., *West Nile virus infections suppress early viral RNA synthesis and avoid inducing the cell stress granule response*. J Virol, 2012. **86**(7): p. 3647-57.
103. Kobayashi, T., et al., *PKCalpha binds G3BP2 and regulates stress granule formation following cellular stress*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35820.
104. Yu, J.H., et al., *Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body*. RNA, 2005. **11**(12): p. 1795-802.
105. Guil, S., J.C. Long, and J.F. Caceres, *hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(15): p. 5744-58.
106. Lee, Y.J., et al., *Localization of SERBP1 in stress granules and nucleoli*. FEBS J, 2014. **281**(1): p. 352-64.
107. Dewey, C.M., et al., *TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(5): p. 1098-108.
108. McDonald, K.K., et al., *TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(7): p. 1400-10.
109. Fukuda, T., et al., *hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP level during stress conditions*. Genes Cells, 2009. **14**(2): p. 113-28.
110. Quaresma, A.J., et al., *Human hnRNP Q re-localizes to cytoplasmic granules upon PMA, thapsigargin, arsenite and heat-shock treatments*. Exp Cell Res, 2009. **315**(6): p. 968-80.
111. Kedersha, N.L., et al., *RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules*. J Cell Biol, 1999. **147**(7): p. 1431-42.
112. Burry, R.W. and C.L. Smith, *HuD distribution changes in response to heat shock but not neurotrophic stimulation*. J Histochem Cytochem, 2006. **54**(10): p. 1129-38.
113. Colombrita, C., et al., *TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult*. J Neurochem, 2009. **111**(4): p. 1051-61.
114. Thomas, M.G., et al., *Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(1): p. 405-20.
115. Chang, W.L. and W.Y. Tarn, *A role for transportin in deposition of TTP to cytoplasmic RNA granules and mRNA decay*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(19): p. 6600-12.
116. Bounedjah, O., et al., *Free mRNA in excess upon polysome dissociation is a scaffold for protein multimerization to form stress granules*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(13): p. 8678-91.
117. Mahboubi, H., et al., *Identification of Novel Stress Granule Components That Are Involved in Nuclear Transport*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e68356.
118. Parker, S.J., et al., *Endogenous TDP-43 localized to stress granules can subsequently form protein aggregates*. Neurochem Int, 2012. **60**(4): p. 415-24.
119. Stoecklin, G., et al., *MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay*. EMBO J, 2004. **23**(6): p. 1313-24.
120. Fujimura, K., et al., *Identification of importin alpha1 as a novel constituent of RNA stress granules*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(7): p. 865-71.
121. Wasserman, T., et al., *A novel c-Jun N-terminal kinase (JNK)-binding protein WDR62 is recruited to stress granules and mediates a nonclassical JNK activation*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(1): p. 117-30.
122. Balzer, E. and E.G. Moss, *Localization of the developmental timing regulator Lin28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules*. RNA Biol, 2007. **4**(1): p. 16-25.

123. Bravard, A., et al., *Inactivation by oxidation and recruitment into stress granules of hOGG1 but not APE1 in human cells exposed to sub-lethal concentrations of cadmium*. *Mutat Res*, 2010. **685**(1-2): p. 61-9.
124. Henao-Mejia, J., et al., *Suppression of HIV-1 Nef translation by Sam68 mutant-induced stress granules and nef mRNA sequestration*. *Mol Cell*, 2009. **33**(1): p. 87-96.
125. Yamaguchi, A. and K. Kitajo, *The effect of PRMT1-mediated arginine methylation on the subcellular localization, stress granules, and detergent-insoluble aggregates of FUS/TLS*. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e49267.
126. Mok, B.W., et al., *The NS1 protein of influenza A virus interacts with cellular processing bodies and stress granules through RNA-associated protein 55 (RAP55) during virus infection*. *J Virol*, 2012. **86**(23): p. 12695-707.
127. Lin, J.C., M. Hsu, and W.Y. Tarn, *Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(7): p. 2235-40.
128. Athanasopoulos, V., et al., *The ROQUIN family of proteins localizes to stress granules via the ROQ domain and binds target mRNAs*. *FEBS J*, 2010. **277**(9): p. 2109-27.
