THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Emilie ROUSSEL

Le 23 novembre 2023

Etude des mécanismes moléculaires du contrôle de la traduction en réponse au stress dans des cellules cardiaques et endothéliales lymphatiques

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **GENETIQUE MOLECULAIRE**

Unité de recherche :
I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par
Anne-Catherine PRATS et Barbara GARMY-SUSINI

Jury

Mme Pascal Romby, Rapporteure
M. Pierre Close, Rapporteur
M. Frederic Catez, Examinateur
M. Pierre-Emmanuel Gleizes, Examinateur
Mme Anne-Catherine PRATS, Directrice de thèse
Mme Barbara Garmy-Susini, Co-directrice de thèse

A toi mon papa qui ne pourras jamais lire
ce livre et qui pourtant en a été la muse

Remerciements

Il est maintenant temps de faire mes au revoir, 4 et demi après avoir franchi les portes de ce laboratoire, ma thèse s'achève et avec elle une étape de ma vie. J'espère avoir réussi le dur pari que se lance chacun d'entre nous au début d'un doctorat, à savoir d'apporter une pierre de plus à l'édifice des connaissances dans le monde des sciences de la vie. C'était une expérience extrêmement enrichissante qui n'a pu être réalisé qu'avec la collaboration et le soutien d'un grand nombre de personnes, que je souhaite remercier un à un pour leur contribution scientifique et émotionnelle.

Pour commencer, je remercie Anne-Catherine Prats qui m'a permis de pousser la porte du laboratoire en m'accueillant comme stagiaire de M2 dans son équipe et par la suite de m'avoir fait confiance et donné l'opportunité de poursuivre sur ce qui est de loin le plus difficile des challenges, le doctorat. Anne-Catherine m'a tellement fait confiance qu'elle était prête à déclarer la guerre à l'école doctorale, ils ont gagné mais qu'importe puisque grâce à la ligue contre le cancer nous sommes parvenues à nos fins. Je te remercie de m'avoir guidée et rassurée lorsque la panique (bien trop souvent) prenait le dessus sur moi. Merci pour tes conseils et la richesse de tes connaissances. Merci pour cette grande liberté de travail et d'expression et merci pour ces discussions enrichissantes sur la science et sur la vie. Enfin merci pour ton humanité et la douceur que tu incarnes, ta bienveillance et ta compréhension m'ont permis de supporter de douloureuses épreuves et de continuer malgré tout cette thèse dont je suis fière.

Merci à Barbara Garmy-Susini, ma co-directrice, pour tes conseils et pour m'avoir aidée à donner plus d'assurance et de valeurs à mes résultats à l'oral.

Je remercie mes rapporteurs, Pierre Close et Pascal Romby, qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse et pour leur retours si encourageants et bienveillants à l'égard de mon manuscrit. Je remercie également les autres membres de mon jury Frederic Catez et Pierre Emmanuel Gleizes de me faire l'honneur de leur présence lors de cette thèse à venir. Frederic, encore un immense merci pour notre collaboration ainsi que vos précieux conseils. Je remercie aussi les membres de mon comité de thèse Anne Cammas et Anthony Henras pour leur conseils lors de mes comités. Anthony, je te remercie particulièrement pour le temps et la gentillesse dont tu as fait preuve à mon égard, l'espace d'un temps j'ai autant fait partie du CBI que de l'I2MC ;). Je remercie également Edouard Bertrand et Emeline avec qui j'ai pu apprendre le smiFISH à Montpellier.

Merci aux membres de mon équipe, anciens et actuels, pour leur présence, leur soutien, leurs conseils, leurs rires. Eric, Pierre-Jean, Léna, Manon, Halyna, Roxane, Breton, Ami, Nesrine, Leila. Nath, qui plus que les autres a été obligée de subir mes périodes musicales en culture cellulaire et dans le bureau, en passant par du gros rap jusqu'à du Angèle ou du Michel Polnareff, ses années à mes côtés n'ont pas été évidentes pour elle alors un immense merci de ne pas avoir porté plainte. Ondina, merci infiniment pour ton aide précieuse et ta grande générosité, vive PyMol !

Je remercie bien évidemment mes stagiaires, Lucas, Chloé, Lola et enfin Thomas qui m'ont beaucoup aidée durant mon projet. Thomas, merci d'avoir été présent lorsque la vie et mon écriture m'en ont empêchée, je te fais une confiance aveugle et j'espère de tout cœur que tu poursuivras en thèse comme en est ton vœu. Merci pour ton travail mais surtout merci pour ton extrême bonne humeur.

Anne Claire Godet, je crois que c'est à toi que reviennent les plus grands remerciements, grâce à ton encadrement et ta gentillesse, tu m'as donné envie de poursuivre en thèse et me voilà 4 ans plus tard, notre projet achevé et moi bientôt docteur. Tu en es l'instigatrice et je te remercie mille fois d'avoir été mon mentor.

Merci à Françoise Pujol, j'aurais pu faire une thèse rien que sur toi, même si je me serais souvent répétée. Merci pour toutes ces années de fou rire et d'histoires drôles et pas drôles aussi. Merci de m'avoir appris toutes tes expressions du siècle d'avant et d'avoir toujours été une source de lumière et de joie au labo. Merci aussi à Florence Tatin pour tous ces bons moments au labo bien sûr mais aussi à la Chunga.

Les fantômes maintenant, ceux qui ne sont plus là mais qui ont fait partie de cette expérience à 100%, je veux bien sûr parler de Jean Blanchet et de Chanaelle Febrissy. Vous avez fait ma joie durant 4 ans, le laboratoire, les soirées, bien plus que des collègues, nous sommes devenus des amis et je vous suis entièrement et foncièrement reconnaissante d'avoir été à mes côtés durant ces belles années. Un autre fantôme à qui je dis un immense merci c'est celui de Justine Creff, ma deuxième maman qui m'a énormément apporté sur le plan scientifique et surtout amical.

Bien sûr je remercie celle qu'on appelle l'équipe d'à côté, particulièrement Silveric et Melissa. L'équipe anciennement 13, n'est rien sans l'équipe anciennement 9, merci d'avoir fait partie de mon aventure. Silveric, je t'adore.

Emmanuelle Marchaud, c’est à toi que revient la palme on dirait, merci infiniment, pour tout en fait. Tu as été comme tu le dis si bien le fil conducteur de toutes ces années, on se fait beaucoup de copains pendant une thèse mais ici, je me suis faite une amie, une vraie. Tu m’as aidée, soutenue, fait rire, épaulée, vu pleurer, en fait tu es de ma famille maintenant. Je te serai éternellement reconnaissante d’avoir pris ton baluchon avec moi lors de la grande migration, ce jour-là, j’ai compris que tu étais mon amie pour la vie.

Je dis merci à mes copains hors labo, qui ont su me changer les idées et me faire grandir toutes ces années, Momo, Adèle, Helmo, Thibault, Morgane, Elena, Camille.

Un grand merci à ma famille, à mes frères et sœurs, Alex, Yann, Lisa, Mathias et Margot, grâce à vous j’ai toujours fait partie d’une équipe et à toi maman d’en être la capitaine et de nous pousser toujours plus loin à réaliser nos rêves.

Enfin, merci à toi Romain, merci d’être mon pilier au quotidien et merci pour ton amour sans faille.

Resumé

L'angiogenèse et la lymphangiogenèse jouent un rôle majeur dans le développement et l'aggravation de nombreuses pathologies. Elles sont induites en réponse à l'hypoxie tumorale et favorisent la dissémination métastatique. Les traitements anticancéreux peuvent quant à eux engendrer une dysfonction lymphatique. Ces deux processus sont au contraire bénéfiques dans l'ischémie du myocarde où ils contribuent à restaurer l'apport sanguin et à diminuer l'inflammation. La formation de nouveaux vaisseaux est gouvernée par l'action de facteurs de croissance des familles VEGFC (Vascular Endothelial Growth Factors) et FGF (Fibroblast Growth Factor). L'expression de ces facteurs de croissance est régulée au niveau traductionnel en réponse à différents stress par des structures de leur ARNm, les IRES (Internal Ribosome Entry Sites) qui leur permettent de continuer à être traduits malgré le blocage exercé sur la traduction dépendante de la coiffe. L'activité des IRES est contrôlée par des facteurs appelés ITAF (IRES *trans*-acting factors).

Dans le premier volet de ces travaux, nous avons étudié le rôle des paraspeckles et du long ARN non codant Neat1 dans la régulation de la traduction IRES-dépendante en réponse au stress hypoxique dans des cardiomyocytes murins HL1. Les paraspeckles sont des corps nucléaires qui se forment en réponse au stress hypoxique. Ces corps se composent de nombreuses protéines qui s'articulent autour du long ARN Neat1 qui en forme le squelette. Plusieurs protéines qui le composent ont été identifiées comme ITAF, suggérant un rôle du paraspeckle dans la traduction IRES-dépendante. Par des expériences de déplétion, nous avons identifié Neat1 comme un régulateur clé de l'activité des IRES des ARNm des facteurs de croissance angiogéniques et lymphangiogéniques alors que deux protéines du paraspeckle, $p54^{nrb}$ et PSPC1, régulent des sous-groupes d'IRES. L'interactome de P54nrb étudié par spectrométire de masse a permis d'identifier deux autres ITAF : La protéine ribosomique RPS2 et la nucléoline. Nous avons montré par hybridation in situ que Neat1 et l'ARNm portant l'IRES du FGF1 interagissent en condition d'hypoxie suggérant un recrutement des ARNm portant un IRES par le paraspeckle. Ces nouveaux résultats nous ont amenés à l'hypothèse que les paraspeckles sont une plateforme d'assemblage de l'IREsome. Ce complexe ribonucléoprotéique se formerait dans le noyau et serait ensuite exporté dans le cytoplasme pour permettre la traduction IRES-dépendante.

Dans le second volet de mes travaux, je me suis focalisée sur l'identification de ribosomes spécialisés responsables de la traduction IRES-dépendante lors du stress. Le modèle choisi est la cellule endothéliale lymphatique, située au cœur des processus de lymphangiogenèse physiologique et pathologique. Nous avons montré que les IRES des ARNm du VEGFC et FGF1 sont activés en réponse au stress du réticulum endoplasmique, et au stress génotoxique provoqué par un agent de chimiothérapie anticancéreuse, la doxorubicine. Nous avons analysé la composition des polysomes de

cellules endothéliales soumises à ces stress en spectrométrie de masse, et montré que cette composition varie différentiellement pour ces deux stress. La protéine RPL13A est plus abondante dans les polysomes lors du stress du RE, alors que la RPL26 augmente dans les polysomes de cellules traitées doxorubicine. D'autre part nous avons réalisé des expériences de RiboMethSeq qui ont permis d'identifier plusieurs sites de méthylation des ARN ribosomiques issus des polysomes, qui sont eux aussi impactés différentiellement par les deux stress. L'impact de RPL13A et RPL26 ainsi que des méthylations de l'ARNr sur la traduction IRES-dépendante est actuellement en cours d'étude.

Abstract

Angiogenesis and lymphangiogenesis play a major role in the development and aggravation of several pathologies. They are induced in response to tumor hypoxia and promote metastatic dissemination. Lymphatic dysfunction can result from cancer treatments. However, both processes are beneficial in myocardial ischemia, where they help to restore blood flux and reduce inflammation. New vessel formation is governed by the action of growth factors of the vascular endothelial growth factors (VEGF) and FGF (Fibroblast Growth Factor) families. Expression of these growth factors is regulated at the translational level in response to various stresses by mRNA structures, internal ribosome entry sites (IRESs), which enable them to continue to be translated despite the blockade of cap-dependent translation. IRES activity is controlled by IRES trans-acting factors (ITAFs). In the first part of this work, we investigated the role of paraspeckles and of the long non-coding RNA Neat1 in the regulation of IRES-dependent translation in HL-1 murine cardiomyocytes submitted to hypoxic stress. Paraspeckles are nuclear bodies formed in response to hypoxia. These bodies are composed of several proteins that are articulated around the long Neat1 RNA that forms their skeleton. Several paraspeckle proteins have been identified as ITAFs, suggesting a role for paraspeckle in IRES-dependent translation. Using depletion experiments, we have identified Neat1 as a key regulator of the IRES activity of angiogenic and lymphangiogenic growth factor mRNAs, while two paraspeckle proteins, p54nrb and PSPC1, regulate IRES subgroups. The P54nrb interactome studied by mass spectrometry has led us to identification of two other ITAFs: the ribosomal protein RPS2 and nucleolin. We have showed by in situ hybridization that Neat1 and the mRNA carrying the FGF1 IRES interact under hypoxic conditions, suggesting the recruitment of IRES-containing mRNAs into paraspeckle. These new results led us to hypothesize that paraspeckles are a platform for IREsome assembly. This ribonucleoprotein complex would be formed in the nucleus and then exported to the cytoplasm to enable IRES-dependent translation. In the second part of my work, I focused on the identification of specialized ribosomes responsible for IRES-dependent translation during stress. The chosen model has been the lymphatic endothelial cell, as the core of physiological and pathological lymphangiogenesis processes. We have shown that the IRESs of VEGFC and FGF1 mRNAs are activated in response to endoplasmic reticulum stress, and to genotoxic stress induced by an anticancer chemotherapy agent, doxorubicin. We analyzed the composition of polysomes from endothelial cells subjected to these stresses by mass spectrometry, and have shown that ribosome composition varies differentially for these two stresses. RPL13A protein is more abundant in polysomes under ER stress, while RPL26 increases in polysomes from doxorubicin-treated cells. RiboMethSeq experiments have allowed us to identify several methylation sites in polysome-derived ribosomal RNAs, which are also differentially

impacted by the two stresses. The impact of RPL13A and RPL26 as well as of rRNA methylations on IRES-dependent translation is currently under investigation.

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
eIF	eukaryotic initiation factor
GTP	guanosine tri phosphate
m7G	7-Methylguanosine
PABP	Poly(A)-binding protein
UTR	untranslated region
RPS	ribosomal proteins
GDP	guanosine di phosphate
CT	complexe ternaire
FBL	fibrillarine
PIC	preInitiation complex
ORF	open reading frame
PTC	peptidyl transferase center
eRF	eukaryotic release factor
RBP	RNA binding protein
ITAF	IRES trans-acting factor
IRES	internal ribosome entry site
UPR	unfolded protein response
RE	reticulum endoplasmique
XBP1	X box-binding protein 1
HIF	hypoxia inductible factor
HRE	hypoxia inductible element
VEGF	vascular endothelial growth factor
PERK	PKR-like Reticulum Endoplasmic Kinase
HRI	Heme Regulatory Inhibitor
PKR	Protein Kinase R
4E-BP	eIF4E Binding Protein
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
uORF	upstream open reading frame
PV	poliovirus
EMCV	encephalomyocarditis virus
PTB	polypyrimidine tract binding protein 1
FMDV	foot and mouth desease virus
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
APAF-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
HOX	homeobox
FGF1	fibroblast growth factor
MDM2	mouse double minute 2
IGF1R	insulin-like growth factor receptor
Unr	upstream of N-ras
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
RBM4	RNA-binding motif
TRMP	a p53-inducible long noncoding RNA
G3BP1	GTPase SH3 stress granule assembly factor1
LLPS	liquide-liquide phase separation
CSM	Corps sans membrane
RNP	ribonucleoprotein complex
snoRNP	small nucleolar RNAs RNP
NEAT1	nuclear enriched abundant transcript 1
PSPC1	paraspeckle Component 1
CFIm	cleavage factor Im complex
SFPQ	splicing factor, proline- and glutamine-rich
DBHS	Drosophila behaviour human splicing
snoARN	small nucleolar ARN
ITS	internal transcribed sequence
ETS	external transcribed sequence)
SSU	small subunit
LSU	large subunit
2'-O-me	2'-O-méthylations
HL-1	HL-1cardiac muscle cell line
RAP	ribosomal associated protein
DBA	Diamond-Blackfan anemia
DC	Dyskeratose congenitale
DKC1	Dyskerine
mCSE	cellule souche embryonnaire murine
OGFOD1	2-Oxoglutarate And Iron Dependent Oxygenase Domain Containing 1
FMRP	Fragile X mental retardation protein
DDX	Dead-Box helicase
NPM1	Nucleophosmin
RMS	RiboMetSeq
CEL	cellule endothelial lymphatique
DOX	Doxorubicin
HX	hypoxia
TM	Tunicamycin
NX	Normoxia
PCR	polymerase chain reaction
NOPS	NONA/paraspeckle
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
VASH	V asohibin-1
RRM	RNA recognition motif
PKR	protein kinase R
PERK	PKR-like reticulum endoplasmic (RE) kinase
PGF	platelet growth factor
NMD	nonstop mediated decay
HRI	heme regulatory inhibitor
EJC	exon junction complex
HDLEC	human dermal lymphatic endothelial cell

Table des matières

Table des matières **17**

Introduction ***1***

Partie 1 : La régulation de la traduction en réponse au stress **1**

1. La régulation de la traduction en réponse au stress 1
   1.1. Les étapes de la traduction 3
      1.1.1. Initiation m7G 3
      1.1.2. Élongation 9
      1.1.3. Terminaison 10
   1.2. La régulation de la traduction en réponse au stress 13
      1.2.1. Les stress cellulaires 14
      1.2.2. Le blocage de l'initiation de la traduction canonique par le stress 23
      1.2.3. Régulation sélective de la traduction en cas de stress 26
2. Les IRES et leur ITAF dans la réponse au stress 29
   2.1. Les IRES 30
      2.1.1. Découverte et historique 30
      2.1.2. Les IRES viraux 30
      2.1.3. Les IRES cellulaires 34
   2.2. Processus physiopathologiques impliquant une modulation de la traduction par le mécanisme IRES-dépendant 39
      2.2.1. Processus physiologiques impliquant les sites d'entrée interne des ribosomes 39
      2.2.2. La traduction IRES-dépendante en réponse au stress et dans les processus pathologiques 40
   2.3. Les facteurs régulateurs des IRES : acteurs clés de la réponse au stress 43
      2.3.1. Un ITAF pour plusieurs IRES et plusieurs ITAF pour un IRES 44
      2.3.2. Mécanismes d'actions des ITAF 47