129. Eisinger-Mathason, T.S., et al., *Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival*. *Mol Cell*, 2008. **31**(5): p. 722-36.
130. Baez, M.V. and G.L. Boccaccio, *Mammalian Smaug is a translational repressor that forms cytoplasmic foci similar to stress granules*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(52): p. 43131-40.
131. Zhu, C.H., et al., *SGNP: an essential Stress Granule/Nucleolar Protein potentially involved in 5.8s rRNA processing/transport*. *PLoS One*, 2008. **3**(11): p. e3716.
132. Fitzgerald, K.D. and B.L. Semler, *Poliovirus infection induces the co-localization of cellular protein SRp20 with TIA-1, a cytoplasmic stress granule protein*. *Virus Res*, 2013. **176**(1-2): p. 223-31.
133. Nikpour, P., et al., *The RNA binding protein Musashi1 regulates apoptosis, gene expression and stress granule formation in urothelial carcinoma cells*. *J Cell Mol Med*, 2011. **15**(5): p. 1210-24.
134. Carpio, M.A., et al., *The arginylation-dependent association of calreticulin with stress granules is regulated by calcium*. *Biochem J*, 2010. **429**(1): p. 63-72.
135. Lindsay, A.J. and M.W. McCaffrey, *Myosin Va is required for P body but not stress granule formation*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(13): p. 11519-28.
136. Zhang, P., et al., *IPS-1 plays an essential role in dsRNA-induced stress granule formation by interacting with PKR and promoting its activation*. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 11): p. 2471-82.
137. Carpio, M.A., et al., *Calreticulin-dimerization induced by post-translational arginylation is critical for stress granules scaffolding*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013. **45**(7): p. 1223-35.
138. Zhang, J., et al., *Dynamic association-dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules*. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 23): p. 4087-95.
139. Unsworth, H., et al., *mRNA escape from stress granule sequestration is dictated by localization to the endoplasmic reticulum*. *FASEB J*, 2010. **24**(9): p. 3370-80.
140. Linero, F.N., et al., *Junin virus infection impairs stress-granule formation in Vero cells treated with arsenite via inhibition of eIF2alpha phosphorylation*. *J Gen Virol*, 2011. **92**(Pt 12): p. 2889-99.
141. Aulas, A., S. Stabile, and C. Vande Velde, *Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP*. *Mol Neurodegener*, 2012. **7**: p. 54.
142. Tanaka, T., S. Ohashi, and S. Kobayashi, *Roles of YB-1 under arsenite-induced stress: translational activation of HSP70 mRNA and control of the number of stress granules*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1840**(3): p. 985-92.
143. Ruggieri, A., et al., *Dynamic oscillation of translation and stress granule formation mark the cellular response to virus infection*. *Cell Host Microbe*, 2012. **12**(1): p. 71-85.
144. Schwartz, J.C., et al., *FUS binds the CTD of RNA polymerase II and regulates its phosphorylation at Ser2*. *Genes Dev*, 2012. **26**(24): p. 2690-5.
145. Emara, M.M. and M.A. Brinton, *Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(21): p. 9041-6.
146. Finnen, R.L., K.R. Pangka, and B.W. Banfield, *Herpes simplex virus 2 infection impacts stress granule accumulation*. *J Virol*, 2012. **86**(15): p. 8119-30.
147. Stohr, N., et al., *ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress*. *J Cell Biol*, 2006. **175**(4): p. 527-34.

148. Raaben, M., et al., *Mouse hepatitis coronavirus replication induces host translational shutoff and mRNA decay, with concomitant formation of stress granules and processing bodies*. Cell Microbiol, 2007. **9**(9): p. 2218-29.
149. Kim, J.E., et al., *Proline-rich transcript in brain protein induces stress granule formation*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(2): p. 803-13.
150. Chernov, K.G., et al., *Role of microtubules in stress granule assembly: microtubule dynamical instability favors the formation of micrometric stress granules in cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(52): p. 36569-80.