Partie 2 : Neat1 et les paraspeckles : régulateurs de l'expression génique en réponse au stress **53**

1. Les corps sans membrane dans le contrôle de l'expression génique : zoom sur les paraspeckles 53
   1.1. Les corps sans membrane : des régulateurs de l'expression génique en réponse au stress 53
      1.1.1. Les corps sans membrane cytoplasmiques 54
      1.1.2. Les corps nucléaires sans membranes 55
2. Les paraspeckles et leur découverte 56
   2.1. La composition des paraspeckles 56
      2.1.1. Le long ARN non codant Neat1 : squelette du paraspeckle 57
      2.1.2. Les protéines du paraspeckle 61
   2.2. Assemblage et structure des paraspeckles 64
      2.2.1. Organisation des paraspeckles : coeur, coque, patch 64
      2.2.2. La biogenèse des paraspeckles et la séparation en phase liquide-liquide 65
   2.3. Rôle des paraspeckles dans la réponse au stress 66
      2.3.1. Rôle dans le contrôle de l'expression génique 66
      2.3.2. Rôle des paraspeckles et de Neat1 dans les processus physiologiques 68
      2.3.3. Rôle des paraspeckles dans les processus pathologiques et la réponse au stress 69

Partie 3 : L'hétérogénéité ribosomique : vers une spécialisation du ribosome en réponse au stress **75**

1. Le ribosome 75
   1.1. Biogenèse des ribosomes 75
      1.1.1. Le nucléole 78
      1.1.2. Synthèse des ARNr 79
      1.1.3. Maturation des ARN ribosomiques 79
      1.1.4. Synthèse des protéines ribosomiques 87
      1.1.5. Assemblage, maturation et export du ribosome 88
   1.2. Régulation de la biogenèse 89
2. De l'hétérogénéité ribosomique aux ribosomes spécialisés dans la réponse au stress et leur rôle dans les pathologies 90
   2.1. Un peu d'histoire 91

2.2. L'hétérogénéité des composants protéiques du ribosome : rôles physiologiques et pathologiques 93
2.2.1. Composition en protéines ribosomiques 93
2.2.2. L'hétérogénéité par les modifications post-traductionnelles des protéines ribosomiques 97
2.2.3. L'hétérogénéité apportée par les RAP 99
2.2.4. Rôle de la composition du ribosome dans la traduction IRES-dépendante 100
2.3. Hétérogénéité des ARNr : rôle dans les processus rôle physiologiques et pathologiques 100
2.2.1. Les modifications des ARNr sont constitutives ? 102
2.2.3. Les modifications des ARNr ne sont pas constitutives 102

Partie 4 : Les facteurs de croissance angiogéniques et lymphangiogéniques dans la réponse aux stress induits par les pathologies vasculaires 109

1. Les pathologies associées aux systèmes vasculaires sanguin et lymphatique 109
1.1. Les systèmes vasculaires et la formation de nouveaux vaisseaux 110
1.1.1. Vaisseaux sanguins et angiogenèse 110
1.1.2. Vascularisation lymphatique et lymphangiogenèse 112
1.2. Pathologies associées aux dysfonctions vasculaires 114
1.2.1. Les cancers 115
1.2.2. L'ischémie cardiaque 117
2. Les facteurs de croissances (lymph)angiogéniques et leur régulation par la traduction IRES-dépendante en réponse au stress 119
2.1. Les facteurs de la famille des FGF, IRES et ITAF associés 119
2.1.1. FGF1 120
2.1.2. FGF2 121
2.2. Les facteurs de la famille des VEGF, IRES et ITAF associés 123
2.2.1. VEGFA 124
2.2.2. VEGFC 125
2.2.3. VEGFD 125
2.4. Thérapeutique basée sur la modulation des processus angiogéniques et lymphangiogéniques 126

Problématique et objectifs de la thèse 129

Résultats 131

Chapitre 1 : L'ARN non codant Neat1 et les composants du paraspeckle sont des régulateurs de la traduction durant l'hypoxie 131

Chapitre 2 : La composition ribosomique est modifiée différentiellement par le stress génotoxique et le stress du réticulum endoplasmique dans les cellules endothéliales lymphatiques 169

Chapitre 3 : Modifications des 2'-O-méthylations des ARNr en réponse au stress dans les HDLEC 190

Discussion 215

Matériels et méthodes 231

Annexes 242

Bibliographie 307

Table des figures

Figure 1	**Schéma d'un ARN de transfert**	**4**
Figure 2	**Schéma d'un ribosome**	**5**
Figure 3	**Formation du complexe de pré-initiation 43S**	**6**
Figure 4	**Initiation de la traduction eucaryote canonique**	**12**
Figure 5	**Éléments régulateurs de la traduction**	**13**
Figure 6	**Le stress du réticulum endoplasmique**	**19**
Figure 7	**Mécanisme de stabilisation ou déstabilisation du facteur HIF en normoxie ou hypoxie hypoxie**	**21**
Figure 8	**La réponse intégrée au stress conduit à la phosphorylation d'eIF2-α**	**24**
Figure 9	**Mécanismes d'initiation de la traduction IRES-dépendante pour les 4 types d'IRES**	**34**
Figure 10	**Mécanismes d'action des ITAF**	**48**
Figure 11	**Modèle de biogenèse des paraspeckles**	**60**
Figure 12	**Structure « Patch-cœur-coque » du paraspeckle**	**65**
Figure 13	**Biogenèse des ribosomes**	**77**
Figure 14	**Organisation d'un nucléole**	**78**
Figure 15	**Les différentes voies de clivage des ARNr**	**81**
Figure 16	**snoRNP à boîte H/ACA**	**83**
Figure 17	**snoRNP à boîte C/D**	**85**
Figure 18	**Hétérogénéité ribosomique**	**108**
Figure 19	**Organisation schématique des systèmes vasculaires sanguins et lymphatiques**	**110**
Figure 21	**Voies angiogéniques.**	**111**
Figure 22	**Régulation moléculaire de la lymphangiogenèse**	**113**
Figure 23	**Le stress cellulaire induit la phosphorylation de eIF2α dans les HDLEC**	**172**
Figure 24	**Le stress cellulaire induit un blocage de la traduction globale dans les cellules endothéliales lymphatiques.**	**173**
Figure 25	**Les niveaux protéiques du facteur de croissance VEGFC sont maintenus malgré le blocage de la traduction par le stress**	**175**
Figure 26	**Le stress cellulaire induit l'activité IRES du VEGFC dans les cellules endothéliales lymphatiques.**	**177**
Figure 27	**Le stress cellulaire induit l'activité IRES du FGF1 dans les cellules endothéliales lymphatiques.**	**178**
Figure 28	**Modification du Ribo-interactome en réponse au stress induit par la doxorubicine et la tunicamycine**	**180**
Figure 29	**Effet de la déplétion de RPL13A sur l'activité des IRES de l'ARNm du FGF1 et du VEGFC**	**183**
Figure 30	**Effet de la surexpression de RPL13A sur l'activité des IRES du FGF1 et du VEGFC**	**185**
Figure 31	**Impact de la déplétion de DHX9 sur la traduction IRES-dépendante de l'ARNm FGF1**	**188**
Figure 32	**Profil de 2'-O-méthylation des ARNr dans les HDLEC**	**193**
Figure 33	**Profils polysomiques après traitement doxorubicine ou tunicamycine**	**195**
Figure 34	**Méthylation des sites de la grande sous-unité (LSU) après traitement doxorubicine**	**197**
Figure 35	**Méthylations des sites de la petite sous-unité (SSU) après traitement doxorubicine**	**198**
Figure 36	**Méthylations des sites de la grande sous-unité (LSU) après traitement tunicamycine**	**199**
Figure 37	**Méthylations des sites de la petite sous-unité (SSU) après traitement tunicamycine**	**200**
Figure 38	**Regroupement des sites de méthylation**	**202**
Figure 39	**Regoupement hiérarchique des sites de méthylation**	**203**

Figure 40	**Représentation des 18 sites les plus variables**	**205**
Figure 41	**Expression des snoARN guides**	**207**
Figure 42	**Distribution des 18 résidus ribose-méthylés sur les modèles 3D des sous-unités ribosomales humaines en réponse à la doxorubicine**	**209**
Figure 43	**Distribution des 18 résidus ribose-méthylés sur les modèles 3D des sous-unités ribosomales humaines en réponse à la tunicamycine**	**210**

Introduction

Partie 1 : La régulation de la traduction en réponse au stress

Dans leur interaction constante avec le milieu environnant, les organismes sont confrontés à un certain nombre de facteurs de stress tels que les chocs thermiques, l'hypoxie ou encore le stress génotoxique. La capacité à s'adapter et à survivre dans ces conditions est une exigence fondamentale de tous les organismes. En fonction de la nature et de l'intensité du stress, les cellules mettent en place différents mécanismes de survie ou de réparation, tels que la réponse au choc thermique ou à l'hypoxie, aux protéines mal repliées ou encore aux lésions à l'ADN (acide désoxyribonucléique). Au niveau cellulaire, les réponses au stress impliquent essentiellement des régulations complexes de l'expression des gènes qui intéressent à la fois la biologie fondamentale et la médecine moléculaire.

1. La régulation de la traduction en réponse au stress

L'expression au sens littéral correspond à ce par quoi quelque chose se manifeste ; on désigne donc l'ensemble des processus qui conduisent à la synthèse d'une protéine ou d'un ARN (acide ribonucléique) fonctionnel par le terme « d'expression génique ». En effet, notre ADN renferme un code génétique, qui est lu et transcrit en un ARN non codant ou bien un ARN codant qui sera traduit en protéine, ces derniers sont donc de ce fait l'expression, la manifestation de ce code. Les protéines sont essentielles, elles jouent un rôle fondamental dans l'ensemble des processus biologiques, elles sont impliquées dans la structure et la fonction des cellules, elles sont indispensables pour le développement et la reproduction des organismes vivants, et sont donc par extension indispensables à la vie. Ce sont des macromolécules composées d'une chaîne d'acides aminés spécifiques, dont la taille et l'ordre d'enchaînement sont définis par le code génétique et déterminent le rôle de la protéine. Afin de générer ces protéines fonctionnelles, l'expression génique comprend plusieurs étapes notamment la transcription et la traduction.

La transcription est le processus par lequel L'ADN contenu dans les noyaux cellulaires est utilisé pour synthétiser une molécule d'ARN. La transcription est réalisée par des enzymes appelées ARN polymérases, ces enzymes vont venir transcrire (recopier par complémentarité de bases) le brin d'ADN appelé « brin non codant » ou « brin matrice » ; l'ARN portera alors l'information du brin opposé « le brin codant ». Chez les eucaryotes, il existe trois ARN polymérases différentes : l'ARN polymérase I qui transcrit les ARN ribosomiques (ARNr), l'ARN polymérase II qui transcrit les ARN messagers (ARNm) codants des protéines et des ARN non codants tels que les snoARN ou encore les longs ARN non codants, et enfin l'ARN polymérase III qui transcrit l'ARN ribosomique 5S et les ARN de transfert (ARNt). Nous ne détaillerons pas davantage la transcription pour nous intéresser bien plus en profondeur aux mécanismes qui régissent la synthèse protéique, qui font l'objet de mon travail de thèse.

La traduction est le processus par lequel les informations contenues dans les ARN messagers sont décodées pour synthétiser une protéine spécifique. Ce sont les ribosomes qui sont en charge de ce décodage. Ces complexe RNP (ribonucléoprotéiques) vont « lire » l'ARNm et assurer la formation de la chaîne d'acides aminés correspondante. Lors de la traduction l'ARNm est « lu » par les ribosomes par triplets nucléotidiques appelés codons. Chaque codon correspond à un acide aminé spécifique. Certains acides aminés sont codés par plusieurs codons, c'est ce qu'on appelle la dégénéresence du code génétique. Pour chaque codon, un ARN de transfert (ARNt) portant l'acide aminé correspondant se lie au codon par appariement complémentaire de bases. Les ribosomes catalysent la formation des liaisons peptidiques entre les acides aminés successifs et permettent la formation de la chaîne peptidique.

La traduction se déroule en trois grandes étapes qui débutent par la phase d'initiation correspondant à la liaison de la machinerie de traduction (le ribosome) sur l'ARNm et à la reconnaissance d'un codon initiateur, s'ensuit la phase d'élongation qui est caractérisée par le déplacement du ribosome le long de l'ARNm afin de le lire et de synthétiser la chaîne d'acides aminés et enfin la terminaison qui consiste en un relargage du ribosome et du polypeptide. Nous allons détailler ci-dessous le mécanisme d'initiation de la traduction canonique dit « coiffe-dépendant ».

1.1. Les étapes de la traduction

1.1.1. Initiation m7G

Un ARNm eucaryote typique comprend une séquence codante qui dirige la synthèse des protéines, flanquée de régions 5′ et 3′ non traduites (UTR). Dans le modèle canonique d'initiation de la traduction dépendante de la coiffe, la petite sous-unité du ribosome est recrutée sur une base modifiée à l'extrémité 5′ de l'ARNm (la coiffe m7G). Ce processus est contrôlé par un complexe de facteurs d'initiation eucaryotes (eIF) appelé eIF4F qui se lie à la coiffe. EIF4F est composé de : eIF4G, une grande protéine d'échafaudage qui facilite les interactions entre les protéines et la petite sous-unité ribosomique ; eIF4E, qui reconnaît la structure de la coiffe m7G de l'ARNm 5′-terminal ; et eIF4A, une hélicase de l'ARN qui déroule les structures secondaires de l'ARN. L'interaction de la protéine de liaison au poly(A) (PABP) avec eIF4G et eIF4B circularise l'ARNm et stabilise le complexe. Le complexe ternaire comprenant l'ARNt (ARN de transfert) initiateur qui porte une méthionine, le facteur eIF2 et du GTP est alors recruté. Le ribosome chargé de ces facteurs parcourt le 5′UTR jusqu'à ce qu'il reconnaisse un codon d'initiation, AUG, qui déclenche l'hydrolyse de l'eIF2-GTP, le découplage de l'ARNt de l'eIF2 et la libération des facteurs d'initiation. Le recrutement de la grande sous-unité ribosomique a alors lieu et l'élongation de la traduction commence.

L'initiation de la traduction chez les eucaryotes est un mécanisme très consommateur d'énergie et, contrairement à ce que l'on peut trouver chez les procaryotes, fait intervenir un nombre important de facteurs, précisément 12 facteurs d'initiation, des ARN de transfert, les ribosomes et enfin le substrat de tout ce processus, l'ARN messager. Avant de décrire l'initiation en détail, définissons tout d'abord les acteurs principaux de cette synthèse : les ribosomes et les ARN de transfert.

Les ARN de transfert

Les ARN de transfert sont de petits ARN en forme de trèfle dont la taille est comprise entre 70 et 90 nucléotides (nt) de long. Leur fonction est de transporter les acides aminés correspondants aux codons spécifiques de l'ARNm pendant la traduction. Ils sont composés d'une séquence appelée « anticodon » située dans la boucle de l'ARNt qui va venir s'apparier avec son codon complémentaire sur l'ARNm. A leur extrémité 3', on retrouve l'acide aminé correspondant au duplex codon/anticodon. Il existe exactement 61 ARNt différents mais ils ne sont pas tous présents dans la même cellule. En effet la

première base de l'anticodon peut correspondre à plusieurs bases, on appelle ce phénomène l'appariement de Wobble. Il sert à pallier en partie la disparité du nombre de codons (61) et d'acides aminés, cela permet d'économiser le nombre d'ARNt requis pour la traduction du code génétique en permettant à un seul ARNt de reconnaître plusieurs codons synonymes (Crick, 1968). Le codon initiateur de la traduction canonique le plus couramment utilisé est un AUG ce qui correspond à une méthionine. Il peut cependant y avoir de l'initiation autour d'autres codons comme CUG, ACG, UUG et GUG. (Figure 1). Les ARN de transfert sont fortement modifiés au niveau de leurs bases et de leurs riboses, ce qui permet de générer un large éventail de structures d'ARNt différentes. Les modifications sont principalement des 2'-O-méthylations et des pseudouridylations. Ces modifications sont importantes pour la structure mais aussi pour la fidélité de traduction (Gu et al., 2014). Elles jouent un rôle dans la reprogrammation traductionnelle dans le cadre de cancer. En effet il a été mis en évidence que les modifications des ARNt sont importantes pour le décodage de codon spécifiques durant la traduction. Chez l'homme, l'enzyme qui catalyse les modifications des ARNt sur la base U34 de wooble favorise la survie et la résistance aux thérapies des cellules de mélanome en modulant spécifiquement la traduction de HIF1 α de façon codon-spécifique (Rapino et al., 2018).

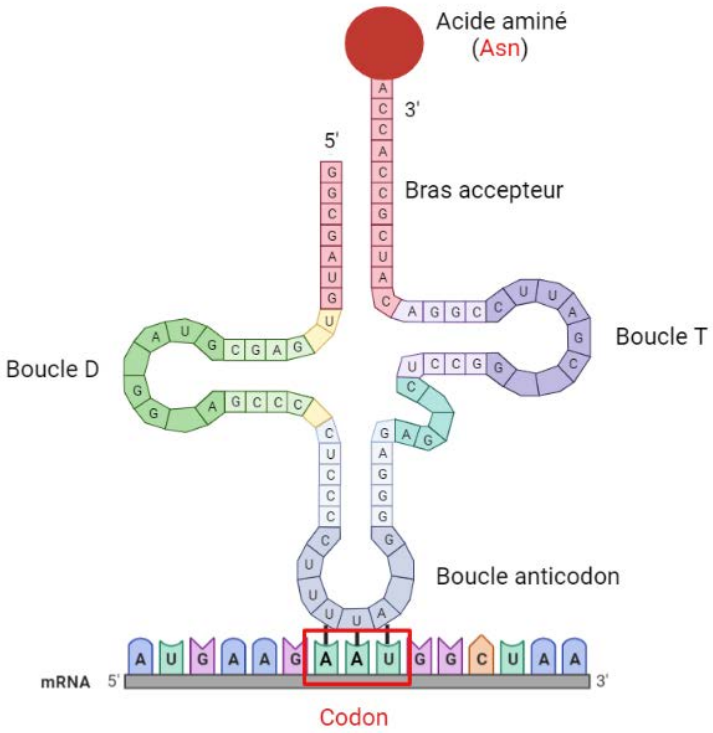


Figure 1 : Schéma d'un ARN de transfert. Les ARN de transfert sont constitués de 5 régions : le bras accepteur qui se trouve en 3' et sur lequel l'acide aminé est fixé par une liaison ester. La boucle de l'anticodon qui s'associe au codon correspondant sur l'ARNm. La boucle D permet la fixation de l'acide aminé sur l'ARNt et enfin la boucle T qui permet à l'ARNt de se fixer sur le site A du ribosome. L'excroissance sur la droite correspond à une région variable. Les cases vides correspondent à des nucléotides modifiés.

Les ribosomes

Les ribosomes sont les « machines » de la traduction, ils possèdent la capacité à décoder l'information portée par chaque ARNm et de générer la protéine correspondante. Ce sont des complexes ribonucléoprotéiques composés de deux sous-unités : une petite sous-unité de 40S (S pour Svedberg correspond au coefficient de sédimentation) composée de 33 protéines ribosomiques (RPS) et d'un ARN ribosomique (ARNr) le 18S, et une grande sous unité de 60S composée de 47 RPS et de trois ARNr (28S, 5,8S et 5S). L'ARNm se trouve au niveau de la fente qui sépare les deux sous-unités (Figure 2). Les ribosomes sont des ribozymes, c'est-à-dire que les ARN qu'ils contiennent sont pourvus d'une activité catalytique. La petite sous-unité porte l'activité de décodage de l'ARN. La grande sous-unité permet la formation de la liaison peptidique entre les acides aminés. Les deux sous-unités possèdent à leur interface trois sites de liaison pour les ARNt : le site A (amynoacyl) où est fixé un ARNt par reconnaissance codon/anticodon, le site P (peptidyl) où se trouve un ARNt dont l'acide aminé va être lié à la chaine peptidique, puis le site E (exit) qui permet le relargage de l'ARNt qui n'est plus lié à son acide aminé. Le ribosome est donc au centre du processus de traduction, nous détaillerons son origine et sa complexité dans la partie 3.

L'initiation de la traduction se déroule en une série d'étapes impliquant différents facteurs d'initiation de la traduction (eIFs pour *eukaryotic initiation factors*), qui permettront à l'ARNt initiateur (ARNt-Met) sous forme de complexe ternaire de se lier à la petite sous-unité du ribosome qui va balayer la molécule d'ARNm jusqu'à reconnaître le codon initiateur. Ces nombreuses étapes donnent lieu à plusieurs mécanismes régulateurs de l'efficacité de la traduction, c'est pourquoi la régulation de la traduction se fait principalement lors de la phase d'initiation.

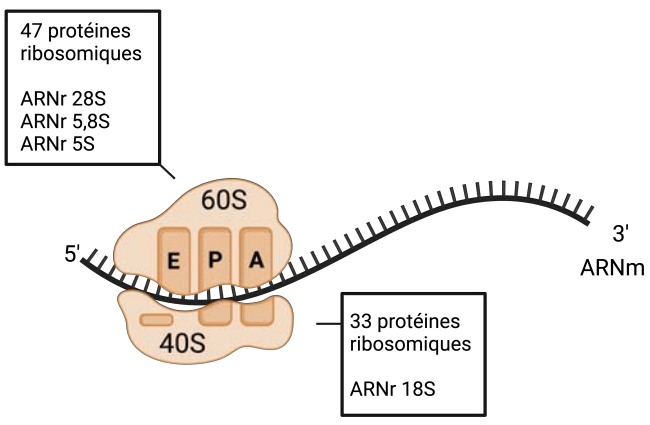


Figure 2 : Schéma d'un ribosome. Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique composé de deux sous-unités : la grande sous-unité 60S qui est composée de 47 protéines et de trois ARN ribosomiques (28S, 5,8S et 5S) et une petite sous-unité 40S composée de 33 protéines ribosomiques et d'un ARNr 18S.

Formation du complexe de pré-initiation 43S (PIC)

La traduction commence par la formation de ce que l'on appelle le complexe de pré-initiation ou PIC ou 43S. Ce dernier se compose du complexe ternaire (CT) associé à la sous unité 40S du ribosome. La toute première étape est la formation du complexe CT. Ce complexe comprend le facteur d'initiation eIF2 lié au GTP ainsi que l'ARNt initiateur (ARNt-Met). Le facteur eIF2 est une « G » protéine, c'est-à-dire qu'il a la capacité à lier le GDP/GTP. L'ARNt-Met à une forte affinité pour eIF2 seulement lorsque ce dernier est lié au GTP. C'est le facteur d'échange eIF2B qui, en promouvant la dissociation du GDP sur eIF2, l'active et permet ainsi la liaison du eIF2-GTP du Met-tRNA pour former le CT. eIF2-GDP est rarement seul : il est associé à eIF5, un facteur qui permet de stabiliser la liaison de eIF2 au GDP et ainsi prévenir un relargage spontané du GDP. Donc eIF2B déplace eIF5 du eIF2-GDP avant de réaliser l'échange nucléotidique avec le GTP (Jennings and Pavitt, 2010; Kapp and Lorsch, 2004; Merrick and Pavitt, 2018; Pavitt et al., 1998). Par la suite, trois facteurs supplémentaires, eIF3, eIF1 et eIF1A vont intervenir afin de recruter le CT à la sous-unité 40S (Majumdar et al., 2003; Olsen et al., 2003). Leur fixation à la sous-unité 40S induit son changement conformationnel et favorise le recrutement du CT. eIF1 se lie à la sous-unité 40S près du site P et du canal ARNm (Aylett et al., 2015). eIF1A se lie au niveau du centre de décodage. Les deux facteurs ont pour fonction de contrôler le bon appariement codon/anticodon pendant le balayage. Le troisième facteur, eIF3, est un gros complexe formé de plusieurs sous-unités qui promeut également la liaison du CT au 40S (Figure 3)(Merrick and Pavitt, 2018).

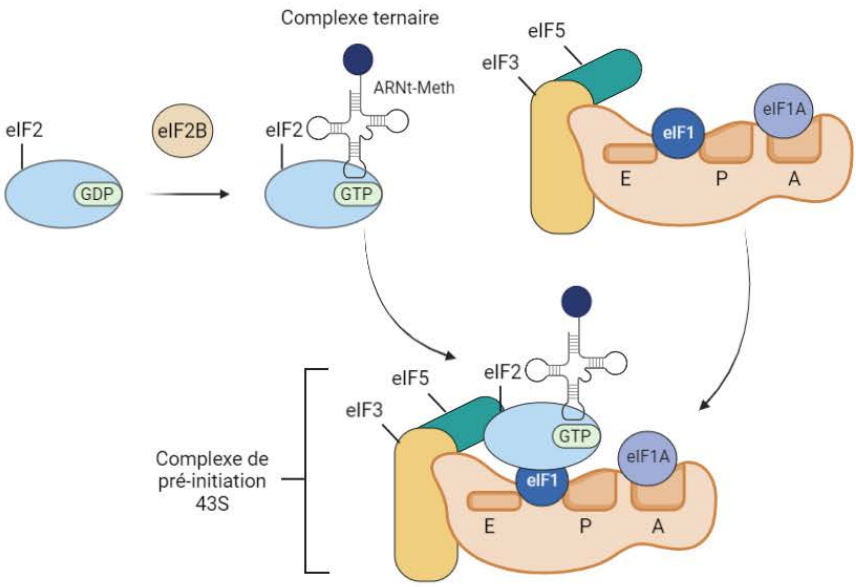


Figure 3 : Formation du complexe de pré-initiation 43S. Le facteur eIF2B réalise l'échange du GDP en GTP. eIF2 associé au GTP a une forte affinité pour l'ARNt initiateur. L'eIF2 associé au GTP forme le complexe ternaire qui va s'associer avec la petite sous-unité du ribosome, elle-même associée aux facteurs eIF3, eIF5, eIF1 et eIF1A. Cet assemblage forme le complexe de pré-initiation 43S.

Recrutement du PIC 43S à la coiffe

Une fois le PIC 43S construit, l'étape suivante consiste à recruter l'ARNm. Ce recrutement se fait par l'intermédiaire de eIF4F sur la coiffe. La coiffe, que l'on appelle aussi 5'-cap ou 5'- m^7G, est une guanosine méthylée en position N7 à l'extrémité 5' des ARNm. Cette modification est introduite de manière co-transcriptionnelle par des enzymes spécifiques et joue plusieurs rôles : d'une part elle protège l'ARNm de la dégradation par les nucléases, d'autre part elle permet le recrutement de la machinerie de traduction dans le cytoplasme en vue de la synthèse protéique. Le facteur eIF4F est un complexe formé de eIF4E, eIF4G et eIF4A. eIF4E est le facteur de reconnaissance majeur de la coiffe (Gross et al., 2003) ainsi qu'un facteur de contrôle traductionnel important de par sa disponibilité qui peut être limitée (nous détaillerons ce phénomène dans la partie plus tard). L'ARNm est « activé » par la fixation de eIF4F au niveau de la m^7G cap et de la protéine de liaison à la queue poly(A) (PABP) en 3'. Tout d'abord eIF4E se fixe à la coiffe et à la protéine eIF4G qui possède des sites de liaison pour eIF4E. EIF4G interagit aussi avec la protéine PABP ce qui circularise l'ARNm en formant une boucle fermée entre la coiffe et la queue poly(A) (Prats et al., 2020). Par la suite, le facteur eIF4A se lie au facteur eIF4G. EIF4A est une ARN hélicase membre de la famille des DEAD-box hélicases, elle est capable de lier l'ATP et joue un rôle à la fois dans l'activation de l'ARNm et dans le balayage. Son rôle dans l'activation de l'ARNm est de dérouler les structures secondaires de l'ARNm et ainsi de faciliter le recrutement du complexe 43S et son futur balayage de l'ARNm (Kumar et al., 2016; Merrick, 2015). L'activité de l'hélicase eIF4A est renforcée par le recrutement de eIF4B (Figure 4). Certains ARNm ont un 5'UTR très long et/ou très structuré et nécessite donc une puissance d'hélicase plus importante qui peut prendre la forme de concentrations accrues d'eIF4A ou d'eIF4B ou l'implication d'une variété d'autres hélicases à ARN, notamment DHX29 chez les mammifères (Pisareva et al., 2008). À l'heure actuelle, on n'a pas clairement déterminé si ces autres hélicases fonctionnent de manière totalement indépendante ou en tant que partenaire/sous-unité de l'un des facteurs d'initiation. C'est par l'interaction entre eIF3 qui se trouve dans le 43S et les facteurs eIF4G et eIF4B qui se trouvent sur l'ARNm, que le complexe de pré-initiation 43S va se fixer sur la coiffe de façon stable (Jackson et al., 2010; Villa et al., 2013). eIF3 permet également de stabiliser la liaison de l'ARNm au niveau du tunnel d'entrée et de sortie de la sous-unité ribosomique (Aitken et al., 2016, p. 3). Lorsque le PIC est fixé sur la coiffe avec eIF4F, on parle alors de complexe 48S.

Balayage du PIC et reconnaissance du codon AUG

Les ARNm ont des séquence « leader » en 5′, généralement appelés régions 5′ non traduites (5′UTR), qui couvrent la distance entre la coiffe m7G et le codon d'initiation de l'ORF (open reading frame) principal. Les 5′UTR varient en longueur, en séquence et en structure. Le PIC une fois fixé va donc commencer le balayage de l'ARNm dans la direction 5'-3' à partir de la coiffe à la recherche d'un codon initiateur. Le PIC est entraîné par l'hélicase eIF4A par hydrolyse de l'ATP. En général, le codon AUG le plus proche de la coiffe m7G est utilisé pour initier la synthèse des protéines, mais il y a des exceptions. Le codon doit être entouré d'un bon contexte nucléotidique afin de servir de codon initiateur. Chez les mammifères, la séquence GCCPuCCAUGG, généralement appelée séquence consensus de Kozak, favorise la reconnaissance de l'AUG. Dans cette séquence, le nucléotide purine (Pu = A ou G) en position -3 et le G en position +4 sont les plus importants (tous deux par rapport au A de l'AUG, désigné par +1)(Kozak, 1989). Pour reconnaître un codon d'initiation AUG, l'anticodon Met-tRNAi au sein du PIC de balayage doit s'apparier avec l'ARNm et signaler cette interaction aux facteurs associés dans le PIC. Ces événements de signalisation entraînent des changements de conformation du PIC qui le font passer d'une conformation "ouverte" à une conformation "fermée", dans laquelle les interactions modifiées entre les composants entraînent la libération de eIF1, eIF2-GDP et eIF5 du PIC (Cheung et al., 2007; Unbehaun et al., 2004). Durant le balayage et tant que l'appariement codon-anticodon n'est pas fait, eIF1 et eIF1A qui se trouvent près du centre de décodage dans le site A s'assurent de garder le ribosome dans cette forme ouverte en déstabilisant le duplex codon/anticodon non apparié et en empêchant l'ARNt initiateur de venir se loger dans le site P. Après la reconnaissance de l'AUG, un certain nombre de réarrangements s'opèrent qui permettent de passer à la conformation fermée ; l'ARN de transfert initiateur est alors repositionné et établit l'appariement codon/anticodon avec l'ARNm. Durant le balayage, le GTP lié au facteur eIF2 est hydrolysé en GDP + phosphate et le phosphate n'est libéré que lorsque le codon AUG est reconnu. Cette hydrolyse est permise grâce à eIF5, précisément le résidu Arg15 du facteur (Das and Maitra, 2001). Des analyses structurales montrent également que le facteur eIF3 est dissocié après le relargage de eIF2-GDP (Simonetti et al., 2016).

Le recrutement de la sous-unité 60S

Les sous-unités 40S et 60S se lient naturellement l'une à l'autre, spécialement quand il y a une concentration élevée d'ion magnésium. La libération du facteur eIF2 permet de laisser la place pour la liaison du facteur eIF5B aidée par la rétention du facteur eIF1A (Olsen et al., 2003). eIF5B est une

GTPase importante pour le recrutement de la 60S. Le facteur eIF5B-GTP est recruté afin de faciliter le recrutement de la sous-unité 60S et son hydrolyse entraînant un fort changement de conformation du facteur, ce qui permet de positionner correctement l'ARNt-Met dans le site P (Fernández et al., 2013; Kuhle and Ficner, 2014). Le relargage de eIF5B-GDP et eIF1A permet la formation d'un 80S attaché à l'ARNm avec un ARNt-Met dans le site P et un site A vacant, prêt à initier l'élongation de la traduction.

1.1.2. Élongation

Le complexe 80S est désormais en place au niveau du site d'initiation, l'ARNt initiateur est lié au site P. Le second codon de l'ORF est positionné dans le site A et attend l'arrivée d'un ARNt chargé (aminoacétylé). Le facteur d'élongation eEF1A est activé par liaison avec une GTP et forme un complexe ternaire en se fixant à l'ARNt chargé et ce complexe va ensuite entrer dans le site A du ribosome. L'appariement de base entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt va induire l'hydrolyse du GTP par le facteur eEF1A. Le complexe eEF1A-GDP est relâché tandis que l'ARNt reste logé dans le site A (Dever et al., 2018). Après ça, la formation de la liaison peptidique avec l'ARNt qui se trouve dans le site P arrive rapidement. En effet, le changement de conformation du ribosome entraîne un mouvement des ARNt qui met en contact l'extrémité 3' de l'ARNt présent dans le site A et l'ARNt présent dans le site P et permet la liaison peptidique. Le centre peptidyl transférase (PTC) est composé d'ARNr porté par la sous-unité 60S, sa principale fonction étant de positionner correctement le substrat (ARNm) pour la catalyse. Le facteur eEF5A aide à positionner le substrat dans le PTC, en interagissant avec le bras accepteur de l'ARNt qui se trouve dans le site P (Doerfel et al., 2015). Durant la formation de la liaison peptidique, le peptide naissant est transféré de l'ARNt du site P à l'ARNt du site A. Après la formation de la liaison peptidique, les ARNt vont être déplacés par le ribosome à cheval entre plusieurs sites P/E et A/P, cette position hybride place les bras accepteurs des ARNt dans les sites P et E et les boucles de l'anticodon dans les sites P et A respectivement (Behrmann et al., 2015; Moazed and Noller, 1989). Ces mouvements sont dus au facteur eEF2 qui est une GTPase. eEF2-GTP stabilise l'état hybride et promeut l'hydrolyse du GTP. Les mouvements engendrés par les changements conformationnels induits de eEF2-GDP et la libération du phosphate déverrouillent le ribosome et permettent de déplacer l'ARNt qui porte le peptide dans le site P et l'ARNt désacétylé dans le site E (Ermolenko and Noller, 2011; Ramrath et al., 2013). Le site A quant à lui est vacant et disponible pour la liaison d'un autre ARNt aminoacétylé en complexe avec eEF1A. eEF1A avant de

pouvoir réinitier, un autre cycle doit être réactiver, c'est-à-dire être de nouveau lié à un GTP. C'est la GTPase eEF1B qui permet cette conversion. eEF1A-GDP est à nouveau prêt à lier un ARNt chargé et à réinitier un autre évènement d'élongation (Gromadski et al., 2007).

1.1.3. Terminaison

La terminaison de la traduction a lieu lorsque le ribosome atteint la fin de la séquence codante et qu'un codon stop entre dans le site A (UAA, UGA ou UAG). Aucun ARNt ne reconnait ces codons. Chez les eucaryotes, la terminaison est catalysée par deux facteurs protéiques, eRF1 et eRF3 (Alkalaeva et al., 2006). eRF1 est responsable de la reconnaissance du codon stop et de l'hydrolyse de l'ARNt qui porte le polypeptide. Il a une forme d'ARNt et est composé de trois domaines, le domaine N-terminal reconnaît le codon stop par une boucle distale avec un motif très conservé qui permet de décoder les codons terminaux par une interaction similaire à celle codon/anticodon (Song et al., 2000). Le domaine du milieu « M » de eRF1 a une fonction analogue à l'extrémité acceptrice de l'ARNt, il s'étend dans le PTC afin de promouvoir la libération du ribosome et du polypeptide par hydrolyse. Enfin son extrémité C-terminal est impliquée dans l'interaction avec le facteur de libération eRF3 (Cheng et al., 2009). eRF3 est quant à elle une GTPase qui favorise la libération des peptides et l'efficacité de terminaison aux codons stop de manière GTP-dépendante (Alkalaeva et al., 2006). La dissociation du GTP de eRF3 est ralentie par la fixation de eRF1, qui est de ce fait un inhibiteur de cette activité. Le complexe ternaire eRF1-eRF3-GTP s'engage dans le ribosome et déclenche l'hydrolyse du GTP ce qui permet de placer le domaine M d'eRF1 dans le PTC (Dever and Green, 2012). Le ribosome sera par la suite recyclé. Le recyclage est le processus qui se produit lorsque la chaîne polypeptidique est libérée. Le complexe de post-terminaison qui en résulte (post-TC) est recyclé par la dissolution du ribosome, qui est médiée par ABCE1. Cette étape est suivie par la libération de l'ARNt désacétylé et de l'ARN messager (ARNm) de la sous-unité 40S (Dever and Green, 2012). Le recyclage permet aux ribosomes et aux ARNm de participer à plusieurs cycles de traduction.

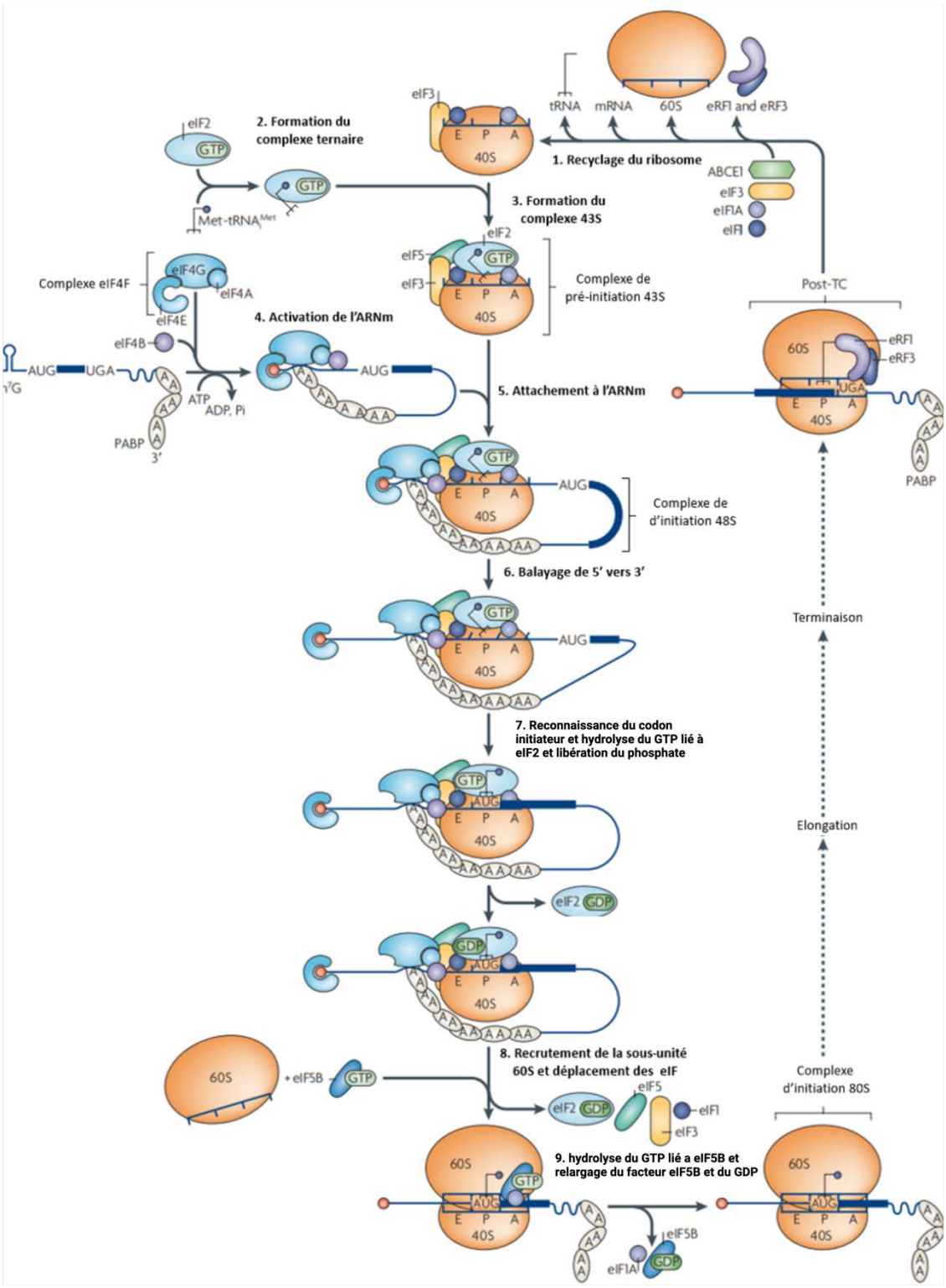

tRNA
mRNA
60S
eRF1 and eRF3
eIF3
40S
1. Recyclage du ribosome
ABCE1
eIF3
eIF1A
eIF1
eIF2
GTP
2. Formation du complexe ternaire
Met-tRNA$_i^{Met}$
3. Formation du complexe 43S
eIF5
Complexe de pré-initiation 43S
Complexe eIF4F
eIF4G
eIF4A
eIF4E
eIF4B
4. Activation de l'ARNm
AUG
UGA
ATP
ADP, Pi
PABP
5. Attachement à l'ARNm
Post-TC
eRF1
eRF3
Complexe de d'initiation 48S
6. Balayage de 5' vers 3'
Terminaison
7. Reconnaissance du codon initiateur et hydrolyse du GTP lié à eIF2 et libération du phosphate
Elongation
GDP
8. Recrutement de la sous-unité 60S et déplacement des eIF
+eIF5B
Complexe d'initiation 80S
9. hydrolyse du GTP lié a eIF5B et relargage du facteur eIF5B et du GDP

Figure 4 : Initiation de la traduction eucaryote canonique. La voie canonique de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes est divisée en huit étapes (**2-9**). Ces étapes suivent le recyclage des complexes issu des complexes de post-terminaison (post-TCs ; 1) pour obtenir des sous-unités ribosomiques 40S et 60S séparées, et aboutissent à la formation d'un complexe d'initiation ribosomique 80S dans lequel le tARN-Met est apparié au codon d'initiation dans le site P du ribosome et qui est capable de démarrer l'étape d'élongation de la traduction.Ces étapes sont les suivantes : (**2**) La formation du complexe ternaire qui comprend le facteur (eIF2)-GT et le tARN-Met ; (**3**) La formation du complexe 43S comprenant une sous-unité 40S, eIF1, eIF1A, eIF3, eIF2-GTP- tARN-Met et eIF5; (**4**) l'activation de l'ARNm, au cours de laquelle la région proximale de la coiffe de l'ARNm est déroulée de manière dépendante de l'ATP par eIF4F avec eIF4B. (**5**) L'attachement du complexe 43S à cette même région sur l'ARNm ; (**6**) Le balayage du 48S dans le sens 5' vers 3' ; (**7**) La reconnaissance du codon initiateur par le complexe, qui induit une transition du complexe vers une conformation « fermée » et entraîne le déplacement de eIF1, afin de permettre à eIF5 de réaliser l'hydrolyse de eIF2-GTP en eIF2-GDP et le relargage du phosphate ; (**8**) Recrutement de la sous-unité 60S et déplacement de eIF2-GDP et des autres eIF. Ce recrutement est médié par eIF5B; (**9**) Hydrolyse de eIF5B-GTP en eIF5B-GDP et relargage de eIF1A. Par la suite, l'élongation à lieu, puis la terminaison qui conduit au recyclage du ribosome. Le recyclage permet de récupérer à nouveau des sous-unités libres. (Adapté de V. Pestova, 2010)

Outre les facteurs de traduction canoniques qui régulent les trois étapes de la traduction, il existe un nombre croissant de trans-régulateurs qui n'appartiennent pas au cœur de la machinerie traductionnelle, mais qui interagissent avec elle pour moduler l'efficacité de la traduction de sous-ensembles d'ARNm. Les facteurs trans-régulateurs comprennent les RBP (RNA Binding Protein), les facteurs qui régulent la traduction IRES-dépendante : les ITAF (IRES *trans*-acting factor)(nous aborderons en détail cette notion un peu plus loin dans le manuscrit), les miARN ou les lncARN. Les séquences cis-régulatrices sont principalement localisées dans les régions 5′ non traduites (5′UTR) et 3′ non traduites (3′UTR) de l'ARNm (Jackson et al., 2010; Leppek et al., 2018). Ces éléments en *cis* des ARNm permettent une liaison directe avec les *trans*-régulateurs et contribuent par conséquent à moduler l'efficacité traductionnelle de l'ARNm correspondant. Parmi les éléments en *cis*, on peut retrouver des sites de liaison pour les RBP, des séquences de liaison spécifiques comme les séquences riches en AU (ARE), les G-quadruplex, les IRES (internal ribosome entry site) qui seront au cœur de ce sujet de thèse et donc seront détaillés dans les parties qui vont suivre. Il existe également d'autres types d'éléments en *cis* qui ne sont pas des sites de liaison, comme les uORF (upstream open reading frame) qui permettent de moduler la sélectivité de l'AUG, les 5'TOP (5′-terminal oligopyrimidine tracts), les translation inhibitory elements (TIE), pyrimidine-rich translational elements (PRTE) et cytosine-enriched regulators of translation (CERT). Des modifications chimiques comme les m6A peuvent aussi contribuer à moduler la traduction en recrutant des facteurs *trans* (Figure 5). Certains de

ces éléments seront décrits avec plus d'attention dans la partie qui va suivre sur la régulation de la traduction en réponse au stress.

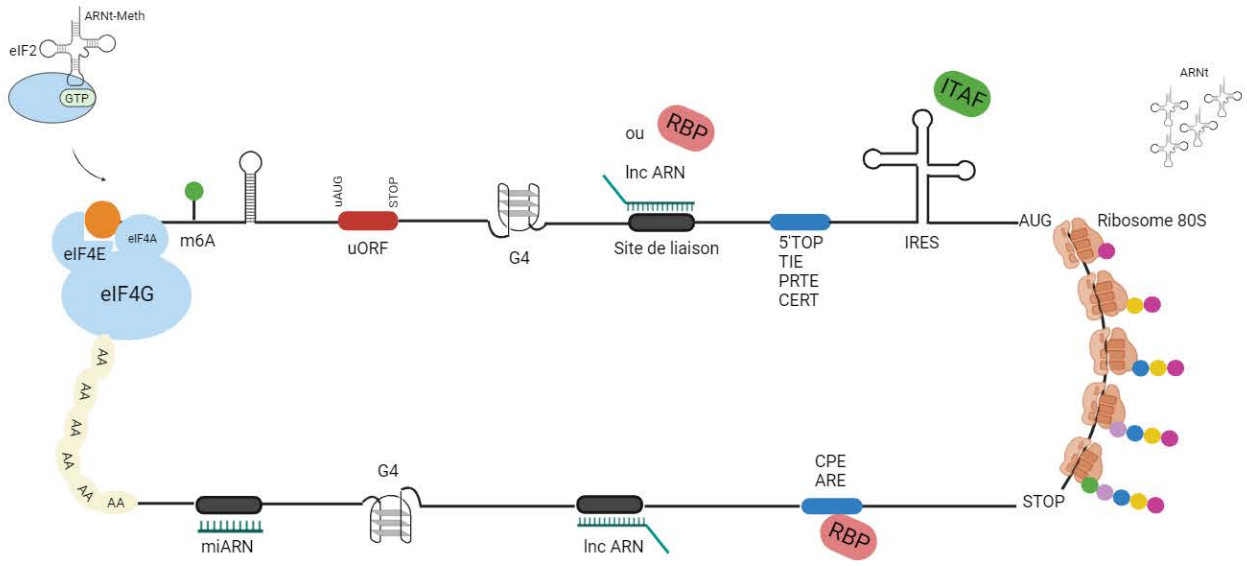


Figure 5 : Eléments régulateur de la traduction. La régulation repose sur des éléments en *cis* présents dans l'ARNm et facteurs en *trans* (RBP, ITAF). Les éléments en *cis* comprennent les uORF, les G-quadruplex (G4), les sites de liaison pour des RBP ou des ARN tel que les longs ARN non codants ou les miARN, ou encore des sites d'entrée interne des ribosomes (les IRES). Les facteurs agissant en *trans* vont interagir avec les éléments en *cis* afin de les moduler, ils comprennent les protéines de liaison à l'ARN (RBP), les ARN non codants régulateurs et également les facteurs qui régulent la traduction IRES-dépendante (les ITAF). Tous ces éléments agissent de concert afin de moduler la traduction et de réguler la traduction de messagers spécifiques.

1.2. La régulation de la traduction en réponse au stress

Les protéines sont les « bêtes de somme » des cellules et régissent la plupart des processus cellulaires, y compris les mécanismes de réparation ; il est donc compréhensible que leurs niveaux d'expression soient étroitement régulés pendant les réponses au stress cellulaire. La synthèse des protéines peut être modulée à différentes étapes de l'expression génique, du remodelage de la chromatine à la traduction. Les études comparatives d'expression en transcriptomique et en protéomique montrent un manque de corrélation entre le niveau d'ARNm et celui de protéines

correspondantes pour de nombreux gènes, ce qui suggère une régulation post-transcriptionnelle importante pour ces gènes. La traduction est l'étape finale du flux d'informations génétiques et contribue considérablement aux variations du pool de protéines. Par rapport à la synthèse de novo des ARNm, à leur traitement et à leur transport vers le cytoplasme, la régulation traductionnelle à partir d'un ARNm préexistant permet des changements rapides dans le pool de protéines. Ce type de régulation est essentiel, en particulier lorsque les cellules sont exposées à des facteurs de stress qui nécessitent des modifications immédiates de la physiologie cellulaire (Holcik and Sonenberg, 2005a). La synthèse des protéines consomme la plus grande partie de l'énergie (50% environ) des ressources cellulaires, de sorte que la traduction est généralement réprimée dans la plupart des conditions de stress. En tant qu'étape limitant la vitesse de traduction, l'initiation est un processus complexe impliquant le chargement du ribosome, le balayage et la sélection du codon de départ avant l'engagement de l'élongation. C'est l'étape qui fait intervenir le plus d'acteurs et la plus longue et c'est donc à ce niveau que la cellule possède le plus de leviers pour réguler la traduction. Malgré l'inhibition de la traduction mise en place en réponse au stress, des sous-ensembles d'ARNm peuvent contourner l'inhibition générale et être traduits de manière sélective. La plupart de ces ARNm codent des protéines de réponse au stress, qui protègent les cellules contre les dommages et facilitent la récupération après le stress. Un certain nombre de stress, notamment la privation en nutriments, le choc thermique, les dommages à l'ADN, l'hypoxie ou encore le stress du réticulum endoplasmique, peuvent entraîner ces changements dans les schémas d'expression génique en causant un arrêt de la traduction générale et une reprogrammation de la synthèse protéique. Cette reprogrammation entraîne un recrutement sélectif des ribosomes sur les messagers qui codent des protéines nécessaires pour répondre au type de stress induit. Ce recrutement sélectif de l'ARNm est contrôlé par des éléments de séquence discrets qui se trouvent dans les 5′ et 3′ UTR de nombreux ARNm, et par des protéines qui se lient à ces séquences. Un mode important de régulation de la traduction pendant le stress est le recrutement sélectif des ARNm par l'intermédiaire des IRES.

Dans la partie qui va suivre, je détaillerai les voies qui se mettent en place afin de bloquer la traduction canonique aux profits de moyens d'initiation alternatifs donnant lieu à une reprogrammation traductionnelle.

1.2.1. Les stress cellulaires

Le stress cellulaire fait référence à l'état de déséquilibre ou de perturbation de l'homéostasie d'une cellule en réponse à des conditions défavorables ou à des facteurs de stress. Ces facteurs de stress

peuvent être de nature physique, chimique, biologique ou environnementale et peuvent inclure : le **stress oxydatif** provoqué par un excès de radicaux libres dans la cellule ce qui entraîne des dommages lipidiques, protéiques et nucléiques. **Le stress thermique** qui résulte d'une exposition à des températures extrêmes, soit trop élevées, soit trop basses. **Le stress mécanique** dû à une tension physique, une compression ou toute autre force mécanique appliquée sur la cellule. **Le stress du réticulum endoplasmique** induit par des anomalies dans le repliement des protéines ou leur accumulation excessive dans le réticulum. **Le stress infectieux** résultant d'une infection par des agents pathogènes, tel que les virus, des bactéries, des parasites etc. **Le stress génotoxique** lié à des mutations ou des altérations de l'ADN, il résulte de l'exposition à des agents génotoxiques tels que des produits chimiques, des rayonnements ionisants, des agents cancérigènes, des radicaux libres ou des toxines environnementales. **Le stress hypoxique** correspond à une condition dans laquelle les cellules ou les tissus sont confrontés à un manque d'oxygène.

Lorsque la cellule est soumise à un de ces stress, elle tente de s'adapter et de survivre en activant des mécanismes de réponse au stress qui peuvent inclure la régulation de la réponse inflammatoire, l'activation de protéines chaperonnes pour aider au bon repliement des protéines etc. Si le stress est modéré et de courte durée, la cellule peut se rétablir et revenir à un état d'homéostasie. En revanche si le stress persiste ou devient trop intense, cela peut entraîner des dommages cellulaires importants pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire. Les stress cellulaires jouent un rôle important dans le développement et la progression de diverses pathologies. Les mécanismes de réponse au stress peuvent être bénéfiques car il aide la cellule à faire face à des conditions défavorables ou préjudiciables car ils peuvent entraîner des dommages cellulaires ou des maladies. La compréhension de ces mécanismes induits en réponse au stress cellulaire est cruciale pour la recherche : cela permet de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à certaines pathologies et ainsi de développer des thérapies pour protéger les cellules des dommages causées par le stress et favoriser leur survie dans des conditions de stress.

Durant ma thèse je me suis tout particulièrement intéressée à trois types de stress : le stress hypoxique, le stress du réticulum endoplasmique et le stress génotoxique. Nous accorderons donc dans ce manuscrit une attention particulière à ces stress et aux réponses qu'ils engendrent.

Le stress du réticulum endoplasmique

Le RE joue un rôle majeur dans la synthèse, le repliement et la maturation structurelle de plus d'un tiers de toutes les protéines fabriquées dans la cellule (Schwarz and Blower, 2016). En particulier,

presque toutes les protéines destinées à résider dans le RE, la membrane plasmique, l'appareil de Golgi et les lysosomes sont traduites par des ribosomes liés à la membrane du RE et entrent dans la lumière du RE. De même, la plupart des protéines qui sont finalement sécrétées par la cellule commencent leur voyage dans le RE. Les protéines destinées au RE possèdent une séquence d'adressage N-terminale qui les dirige vers la membrane du RE pendant leur synthèse. Une fois la formation du polypeptide terminée, ces protéines sont transloquées dans la lumière du RE et en même temps la séquence de signal au RE est supprimée par une protéase. Une fois dans la lumière du RE, les protéines doivent être repliées dans leur forme tridimensionnelle et subir diverses modifications post-traductionnelles, notamment la glycosylation et la formation de liaisons disulfures. Ces processus sont catalysés par d'abondantes enzymes résidant dans le RE, telles que les chaperons, les enzymes glycosylantes et les oxydoréductases. En outre, le milieu ionique et électronique du RE est idéalement adapté à ces activités de repliement des protéines. Comparé au cytosol, le RE maintient une concentration en calcium beaucoup plus élevée et un potentiel redox plus oxydant. Les cellules dépensent de grandes quantités d'énergie pour maintenir l'environnement et les fonctions du RE. Malgré ce système bien rodé, le taux d'erreur est très important, puisque seulement 20% des protéines sont correctement repliées. Les formes mal repliées sont dégradées par la cellule par un système de contrôle-qualité du nom de ERAD (ER-associated degradation). Dans ce cas, les protéines sont évacuées vers le cytosol pour être ubiquitinylées et prises en charge par le protéasome (Oakes and Papa, 2015).

La capacité de repliement des protéines dans le RE varie considérablement d'un type cellulaire à l'autre. Les cellules qui secrètent beaucoup de protéines ont un RE plus développé. Par exemple, les cellules β du pancréas sécrètent jusqu'à 1 million de molécules d'insuline par minute (Scheuner and Kaufman, 2008). En revanche, les cellules qui ne sécrètent pas régulièrement de grandes quantités de protéines conservent leurs ressources en maintenant un RE relativement petit avec une capacité de repliement des protéines limitée. Le stress du RE correspond à un état où la capacité de repliement des protéines du RE est dépassée. De nombreux types de perturbation peuvent entraîner un stress du RE : la privation en nutriments, l'hypoxie, les mutations dans les protéines sécrétées, la perte de l'homéostasie calcique, la surproduction de protéines virales lors de l'infection par des virus etc. La cellule a mis en place un système de récupération en cas de stress du RE afin de garantir la survie, ce système se nomme UPR (unfolded protein response) (Hetz, 2012). L'UPR adaptative a pour fonction de préserver l'homéostasie des protéines et de soutenir la survie des cellules grâce à plusieurs mécanismes qui améliorent le repliement des protéines, réduisent la surcharge protéique et améliorent la dégradation des protéines mal repliées grâce à la reprogrammation de l'expression génétique et à l'inhibition de la traduction. La voie UPR est très conservée. Les voies de base de l'UPR chez les

mammifères consistent en trois cascades de signalisation principales initiées par les capteurs protéiques transmembranaires du RE: IRE1α (inositol-requiring enzyme 1α), PERK (pancreatic endoplasmic reticulum kinase) et ATF6 (activating transcription factor 6) (Wang and Kaufman, 2012). Dans des conditions basales, ces protéines transmembranaires sont maintenues dans un état inactif grâce à l'interaction avec la protéine chaperonne du RE, BIP (également connue sous le nom de GRP78), et fonctionnent comme des capteurs et des effecteurs pour le stress du RE. Ces trois facteurs sont tous ancrés dans la lumière du RE, ce qui leur permet de détecter les protéines mal repliées. En cas de stress du réticulum endoplasmique, la réponse UPR est induite afin de préserver l'homéostasie des protéines et de promouvoir la survie des cellules. Une accumulation accrue de protéines dépliées ou mal repliées entraîne la liaison de la protéine BIP aux protéines mal repliées accumulées dans le RE, ce qui entraîne la libération des capteurs de l'UPR que sont la protéine PERK, le facteur de transcription ATF6 et la protéine IRE1α, ainsi que l'initiation des cascades de signalisation respectives. Pour IRE1α et PERK, leur activation passe par une dimérisation et une autophosphorylation (Hetz et al., 2020; Wang and Kaufman, 2012). (Figure 6).

La signalisation UPR à travers PERK : PERK activée entraîne la phosphorylation de la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 entraînant une atténuation transitoire de la synthèse protéique (nous détaillerons cette voie juste après). Cette inhibition limite l'accumulation de protéines dans le RE en empêchant l'afflux de protéines nouvellement synthétisées. En même temps, eIF2-α phosphorylé induit la traduction de messagers spécifiques qui possèdent des cadres de lecture ouverts dans leur 5'UTR (nous détaillerons ce mécanisme par la suite également) (Dever et al., 1992; Lu et al., 2004; Vattem and Wek, 2004). L'un des ARNm dont la traduction est induite code ATF4, un facteur de transcription qui active l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie redox, le métabolisme des acides aminés, la traduction, l'apoptose et l'autophagie. ATF4 participe également à une boucle de rétroaction dans laquelle eIF2-α est déphosphorylé par la protéine GADD34 (Jousse et al., 2003; Novoa et al., 2001).

La signalisation UPR à travers IRE1α : IRE1α qui est une kinase/endoribonucléase s'oligomérise et s'autophosphoryle pour déclencher son activité RNase pendant le stress du RE (Zhou et al., 2006). IRE1α va exciser un petit intron de 26 nucléotides présent sur l'ARNm qui code le facteur de transcription XBP1 (X box-binding protein 1). Cet épissage, qui se fait grâce à un motif consensuel CUGCAG, ce qui induit un décalage de phase du cadre de lecture ouvert codant XBP1 (Calfon et al., 2002). Il entraîne l'expression de la forme active du facteur de transcription, XBP1s (XBP1 spliced),

qui régule à la hausse les gènes impliqués dans la translocation, le repliement et la sécrétion des protéines du RE ainsi que la dégradation des protéines mal conformées (Hetz et al., 2020).

La signalisation UPR à travers ATF6 : En cas de stress du RE, ATF6 passe du RE à l'appareil de Golgi où il est clivé par la protéase S1P (protéase site-1) afin de libérer un fragment contenant le facteur de transcription bZIP (basic leucine zipper), qu'on appelle aussi ATF6p50, qui se déplace vers le noyau afin d'induire l'expression de ses gènes cibles (Haze et al., 1999). Il active des gènes codant des chaperonnes du RE et des enzymes qui favorisent la translocation, le repliement, la maturation et la sécrétion des protéines du RE, ainsi que la dégradation des protéines mal repliées (Shoulders et al., 2013; Wu et al., 2007). De plus, ATF6p50 et XBP1s favorisent la biogenèse du RE et de l'appareil de Golgi afin d'augmenter la capacité de sécrétion en cas de stress.

Au cours de la dernière décennie, les lésions cellulaires secondaires au stress chronique du RE ont été de plus en plus impliquées dans la physiopathologie d'un large éventail de maladies humaines prévalentes. Par exemple, le stress du RE et la signalisation soutenue de l'UPR ont été bien documentés dans les tissus affectés par le diabète, la neurodégénérescence, les accidents vasculaires cérébraux, la fibrose pulmonaire, les infections virales, les troubles inflammatoires, le cancer et les maladies cardiaques.

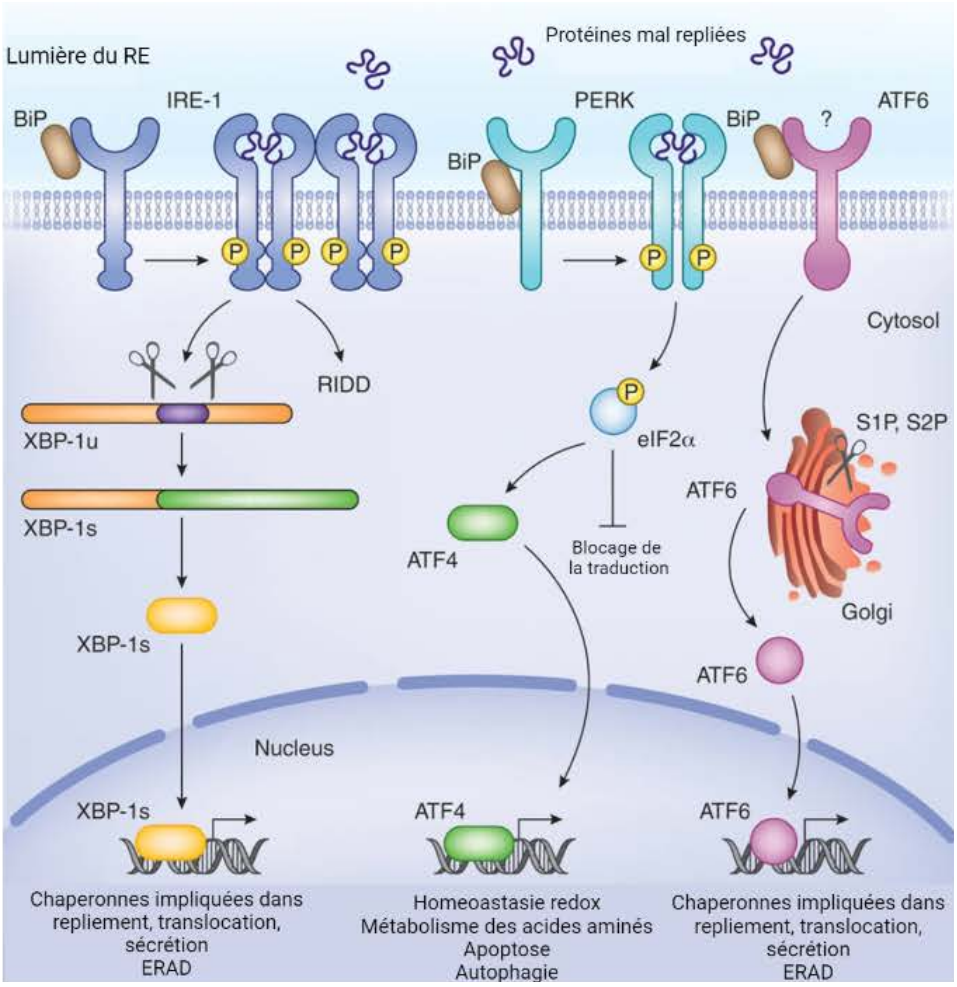


Figure 6 : Le stress du réticulum endoplasmique. IRE-1 et PERK sont activés par oligomérisation et *trans*-phosphorylation lors de la liaison de protéines mal repliées et de la libération de la chaperonne BiP. Le domaine endonucléase d'IRE-1 clive l'ARNm codant XBP-1 durant l'épissage non conventionnel qui génère l'ARNm codant la forme active XBP-1s. L'activité endonucléasique d'IRE-1 contribue également à la RIDD (Regulated IRE1-Dependent Decay) la dégradation des ARNm recrutés par les ribosomes dans le RE. PERK phosphoryle eIF2α, ce qui entraîne une inhibition transitoire de la traduction des protéines. Certains ARNm ayant de petits cadres de lecture ouverts en amont dans leur région 5′ non traduite échappent à l'arrêt de la traduction. Le plus important d'entre eux est l'ARNm codant ATF4. ATF4 déclenche à son tour l'expression de CHOP (the C/EBP Homologous Protein), de GADD34 et d'autres facteurs importants pour le métabolisme des acides aminés et le contrôle de l'oxydoréduction. ATF6 est activé lors de la libération de BiP et est transloqué vers le Golgi, où il subit un clivage séquentiel et l'élimination de son domaine luminal. Le domaine de transactivation restant d'ATF6 se déplace vers le noyau et coordonne l'expression des gènes codant pour des molécules impliquées dans les voies des chaperons ou la biosynthèse des lipides (Adapté de N Lambrecht et al, 2014).

Le stress hypoxique

Les conditions hypoxiques apparaissent dans les tissus lorsque l'oxygène n'est pas librement disponible dans tout le corps. Cet environnement, dans lequel une concentration d'oxygène modérément faible est maintenue par rapport à l'atmosphère (appelée normoxie physiologique), reflète l'état normal de l'oxygène dans chaque tissu et chaque cellule. En revanche, à haute altitude et dans des conditions pathologiques telles que l'ischémie, les cellules et les tissus sont privés d'oxygène, ce qui entraîne des conditions d'hypoxie sévère. Les organismes doivent réagir correctement à ces conditions pour survivre. La réponse hypoxique est un processus systémique qui régule de multiples activités cellulaires afin de maintenir l'homéostasie dans des conditions hypoxiques. Cette réponse améliore l'apport d'oxygène en augmentant le nombre de globules rouges ou de vaisseaux sanguins, modifie le métabolisme énergétique, augmente la motilité cellulaire et permet ainsi l'adaptation des cellules et la prévention de leur mort. La réponse hypoxique protège contre les stress, mais favorise la progression de la maladie dans certaines conditions pathologiques. Les conditions hypoxiques apparaissent dans les maladies et les conditions ischémiques, telles que les accidents vasculaires cérébraux, les crises cardiaques, les cancers et les maladies inflammatoires. La réponse hypoxique facilite la survie des cellules cancéreuses et induit leur invasion et leur métastase, ce qui conduit à un mauvais pronostic (Muz et al., 2015). Un changement important du schéma de l'expression génique se met en place en situation d'hypoxie. Au niveau transcriptionnel, cette réponse est contrôlée par le facteur de croissance hypoxique HIF (*Hypoxia Inductible Factor*) (Nakayama and Kataoka, 2019). Au niveau traductionnel, l'hypoxie est capable d'induire une diminution drastique de la synthèse protéique. Une famille d'enzymes appelées oxygénase dépendante du 2-oxoglutarate (2-OG) nécessite la présence d'O_2 pour fonctionner et constitue donc une famille de senseurs du stress hypoxique. Parmi ces senseurs, les prolyl-hydroxylases PHD ont été très bien caractérisées. Ces enzymes régulent négativement la stabilité du facteur de transcription HIF. En principe, ces enzymes détectent les changements du niveau d'oxygène en modifiant leurs activités enzymatiques. L'hypoxie est un défi énergétique pour les cellules car l'oxygène devient un facteur limitant et la respiration mitochondriale diminue. Les cellules réagissent donc en limitant l'utilisation des processus très consommateurs en O2 comme la traduction. Ainsi la synthèse protéique est considérablement ralentie dans des conditions hypoxiques.

Au niveau transcriptionnel, le facteur HIF est induit en réponse à l'hypoxie. Ce facteur est constitué de deux sous-unités α et β. Il existe trois isoformes de la sous-unité α HIF-1α, HIF-2α et HIF-3α et deux isoformes pour la sous-unité β. HIF-α et HIF- β forment un hétérodimère dans le noyau et induisent l'expression de plusieurs gènes. Il existe une centaine de gènes qui ont été identifiés comme étant des cibles de HIF. Ces gènes sont impliqués dans des mécanismes d'angiogenèse, d'apoptose, de

métabolisme. L'une des caractéristiques importantes de HIF est que l'expression de sa sous-unité α est dépendante de l'oxygène. En normoxie, HIF-α est dégradée par le protéasome tandis qu'en condition hypoxique, HIF-α est stabilisée. La sous-unité α de HIF possède un domaine de dégradation oxygène dépendant, ce domaine contient des résidus proline essentiels pour cette dépendance à l'oxygène. Ces résidus sont hydroxylés et déterminent le devenir de HIF-α. Les enzymes PHD sont capables d'hydroxyler les résidus proline de HIF-α (figure 7). Elles sont des senseurs à O2, lorsque de l'oxygène est disponible, elles hydroxylent HIF-α, qui lui-même se lie à pVHL (proteine de VonHippel Lindau), une sous-unité du complexe ubiquitine ligase, ce qui entraîne sa dégradation. Il existe un autre type d'oxygénase 2-OG appelée FIH (factor inhibiting HIF). FIH hydroxyle également HIF. Dans des conditions hypoxiques, HIF-α n'est pas hydroxylée car les enzymes PDH et FIH n'ont plus d'O2 disponible pour fonctionner, alors la sous-unité est disponible pour s'hétérodimériser avec HIF-β. Le dimère se fixe sur les éléments HRE (hypoxia inductible element). Ces séquences HRE sont présentes sur une grande variété de promoteurs de gènes impliqués dans de multiples fonctions : On en trouve notamment dans les promoteur du facteur de croissance angiogénique VEGFA (vascular endothelial growth factor A) et de ses récepteurs, dans ceux des gènes de réponse à l'apoptose comme NPM ou de l'EPO qui induit une production de globule rouge etc (Dengler et al., 2014).

L'hypoxie régule également l'expression génique au niveau traductionnel. D'abord, elle induit un blocage de la traduction globale en inhibant l'initiation de la traduction coiffe-dépendante par l'activation de la voie mTOR et à travers la phosphorylation de la protéine kinase PERK (nous verrons ces mécanismes plus en détail dans la partie qui suit) (Arsham et al., 2003; Koumenis et al., 2002). Deux mécanismes de traduction alternatifs majeurs permettent de restaurer la traduction en réponse à l'hypoxie : les uORF (upstream open reading frames) et les IRES (internal ribosome entry sites).

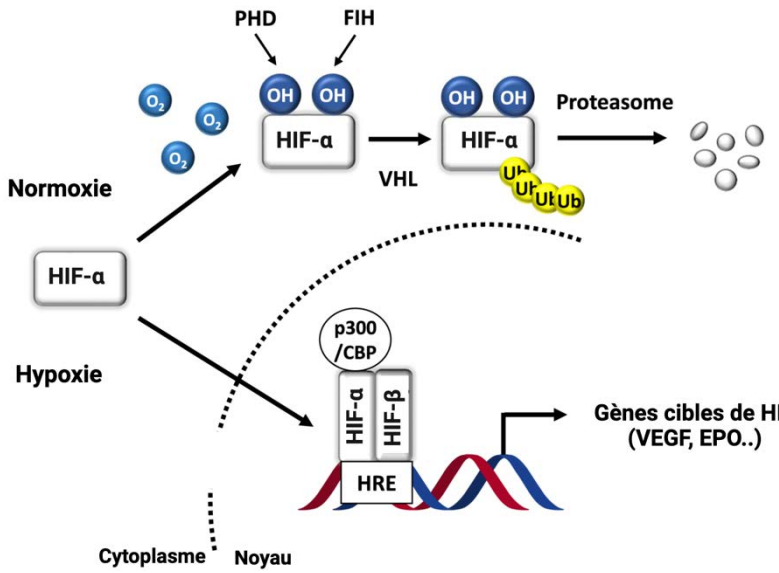


Figure 7 : Mécanisme de stabilisation ou déstabilisation du facteur HIF en normoxie ou hypoxie. PHD : *prolyl-hydroxylase domain-containing protein* ; FIH : *Factor Inhibiting HIF* ; pVHL : protéine de VonHippel Lindau. Adapté de Ikeda et al, 2021.

Stress génotoxique

Le stress génotoxique est une forme de stress qui provoque des dommages ou des altérations de l'ADN dans les cellules. Il peut être causé par différentes substances ou facteurs, tels que les radiations ionisantes, les produits chimiques toxiques, les agents cancérigènes ou certains types de stress oxydatif. Lorsque les cellules sont exposées à des agents génotoxiques, ceux-ci induisent des mutations, des cassures de brins d'ADN ou d'autres types de lésions génétiques. Ces dommages entraînent des altérations génétiques qui peuvent avoir de graves conséquences comme le développement de maladies telles que le cancer. Pour se protéger de cette menace potentielle, les cellules sont équipées de puissants mécanismes de surveillance qui détectent et réparent les dommages avant qu'ils ne se propagent aux cellules filles suivantes. Cette réponse est appelée collectivement le point de contrôle des lésions de l'ADN ou la réponse aux lésions de l'ADN (Bartek and Lukas, 2007; Sancar et al., 2004). Malgré ces effets néfastes des lésions de l'ADN, plusieurs agents endommageant l'ADN sont largement utilisés pour traiter le cancer, car ils peuvent provoquer un arrêt non réversible du point de contrôle ou déclencher la mort cellulaire, freinant ainsi la prolifération rapide des cellules cancéreuses. Par exemple, la doxorubicine, qui induit des cassures double-brin de l'ADN, est un puissant médicament anticancéreux couramment utilisé en clinique. L'exécution de la réponse aux dommages à l'ADN nécessite la détection des dommages et initie une cascade de signalisation qui stoppe la progression du cycle cellulaire tout en favorisant la réparation. Cette cascade de signalisation est principalement pilotée par des modifications post-traductionnelles. Les kinases liées à la phosphatidylinositol 3-kinase de l'ataxie-télangiectasie mutée (ATM) et liées à l'ataxie et à Rad3 (ATR) jouent un rôle central dans l'initiation de la signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN (Ciccia and Elledge, 2010). ATM et ATR sont recrutés sur les sites de lésions de l'ADN et phosphorylent ensuite plus de 700 substrats. (Matsuoka et al., 2007). Les kinases CHK1 et CHK2 se situent en aval des signalisations ATR et ATM respectivement et leur phosphorylation/activation induit une multitude de phosphorylation de protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire et les réparations à l'ADN. La composante la plus étudiée de la réponse aux dommages à l'ADN est la protéine du cycle cellulaire p53 aussi appelée « la gardienne du génome ». p53 est régulée par la kinase ATM et les lésions double brin à l'ADN, elle induit l'arrêt du cycle cellulaire.

1.2.2. Le blocage de l'initiation de la traduction canonique par le stress

Conformément à son rôle critique dans la détermination du taux global de traduction, l'initiation est la cible principale de la régulation en cas de stress. Cela est dû à la nature complexe de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes qui offre un certain nombre de cibles de régulation, dont beaucoup reposent sur la modulation des états de phosphorylation des eIF par des kinases et des phosphatases liées au stress. Dans diverses conditions de stress, des voies de signalisation distinctes convergent vers quelques régulateurs clés d'initiation, ce qui entraîne une inhibition de la traduction. Les deux mécanismes les mieux caractérisés sont le ciblage du complexe eIF4F qui inhibe la reconnaissance de la coiffe de l'ARNm et le ciblage de eIF2 qui inhibe la formation de complexes ternaires.

Phosphorylation du facteur eIF2α

Un mécanisme central de régulation de l'initiation en réponse au stress implique la phosphorylation de la sous-unité α du facteur d'initiation eucaryote 2 (eIF2α) sur sa serine 51. EIF2α est une sous-unité d'eIF2 qui fait partie du complexe ternaire. Le GTP étant hydrolysé lors de l'initiation de la traduction, eIF2 doit être rechargé par l'ARNt initiateur. Cette recharge est réalisée par l'échange GDP-GTP catalysé par eIF2B. Dans des conditions de stress, la phosphorylation de eIF2α transforme eIF2-GDP en un inhibiteur compétitif du facteur d'échange de nucléotides de guanine eIF2B, empêchant le recyclage d'eIF2 et réduisant les taux d'initiation de la traduction en diminuant la concentration du complexe ternaire (Rowlands et al., 1988; Yang and Hinnebusch, 1996). En effet, eIF2α phosphorylé se lie étroitement à une partie régulatrice d'eIF2B, inhibant ainsi le recyclage d'eIF2-GDP vers la forme active liée au GTP. eIF2B est un facteur à cinq sous-unités, la sous-unité ε porte la fonction GTPasique et trois des sous-unités restantes sont des sites de liaison pour eIF2α phosphorylé. (Hershey et al., 2012; "Translational Control in Biology and Medicine," n.d.; Wek, 2018; Yang and Hinnebusch, 1996). Chez les mammifères, il existe quatre kinases différentes d'eIF2α qui contiennent des domaines régulateurs distincts qui servent à détecter l'environnement de stress par liaison avec des ligands. Ces kinases sont donc activées en réponse à différents stress : les kinases GCN2 qui répondent à la privation en acide aminé par détection du niveau d'ARNt aminoacétylé et aux irradiations UV, PERK (*PKR-like Reticulum Endoplasmic Kinase*) qui détecte la présence de protéines mal repliées dans le RE, HRI (*Heme Regulatory Inhibitor*) sensible à la privation d'hème et au choc thermique et PKR (*Protein Kinase R*) qui détecte la présence d'ADN double brin, impliquée dans la réponse immunitaire innée à l'infection virale (Harding et al., 2000b; Sood et al., 2000; Spriggs et al., 2010; Starck et al., 2016) (Figure 8). Cette réponse est appelée « réponse intégrée au stress ». Ainsi l'inhibition du recyclage du

CT conduit à une diminution globale de la traduction associée à une baisse importante des ARNm engagés dans les fractions polysomiques (en cours de traduction) et une hausse des ARNm dans les fractions monosomiques (bloqués).

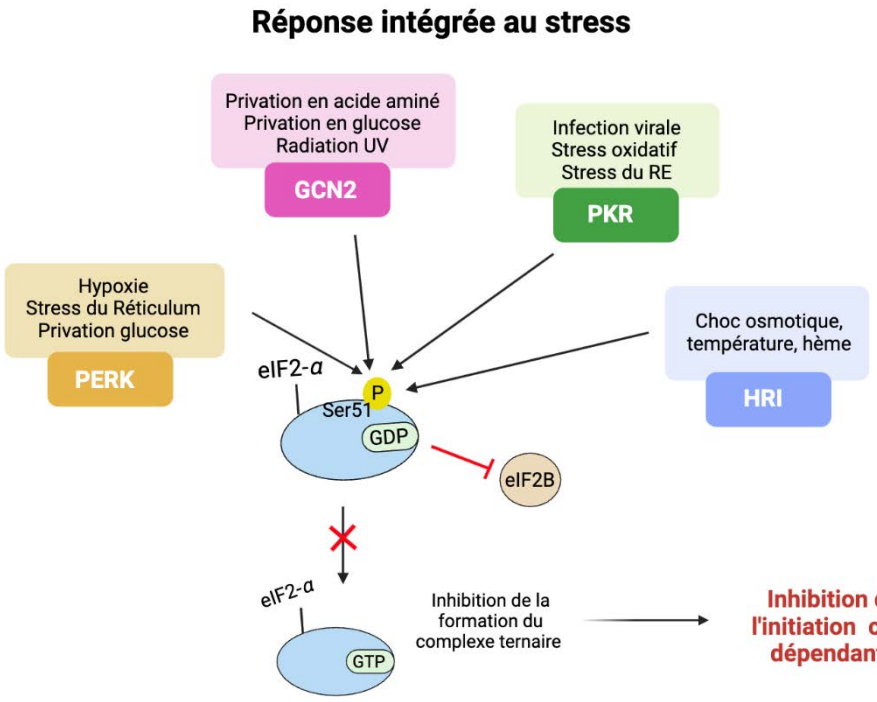


Figure 8 : La réponse intégrée au stress conduit à la phosphorylation d'eIF2-α. En réponse à divers types de stimuli, les kinases vont être activées et induire la phosphorylation de la sous-unité α du facteur eIF2. La kinase PERK (*PKR-like Reticulum Endoplasmic Kinase*) qui detecte la présence de protéines mal repliées dans le RE, la privation d'oxygène et de glucose, la kinase GCN2 qui répond à la privation en acide aminé, de glucose et aux irradiations UV, la PKR (*Protein Kinase R*) qui détecte la présence d'ADN double brin, impliquée dans la réponse immunitaire innée à l'infection virale, le stress oxydatif et le stress du RE et enfin la HRI (*Heme Regulatory Inhibitor*) sensible à la privation d'hème et au choc thermique et PKR (*Protein Kinase R*). eIF2- α phosphorylé devient un inhibiteur compétitif du facteur d'échange eIF2B, empêchant ainsi l'échange du GDP et GTP et le recyclage du complexe ternaire, ce qui conduit à un blocage de l'initiation.

Séquestration de eIF4E par 4E-BP

Un second mécanisme de blocage de la traduction consiste à interférer avec la reconnaissance de la coiffe m7G, empêchant ainsi le recrutement de la machinerie de traduction vers l'ARNm. Diverses voies de signalisation contrôlent la reconnaissance de la coiffe médiée par eIF4F, ajustant ainsi le taux de synthèse globale des protéines. L'un des régulateurs les mieux connus est la protéine de liaison à eIF4E : 4E-BP (*eIF4E Binding Protein)*. La coiffe m7G est reconnue par eIF4E dans le cadre du complexe eIF4F, cependant l'interaction entre eIF4G et eIF4E dans le complexe eIF4F est inhibée par les membres d'une famille de protéines apparentées, appelées protéines de liaison eIF4E, les 4E-BP. Il existe trois isoformes de 4E-PB chez les mammifères, toutes ayant la même fonction : Les 4E-BP entrent en compétition avec eIF4G pour un site de liaison partagé sur l'eIF4E (Mader et al., 1995; Qin et al., 2016). La force de la liaison des 4E-BP à eIF4E dépend de son état de phosphorylation, lorsqu'il est hypophosphorylé, il se lie fortement à 4E, tandis que phosphorylé il se lie plus faiblement. La phosphorylation de 4E-BP résulte de l'activité de la voie mTOR. (*Mammalian Target of Rapamycin*) (Yang et al., 2022). Plus précisément du complexe que forme mTOR avec les protéines raptor et mLST8 : mTORC1. MTORC1 est une sérine/thréonine kinase en aval de la voie de signalisation PI3K/Akt, qui détecte et intègre les signaux provenant des stimuli extracellulaires, de la disponibilité des acides aminés, des facteurs de croissance et des niveaux d'oxygène et d'énergie des cellules (Saxton and Sabatini, 2017). mTORC1 agit donc comme un senseur de stress. L'inactivation de mTORC1 se produit à la surface du lysosome par les GTPases RagA/B-RagC/D. Lorsque les acides aminés sont en quantité limitée, les GTPases Rag sont inactivées par le couplage de RagA/B au GDP et de RagC/D au GTP, les rendant incapables de recruter mTORC1 à la membrane du lysosome (Kim et al., 2008). Un complexe appelé Ragulator agit comme un facteur d'échange de nucléotides de guanine (GEF) pour RagA et RagB, tandis qu'un autre complexe appelé GATOR1 a une activité de protéine activatrice de GTPase (GAP). Le capteur direct des acides aminés reste à caractériser. Dans des conditions normales, 4E-PB est phosphorylé par mTORC1, mais en cas de stress quand mTORC1 est inactivé, 4E-PB est hypophosphorylé ce qui induit la séquestration du facteur eIF4E et empêche ainsi la formation du complexe eIF4F et l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe. D'autres signaux de stress convergent vers l'inhibition de mTORC1, le stress oxydatif par exemple active la voie de AMPK (*AMP-responsive protein kinase*) qui supprime mTORC1 en phosphorylant son régulateur négatif TSC2. Les dommages à l'ADN également surviennent de façon dépendante ou indépendante de p53. La voie dépendante de p53 conduit à l'activation de TSC2 par AMPK et la voie indépendante de p53 entraîne une reconnaissance des dommages par la kinase ATM et à travers une transduction du signal réalisée par AMPK1 active TSC2 et inhibe mTORC1 (Alexander et al., 2010;

Budanov and Karin, 2008; Inoki et al., 2003). mTORC1 est également responsable de la phosphorylation de plusieurs autre substrats importants pour la traduction, notamment eIF4G, les kinases S6 (S6K) qui phosphorylent eiF4B et la protéine ribosomique RPS6 ainsi que la kinase du facteur 2 d'élongation (eEF2K) (Holz et al., 2005). Il a également été montré que mTOR pouvait se lier à eIF3 pour favoriser l'interaction entre eIF3 et eIF4G et promouvoir la formation du PIC (Harris et al., 2006). Une autre voie de signalisation cellulaire majeure qui a un impact important sur la traduction est la voie Ras-MAPK. Elle est responsable de la phosphorylation de eIF4E et eIF4B (Shahbazian et al., 2006, 2006).

Il est clair qu'un même type de stress peut déclencher plusieurs voies de signalisation conduisant à une inhibition globale de la synthèse protéique. Par exemple, la privation d'acides aminés ne supprime pas seulement la reconnaissance de la coiffe médiée par eIF4 via les voies de signalisation mTORC1 susmentionnées, mais active également GCN2 via l'accumulation d'ARNt non chargé. La répression de la synthèse globale des protéines s'accompagne souvent d'une traduction sélective des ARNm codant pour des protéines vitales pour la survie cellulaire et la récupération après un stress. Plusieurs mécanismes d'initiation alternatifs à la traduction canonique se sont développés pour y parvenir.

1.2.3. Régulation sélective de la traduction en cas de stress

Dans la plupart des cas où les cellules ont une croissance « normale », la quasi-totalité de la traduction est censée se dérouler comme mentionné précédemment. Cependant, un petit pourcentage d'ARNm sont traduits par des voies d'initiation différentes. Ces ARNm sont des ARNm spécifiques d'un type cellulaire, d'un évènement développemental ou encore d'une condition de stress. Cela signifie que ces mécanismes ont généralement un impact limité sur la traduction globale en raison de leur manque de compétitivité pour la machinerie de traduction. En conséquence ces mécanismes ont été difficiles à décrypter *in vitro*. Les cellules utilisent une variété de mécanismes pour réaliser une traduction sélective, qui implique souvent des éléments de séquence *cis* sur les ARNm et des facteurs de régulation en *trans* qui reconnaissent des caractéristiques spécifiques de l'ARNm. Ces mécanismes peuvent modifier l'initiation de la traduction de manière dépendante ou indépendante de la coiffe (Figure 5). La plupart des éléments *cis* se trouvent dans la région non traduite des ARNm, y compris les sites d'entrée des ribosomes internes (IRES), les cadres de lecture ouverts en amont (uORF), les motifs avec des séquences spéciales ou des structures secondaires, et les sites de liaison des microARN.

Deux des systèmes alternatifs les mieux étudiés sont l'initiation de la traduction contrôlée par les sites d'entrée interne des ribosomes (IRES) et les uORF (upstream open reading frame) comme ceux étudiés pour le facteur GCN4/ATF4 (Dever et al., 1992; Holcik and Sonenberg, 2005a; Pelletier and Sonenberg, 1988). Dans le cas des IRES, le mécanisme de recrutement du ribosome se produit par entrée interne alors que pour GCN4, l'initiation se fait par balayage à partir de la coiffe. Il existe cependant d'autres mécanismes tels que les méthylations m^6A du résidu adénine qui se trouve en 5'UTR qui peut promouvoir une initiation indépendante de la coiffe (Kwan and Thompson, 2019; Meyer et al., 2015).

Autre fait intéressant, le manque de disponibilité du complexe ternaire impliquant eIF2, dans des conditions où celui-ci est phosphorylé sur la serine 51 de sa sous-unité alpha, entraîne l'implication de protéines alternatives pour initier la traduction. Par exemple, la protéine eIF2A, polypeptide de 65 KDa, est impliquée dans l'initiation des peptides du CMH de classe I, en réponse au stress mais également dans la progression tumorale et la réplication virale (Kim et al., 2011; Sendoel et al., 2017; Starck et al., 2016; Starck and Shastri, 2016). De même, l'ARNt initiateur n'est pas toujours une méthionine, les cellules utilisent un ARNt lié à la leucine pour initier la traduction au codon CUG cryptique (Schwab et al., 2004). Des mécanismes de répression traductionnelle peuvent également participer à réguler la traduction, c'est le cas des complexes GAIT et de la régulation par les miARN.

.

Les uORF

Il existe dans les 5'UTR des ARNm des ORF alternatifs en amont de l'ORF principal, appelés uORF (*upstream ORF*). La présence de ces codons initiateurs alternatifs, qui peuvent être des AUG mais pas seulement, est inhibitrice de la traduction de l'ORF principal car le complexe de pré-initiation durant le balayage les identifie comme codons de départ. Dans le cas où eIF2α est phosphorylé et que la traduction globale est compromise, la présence d'uORF favorise la traduction de certains ARNm liés au stress. Un exemple prototype de cette régulation est celui du facteur de transcription GCN4 chez la levure. Dans des conditions de privation en acide aminés, la kinase GCN2 phosphoryle eIF2 ce qui induit la traduction de GCN4 (Hinnebusch, 2005). En effet, dans des conditions de croissance normale, lorsque eIF2α n'est pas phosphorylé, les ribosomes balayent la région 5' non traduite et commencent à traduire au premier uORF qu'ils rencontrent. Après la synthèse du polypeptide codant l'uORF1, ils restent associés à l'ARNm de GCN4 et réinitient au niveau des autres uORF présents en aval mais ne parviennent pas jusqu'à l'ORF qui code GCN4 qui reste non traduit. Cependant, lorsque eIF2α est phosphorylé et que la disponibilité des complexes ternaires est amoindrie, alors se produit

un retard dans la réinitiation qui permet aux ribosomes de dépasser les uORF sans les traduire et de traduire la région codante de GCN4 (Hinnebusch, 2005). Bien qu'il n'existe pas d'orthologue de GCN4 dans les cellules de mammifères, l'expression d'un régulateur transcriptionnel apparenté, ATF4, est augmentée en réponse à la phosphorylation d'eIF2α lors de stress comme la privation en acide aminé et le stress du RE (Harding et al., 2000a; Kaufman et al., 2002). ATF4 est induit au niveau traductionnel comme le montre le recrutement de son ARNm dans les polysomes après le stress. Tout comme GCN4, il possède des uORF dans sa région 5'UTR. Chez l'homme et la souris, le premier uORF de l'ARNm d'ATF4 code un polypeptide d'une longueur de seulement 3 résidus d'acides aminés, tandis que le second uORF code pour un peptide d'une longueur de 59 résidus d'acides aminés et chevauche les 83 premiers nt de la région codante d'ATF4. En temps normal et donc dans une situation où eIF2α n'est pas phosphorylé, les deux uORF d'ATF4 sont traduits, ce qui empêche la traduction à l'ORF principale à cause de l'inclusion de l'uORF2 dans l'ORF codante. Lorsque eIF2α est phosphorylé, tout comme dans le cas de GCN4, la moindre disponibilité du complexe ternaire retarde la réinitiation et l'ORF principal est traduit (Vattem and Wek, 2004). Des uORF sont présents dans environ 50% des transcrits codants des protéines, c'est pourquoi il existe de nombreux autres exemples de régulation par les uORF en cas de stress : c'est le cas de GDD34 (*DNA-dammage-inducible protein 34*), DDIT3 (*DNA dammage inducible transcript 3*) ou encore ATF5 (Hatano et al., 2013; Lee et al., 2009; Young et al., 2015).

Les modifications m6A

Les modifications m6A (N6-methyladénosine) sont retrouvées dans de nombreux types d'ARN incluant les ARNm, les ARNt ainsi que les ARNr. On trouve en moyenne 5 bases modifiées par une méthylation m6A par ARN. Ces modifications de bases sont très dynamiques et sont introduites par des méthyltransférases appelées « writers » et sont retirées par des enzymes « erasers ». (Zaccara et al., 2019) Ces modifications permettent la régulation de l'expression génique par divers mécanismes : l'épissage des ARNm, leur export et dégradation ainsi que l'initiation de la traduction. Il a été démontré que les ARNm comportant ne serait-ce qu'une seule modification m6A dans leur 5'UTR pouvaient être traduits de manière coiffe-indépendante. En effet la présente d'une modification m6A permet le recrutement du 43S par la liaison du facteur eIF3 même en l'absence de eIF4E. Meyer *et al* ont montré que le stress induit par le choc thermique engendre une augmentation des modifications m6A dans le 5'UTR de l'ARNm de la chaperonne HSP70 et favorise l'activation de sa traduction via un mécanisme coiffe-indépendant (Meyer et al., 2015). En réponse à divers stress, on peut observer une redistribution des m6A dans les 5'UTR de nombreux ARNm.

Les IRES

L'un des mécanismes de traduction indépendant de la coiffe le mieux caractérisé est le site d'entrée interne des ribosomes (IRES). Il s'agit de structures secondaires ou tertiaires présentes dans le 5'UTR de certains ARNm. On estime que 10% des ARNm cellulaires contiennent des sites d'entrée internes des ribosomes dans leur 5'UTR. Ces structures permettent un recrutement de la machinerie de traduction en aval de la coiffe m7G au niveau de la structure IRES. Identifiés à l'origine dans des virus, les IRES sont généralement des éléments d'ARN structurés qui facilitent la liaison de l'ARNm aux sous-unités 40S, en faisant généralement intervenir un sous-ensemble de co-facteurs connus sous le nom d'ITAF. Les variations de l'abondance ou de l'activité de ces ITAF permettent un contrôle précis de la traduction contrôlée par l'IRES, et ce mode d'initiation est fréquemment utilisé dans des conditions de stress lorsque la traduction cap-dépendante est compromise. Je détaillerai ce mécanisme de traduction alternatif et ses modes de régulation de façon exhaustive qui va suivre.

2. Les IRES et leur ITAF dans la réponse au stress

Les sites d'entrée internes des ribosomes ou IRES sont l'un des principaux mécanismes de traduction alternatif activé en réponse à la répression de la traduction cap-dépendante permettant le maintien de la traduction d'ARNm spécifiques. Pour la première fois découvertes dans les ARNm viraux, ces structures sont également présentes dans les ARNm cellulaires codant des régulateurs importants des réponses cellulaires. Les IRES permettent la traduction de ces ARNm en réponse à différents stress, notamment les lésions de l'ADN, la privation d'acides aminés, l'hypoxie ou le stress du réticulum endoplasmique, ainsi qu'à des stimuli physiologiques tels que la différenciation cellulaire ou le développement embryonnaire. La plupart des IRES sont régulés par des facteurs *trans* qu'on appelle des ITAFs. Les ITAFs régulent positivement ou négativement la traduction IRES-dépendante, à travers un panel de mécanismes d'action très vaste (notre revue sur les ITAF Godet et al, 2019). Dans la partie qui va suivre, nous décrirons les IRES en profondeur, en partant de leur découverte chez les virus jusqu'à à la compréhension des nombreux mécanismes biologiques qu'ils régissent chez les mammifères en cas de stress et dans différentes pathologies. Nous discuterons également des ITAFs et de leurs mécanismes d'action.

2.1. Les IRES

2.1.1. Découverte et historique

Jusqu'à la fin des années 80, le dogme sur le mécanisme d'initiation de la traduction était figé : les ARNm avaient nécessairement besoin d'une coiffe en 5' afin de recruter le ribosome et de réaliser le balayage. Il était inenvisageable que les ribosomes utilisent une autre entrée que celle de la coiffe (Kozak, 1989). C'est en 1988 que les équipes de N. Sonenberg et de E. Wimmer découvrent parallèlement un mécanisme de recrutement par entrée interne du ribosome indépendant de la coiffe dans deux picornavirus différents (Jang et al., 1988; Pelletier and Sonenberg, 1988). Des structures d'ARN présentes sont identifiées dans les 5'UTR des ARN génomiques du poliovirus (PV) et du virus de l'encéphalomyocardite EMCV (encephalomyocarditis virus), qui permettent au génome ARN de ces virus d'être traduit par un recrutement du ribosome au niveau de ces structures et indépendamment de la coiffe. Ni l'ARN d'EMCV ni celui du PV ne possède de coiffe au niveau de son 5'UTR et les premiers codons initiateurs dont ils sont pourvus se localisent loin derrière l'extrémité 5'. Ces deux observations impliquent qu'il est improbable que leur initiation se fasse à ce niveau. De plus, les picornavirus possèdent un facteur protéique capable de cliver le facteur de liaison à la coiffe eIF4G, ce qui signifie que la cellule infectée voit son initiation cap-dépendante inhibée par le virus. C'est de cette façon que ces virus réquisitionnent la machinerie de traduction cellulaire pour leur réplication. Ces virus utilisent des structures secondaires présentes dans leur 5'UTR qui ont été appelées IRES pour recruter les ribosomes. Les picornavirus ne sont pas les seuls virus à utiliser ce mode de recrutent, puisque les rétrovirus, les flavivirus ainsi que les dicistrovirus sont également pourvus d'IRES et peuvent aussi initier la traduction par entrée interne (Balvay et al., 2007; Berlioz and Darlix, 1995; Jang et al., 1988; Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Wilson et al., 2000). Ce mécanisme n'est pas réservé aux virus puisque c'est en 1991 dans l'ARNm qui code la protéine chaperonne BIP (*immunoglobulin heavy-chain binding protein*) que le premier IRES d'ARNm cellulaire a été découvert et cela a été le début d'une longue liste (Macejak and Sarnow, 1991)(Godet et al, 2019).

2.1.2. Les IRES viraux

Les IRES viraux sont donc présents dans les génomes de différentes classes de virus. Bien que leur fonction soit similaire, ils diffèrent par leur structure et n'emploient pas les mêmes modes de

recrutement pour le ribosome, c'est pourquoi ils ont été répartis en quatre classes différentes (Godet et al., 2019; Lee et al., 2017; Mailliot and Martin, 2018) (Figure 9) :

Les IRES de classe I sont surtout présents chez les *picornavirus,* notamment parmi les entérovirus PV, enterovirus A71, coxsachievirus B3 ainsi que chez les rhinovirus comme HRV2 (*human rhinovirus type 2*). L'IRES de classe I le mieux caractérisé est celui du PV. Ce virus possède un 5'UTR de grande taille (743nt) avec une structure secondaire qui comporte 6 domaines (de I à VI). Le domaine I forme une structure en trèfle qui est requise pour la réplication. La structure minimale de l'IRES du PV s'étend des nucléotides 100 à 743. Afin de promouvoir efficacement l'initiation de la traduction, l'IRES du PV nécessite l'intervention de presque tous les facteurs d'initiation à l'exception de eIF4E. En effet, le virus code une protéase du nom de 2A qui clive le facteur d'initiation eIF4G, entraînant la perte de son domaine N-terminal qui interagit avec eIF4E, cela empêche donc son interaction avec la coiffe. Ce clivage n'affecte cependant pas la capacité de liaison d'eIF3/eIF4A à eIF4G (Gradi et al., 1998; Lamphear et al., 1995).

Ces virus recrutent le ribosome en amont du codon initiateur et donc après recrutement du ribosome, s'ensuit une étape de balayage pour que le ribosome arrive au codon initiateur. Le codon initiateur peut se trouver à une distance plus ou moins éloignée du site d'entrée interne : 160nt pour l'IRES du PV contre 30nt pour l'IRES du HRV2 (Anderson et al., 2007; Bailey and Tapprich, 2007; Kaminski et al., 2010; Lin et al., 2009; Lozano and Martínez-Salas, 2015). La boucle du domaine IV possède un motif GNRA dont la fonction précise est peu connue mais qui est également présente chez les IRES de type II. L'IRES du PV contient des motifs ARN essentiels à la fois pour sa structure mais également pour le recrutement d'ITAF. A noter que les ITAFs sont toujours d'origine cellulaire. Dans le CL et le domaine IV, le motif riche en C est important pour le recrutement de la PCBP2 (Toyoda et al., 2007). L'IRES du PV peut également être reconnu un autre ITAF, la PTB (*polypyrimidine tract binding protein 1*) qui se lie sur une séquence riche en pyrimidine. Le domaine V est impliqué dans l'association d'eIF4G, d'eIF4A et de l'IRES. Ces interactions sont modulées par des ITAF qui jouent un rôle déterminant dans la traduction de l'ARN viral et donc dans sa réplication (Kafasla et al., 2010; King et al., 2010).

Les IRES de classe II sont portés par les ARN génomiques de nombreux *picornavirus*, comme EMCV et FMDV (foot and mouth desease virus). Ces IRES sont similaires en terme de structure et de taille (439 nt pour l'EMCV et 445 nt pour FMDV) et possèdent tous deux 5 domaines (I-V) mais la séquence

nucléotidique n'est pas la même (Lozano and Martínez-Salas, 2015). Le domaine I est requis pour la réplication virale et l'IRES minimal s'étend du domaine II-V le long du 5'UTR. Le domaine III est essentiel pour l'activité de l'IRES (Martínez-Salas et al., 1996). Tout comme pour les IRES de classe I, les IRES de classe II possèdent le motif GNRA, dont la fonction est essentielle à l'activité de l'IRES. Les IRES de ces deux virus interagissent avec eIF4G par liaison sur le motif Y qui se trouve dans le domaine IV (Kolupaeva et al., 1998; López de Quinto and Martínez-Salas, 2000). Ces deux virus codent des protéases 3C pour EMCV et 3C et L pour FMDV. La 3C de FMDV induit un clivage de eIF4G ce qui conduit à un blocage du recrutement coiffe-dépendant. La 3C d'EMCV ne peut pas induire le clivage de 4G, cependant la protéine de séquestration de 4E est activée durant l'infection par EMCV, ce qui bloque la traduction coiffe-dépendante (Gingras et al., 1996). Ces virus recrutent le ribosome directement sur le codon initiateur, ils possèdent plus d'un AUG dans leur motif riche en pyrimidines. Les IRES de EMCV et FMDV ont deux codons initiateurs dans leur séquence (Andreev et al., 2007). Les IRES de type II requièrent la plupart des facteurs d'initiation ainsi que des ITAF. Ils possèdent aussi une séquence riche en pyrimidine dans le domaine II qui, comme pour les IRES de type I, permet de recruter la PTB et le facteur eIF4B (Jang and Wimmer, 1990; Kafasla et al., 2009; López de Quinto et al., 2001; Luz and Beck, 1991).

Les IRES de classe III sont retrouvés dans les membres de la famille des Flavivirus (comme HCV) en général ainsi que les picornavirus apparentés (HCV-like). Le 5'UTR du génome ARN d'HCV possède 4 domaines (I-IV) et l'IRES s'étend sur les domaines II et III. Dans le domaine IV se trouve une tige-boucle qui contient l'AUG, cette dernière est déroulée quand l'IRES est dans le canal ARNm du ribosome (Honda et al., 1996). Les domaines I et II sont impliqués dans la réplication virale. Ces IRES sont plus courts que les IRES de type I et II et possèdent un pseudo-nœud en amont de l'AUG qui permet à l'IRES d'adopter une conformation optimale pour la reconnaissance de l'AUG par la sous-unité 40S. Les 30 premiers nucléotides de la séquence codante sont requis pour initier la traduction (Lu and Wimmer, 1996; Wang et al., 1995). Tout comme pour les IRES de classe II, ils recrutent le ribosome directement sur l'AUG (Reynolds et al., 1996). Plusieurs facteurs d'initiation tels que eIF3, eIF2 et eIF5 sont requis pour initier la traduction par ce type d'IRES (Mailliot and Martin, 2018). L'IRES de HCV a une forte affinité pour la sous-unité 40S. La formation des complexe 40S-IRES implique une interaction avec des nucléotides des domaines II et III. Des études de structure révèlent des interactions spécifiques entre la boucle apicale du domaine III et l'ARNr 18S. Des contacts avec des protéines ribosomiques permettent aussi le recrutement de la 40S, le domaine III interagissant par exemple avec la protéine eS27. En plus du recrutement de la sous-unité ribosomique 40S, l'IRES du

HCV interagit spécifiquement avec le facteur aux multiples sous-unités eIF3. eIF3 partage avec l'IRES le même site de liaison que ce qui la lie à la 40S, il a été montré que eIF3 est déplacé du ribosome et se lie à la région apicale du domaine III de l'IRES, ce qui empêche la compétition entre l'IRES et le facteur et inhibe la formation du 43S canonique (Hashem et al., 2013).

Les IRES de classe IV, aussi appelés IRES à régions intergéniques (IGR IRES), ont été identifiés à l'origine chez le virus de la paralysie du criquet (CrPV) et sont conservés parmi les membres de la famille des *Dicistrovirus*. Le génome viral des Dicistroviridae contient deux cadres de lecture ouverts (ORF1 et ORF2) qui sont traduits à partir d'IRES différents (Kerr and Jan, 2016). L'IRES IGR est donc celui qui se trouve entre les deux ORF. Le membre le plus étudié des IRES de classe IV est l'IGR du virus de la paralysie du criquet (CrPV), mais d'autres ont également été étudiés, tels que le virus de la paralysie aiguë d'Israël (IAPV), le virus de l'instestin de Platia Stali (PSIV) ou le virus du syndrome de Taura (TSV). Le mode d'action des IGR IRES est très simple : ils peuvent initier la traduction sur un codon de départ non AUG, ils n'ont besoin d'aucun eIF et n'utilisent pas l'ARNt initiateur (Jan and Sarnow, 2002; Lee et al., 2017; Wilson et al., 2000). Pour ce faire, les IGR IRES se replient dans une structure compacte et sophistiquée qui est conservée. Prenons l'exemple du CrPV, pour initier la traduction, il ne requiert que la présence des sous-unité ribosomiques. L'IRES forme une structure compacte de trois pseudo-nœuds PKI-PKIII. La PKII et la PKIII sont impliquées dans l'association avec la sous-unité 60S et les deux respectivement , tandis que la PKI forme une structure imitant l'interaction anticodon (ARNt)-codon (ARNm) (Muhs et al., 2015). Le modèle actuel montre que le PKI se lie initialement au site A de la sous-unité 40S ce qui bloque la liaison des ARNt. eEF1a et eEF2 sont requis pour le recrutement de l'ARNt dans le site A. Le site A du ribosome étant occupé par le PKI, une étape de pseudo-translocation contrôlée par eEF2 est nécessaire pour déplacer le PKI du site A au site P. Le site A étant vide, le facteur d'élongation eEF1A amène alors l'ARNt au site A et la deuxième pseudotranslocation promue par eEF2 se produit pour compléter l'état compatible avec l'élongation (Fernández et al., 2014).

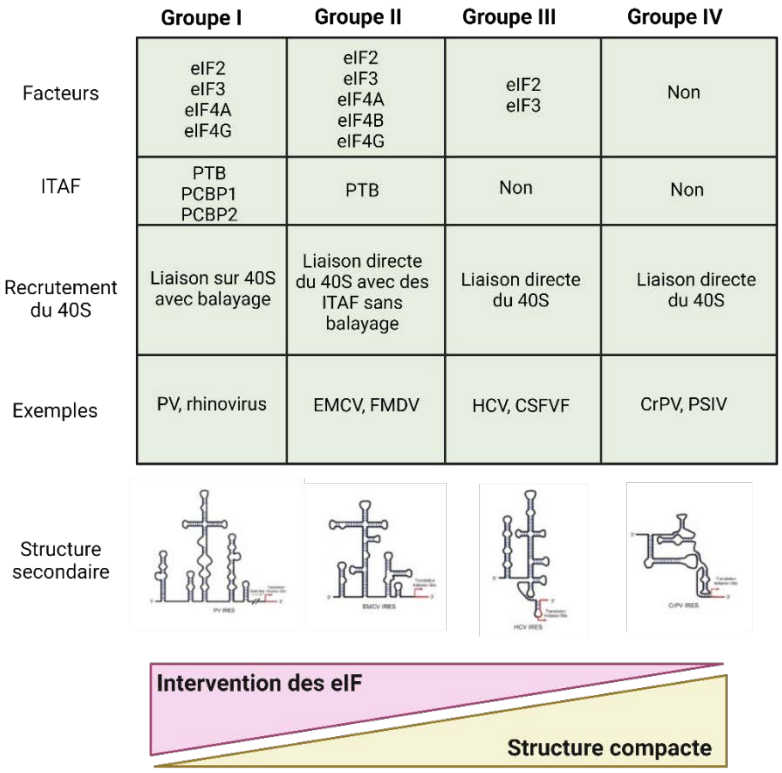


Figure 9 : Mécanismes d'initiation de la traduction IRES-dépendante pour les 4 types d'IRES

2.1.3. Les IRES cellulaires

La découverte dans les années 90 que des facteurs cellulaires comme la PTB régulaient l'activité des IRES a suggéré que ce mode d'initiation pourrait aussi concerner des ARNm cellulaires, bien que ces derniers soient dotés d'une coiffe (Jang and Wimmer, 1990; Kafasla et al., 2010; Luz and Beck, 1991; Meerovitch et al., 1989). Certains virus possèdent dans leur génome les deux mécanismes d'initiation (VIH), ce qui signifie que la présence d'une coiffe n'est pas indissociable de la présence d'éléments IRES. C'est donc en 1991 que le premier IRES cellulaire a été identifié dans le 5' non traduit de l'ARNm qui code la protéine BIP (Macejak and Sarnow, 1991). Mais alors, quel pouvait être l'utilité pour un ARNm cellulaire qui possède une coiffe de posséder ce type de structure ? En fait, dans l'étude, ils ont découvert que la protéine BIP pouvait être traduite dans des cellules infectées par le poliovirus alors que la traduction coiffe-dépendante des ARNm de la cellule hôte est inhibée par le virus. Ce qui a amené à l'hypothèse que ces IRES pourraient permettre la traduction d'ARNm quand la traduction dépendante de la coiffe est bloquée comme durant certaines phases de la mitose (G2-M) ou durant le stress cellulaire (Bonneau and Sonenberg, 1987; Holcik and Sonenberg, 2005a; Huang and Schneider, 1991). La nature de la protéine BIP conforte cette hypothèse : en effet il s'agit d'une chaperonne impliquée dans la réponse au stress généré par un mauvais repliement des protéines dans le réticulum

endoplasmique (stress du RE que l'on a détaillé dans la première partie de cette introduction). L'infection virale perturbe l'homéostasie du RE et conduit à un stress du réticulum. L'induction de la BiP dans un contexte où la traduction globale est bloquée par la présence du virus fait sens avec son rôle dans la réponse au stress (Li et al., 2013). Bien que ce premier IRES d'ARNm cellulaire ait indiqué un rôle majeur de la traduction dépendante des IRES dans la réponse au stress, la pertinence physiologique des IRES dans la traduction des ARNm cellulaires a été mise en doute pendant de nombreuses années par la présence de la coiffe sur les ARNm, et ce malgré l'identification d'IRES dans d'autres ARNm (Oh, 1992, Vagner et al, 1995, Nanbru et al 1997, Huez et al, 1998). Aujourd'hui, la présence d'IRES a été révélée dans un nombre important de messagers cellulaires, on estime que 10% des ARNm possèdent des éléments qui permettent un recrutement du ribosome coiffe-indépendant dans leur 5'UTR (Weingarten-Gabbay et al., 2016). Ces IRES cellulaires sont présents dans des ARNm qui codent des protéines essentielles pour le développement comme les gènes homeobox (Hox), pour des proto-oncogènes c-myc, des suppresseurs de tumeur également comme c'est le cas pour la gardienne du génome p53, dans l'ARNm du facteur anti-apoptotique XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) et du pro-apoptotique Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) mais également pour des facteurs de croissance comme les protéines de la famille des FGF (Fibroblast growth factors) et des VEGF (vascular endothelial growth factors) (Morfoisse et al., 2014a, p. 53, 2016; Nanbru et al., 1997; Oh et al., 1992; Prats and Prats, 2002; Riley et al., 2010; Sharathchandra et al., 2014; Ungureanu et al., 2006; Vagner et al., 1995). Le point commun entre tous ces messagers ? Ils sont tous d'une importance cruciale dans la régulation de divers processus cellulaires essentiels et dans la réponse au stress. Tous ces messagers sont coiffés, les éléments IRES agissent comme une sorte de sécurité intégrée pour promouvoir la traduction lors de stress comme l'apoptose ou l'hypoxie, quand la traduction coiffe-dépendante est bloquée. Dans des conditions de croissance « normales », ces ARNm sont traduits par le mécanisme canonique alors que dans des conditions de stress, un « switch » se fait et c'est la traduction IRES-dépendante qui prend le relais. Ce phénomène a été décrit à de multiples reprises comme dans le cas du facteur pro-antigénique VEGFA et du facteur de réponse à l'hypoxie HIF1α dont la traduction passe de coiffe-dépendante à coiffe-indépendante pendant le stress hypoxique (Braunstein et al., 2007). Bien que le blocage de la traduction coiffe-dépendante induit par le stress semble être une bonne explication à la présence de ces structures pour « sauver » la traduction des messagers essentiels à un retour à l'homéostasie, les IRES participent également à une variété de fonctions biologiques chez les mammifères (et aussi la drosophile il me semble), même dans des conditions où la traduction coiffe-dépendante est intacte. Il peut s'agir de la traduction de deux protéines différentes à partir d'un seul transcrit bicistronique ou de

l'expression précise de certains gènes au cours du développement de l'organisme (Du et al., 2013; Xue et al., 2015).

Structure des IRES cellulaires

Les IRES peuvent agir selon plusieurs mécanismes afin de recruter la sous-unité 40S. Cela implique la formation de structures d'ARN, l'interaction avec des ITAF et l'appariement de base avec l'ARNr 18S (Dresios et al., 2006; Yang and Wang, 2019). Les IRES d'ARNm cellulaires sont retrouvés dans les 5'UTR longs avec un nombre de GC important et une structure secondaire prédite étendue et sont relativement peu efficaces pour initier la traduction dans un contexte physiologique où l'initiation est assurée par la coiffe (Stoneley and Willis, 2004). Contrairement aux IRES viraux, les IRES cellulaires ne présentent pas réellement de structure secondaire conservée entre eux (Baird et al., 2007). Cela rend impossible une classification en différents groupes. Le manque de caractéristiques communes discernables dans un 5′ UTR qui indiquent la présence d'un IRES empêche également la prédiction efficace de nouveaux IRES dans les ARNm par bio-informatique (Baird et al., 2006). En effet il a été montré que des séquences courtes non structurées peuvent également avoir une activité IRES. Malgré leur importance, les méthodes qui permettent de découvrir et caractériser les IRES sont limitées (Thompson, 2012). Les structures secondaires des ARN peuvent être résolues en employant une méthode enzymatique du nom de SHAPE pour selective *2'-hydoxyl acylation analyzed by primer extension.* Elle repose sur des modifications enzymatiques présentes sur les bases flexibles de l'ARN et permet de détecter la structure des ARN à l'échelle du nucléotide. Cette méthode a permis de déterminer la structure de nombreux IRES viraux et cellulaires (Diaz-Toledano et al., 2017; Lozano et al., 2018; Morfoisse et al., 2014a, 2016). La détection des IRES reste largement empirique et repose sur l'identification de l'activité de l'IRES à l'aide de plusieurs tests, y compris des constructions modèles d'ARNm bicistronique. En somme, la détection de structures permettant une initiation de la traduction indépendante de la coiffe n'est pas chose aisée. Le meilleur système expérimental connu à ce jour repose sur l'utilisation de vecteurs bicistroniques. Cette approche ainsi que tous les contrôles qui doivent l'accompagner, a été décrite dans une revue intitulée « So you want to know if your message has an IRES ? » (Thompson, 2012). Malgré le manque de similarité de séquences et de structures, certaines propriétés peuvent suggérer la présence d'un élément IRES ; 1) la présence de plusieurs codons de départ inutilisés en amont du codon authentique (ce qui peut aussi suggérer une régulation par les uORF), 2) Un 5'UTR long et/ou structuré, 3) une protéine exprimée en cas de stress ou dans des conditions ou la traduction coiffe est bloquée. Cependant, aucun de ces facteurs ne permet d'établir si l'ARNm concerné contient ou non un IRES. Un test fonctionnel doit être réalisé ainsi que plusieurs

expériences de contrôle. En 2016, l'équipe de Weingarten-Gabbay a réalisé un criblage à grande échelle du génome humain et viral afin de pouvoir détecter des nouveaux éléments *cis*-régulateurs qui permettent de recruter le ribosome indépendamment de la coiffe et d'évaluer la proportion de messagers qui en sont pourvus dans le transcriptome. Dans leur étude, ces auteurs ont utilisé un rapporteur bicistronique afin de tester la capacité à initier la traduction cap-indépendante des génomes humains et viraux ; Ils ont testé 6946 5'UTR provenant de génome humain. Leur analyse a révélé que 10% des 5'UTR testés correspondant à des transcrits englobant divers processus biologiques permettent une traduction coiffe-indépendante. Des éléments capables de promouvoir la traduction IRES-dépendante ont aussi été retrouvés dans le 3'UTR et dans les cadres de lecture ouverts de certains ARNm (Weingarten-Gabbay et al., 2016).

Système rapporteur pour mesurer l'activité IRES

Les IRES viraux sont maintenant bien connus et c'est pourquoi le parallèle entre IRES viraux et cellulaires est souvent fait. Cependant il ne faut pas s'y méprendre, la présence d'IRES chez les virus n'a pas le même objectif que pour la cellule. Les virus ont pour seul et unique but de produire le plus de protéines virales possible, c'est pourquoi leurs IRES sont souvent parmi les plus actifs. En revanche, les ARN messagers cellulaires sont coiffés et peuvent utiliser les deux mécanismes d'initiation, coiffe-dépendant et interne. C'est pour cela qu'il est difficile de distinguer la contribution des chacun. Pour étudier la capacité d'initiation interne, il est donc nécessaire d'introduire le 5'UTR dans un système rapporteur.

Stratégie du rapporteur bicistronique : l'approche consiste à cloner les séquences IRES supposées dans un plasmide entre deux gènes rapporteurs sous contrôle d'un seul promoteur, comme les luciférases de Renilla et de Firefly (luciole) ou encore la B-gal. Dans cette construction, le premier cistron est sous contrôle de la traduction coiffe-dépendante et le second cistron est sous contrôle de l'IRES (sans IRES il n'est pas traduit . Afin de calculer l'activité IRES de la séquence située entrre les deux gènes, le ratio de l'expression du second cistron sur celle du premier est mesurée. Pour s'assurer que cette activité n'est pas artéfactuelle, des contrôles sont doivent être réalisés. On peut utiliser un bicistronique comme contrôle une construction avec une tige boucle entre les deux cistrons. Si une activité IRES est observée (ration LucF/LucR), alors il faut vérifier que cela ne provienne pas de l'activité d'un promoteur cryptique ou d'un site d'épissage cryptique (Creancier et al, 2000) (Han and Zhang, 2002; Hennecke et al., 2001; Van Eden et al., 2004; Vergé et al., 2004). Afin de s'affranchir de cette hypothèse, une des approches consiste à réaliser une RT PCR quantitative de chaque cistron, si ces

derniers sont exprimés à des niveaux équivalents c'est très probablement qu'ils sont sur le même ARNm, le ratio sera alors de 1 (Creancier). On peut aussi exclure l'éventualité d'un promoteur cryptique en réalisant un test d'interférence à l'ARN contre un seul des deux cistrons, si on perd l'expression des deux, alors c'est qu'ils étaient bien sur le même ARNm. Si au contraire le cistron qui n'est pas ciblé par le siARN continue de s'exprimer alors c'est qu'il était sur un ARNm distinct et cela suggère qu'il y avait un promoteur dans la séquence putative (Weingarten-Gabbay 2016). Enfin la preuve expérimentale de l'absence d'un promoteur cryptique peut être obtenue par transfection d'un rapporteur ADN sans promoteur dans des cellules. En l'absence de promoteur, aucun ARNm n'est généré et aucune expression protéique ne devrait donc être détectée.
Il existe d'autres méthodes que l'utilisation de rapporteurs bicistroniques pour évaluer la présence d'un IRES. Ces méthodes doivent tout comme pour les rapporteurs bicistroniques être accompagnées des vérifications précédemment mentionnées.

Méthode de l'ARN circulaire : on peut synthétiser in vitro un ARN circulaire contenant un IRES putatif dans une construction circulaire. Etant donné que la traduction cap-dépendante nécessite une extrémité 5' libre, si le gène rapporteur contenu dans l'ARN circulaire est exprimé alors c'est qu'il y a eu une initiation interne. Ceci a été démontré pour la première fois par Sarnow et al (Chen and Sarnow, 1995; Prats et al., 2020).

Méthode de l'hairpin : Un troisième test consiste à introduire une épingle à cheveux (hairpin) dans l'extrémité 5' de l'ARNm afin de bloquer l'initiation coiffe-dépendante. L'épingle à cheveux bloque la traduction cap-dépendante mais ne devrait pas avoir d'effet sur la traduction médiée par l'IRES. Une mise en garde potentielle de cette approche est que si l'épingle à cheveux n'est pas introduite assez près de l'extrémité 5′ ou n'est pas assez stable, alors elle n'inhibera pas complètement la traduction cap-dépendante (Thompson, 2012).

Des expériences de traduction in vitro sont également possibles. Ces expériences sont faites sur des extraits actifs sur le plan traductionnel comme le lysat de réticulocytes de lapin. Mais les IRES cellulaires et viraux ne se traduisent pas efficacement dans les essais acellulaires.

2.2. Processus physiopathologiques impliquant une modulation de la traduction par le mécanisme IRES-dépendant

Il est intéressant de noter que de nombreux ARNm contenant des IRES codent pour des protéines qui jouent un rôle important dans la croissance, la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Cela n'est pas surprenant étant donné que ces processus cellulaires nécessitent un contrôle strict de l'expression des gènes. La traduction IRES-dépendante est un mécanisme qui permet à la cellule d'échapper au déclin global de la synthèse protéique et qui permet la traduction de messagers sélectifs, qu'il s'agisse de processus physiologiques comme le développement neuronal ou pathologiques comme l'hypoxie induite par une ischémie du myocarde, ces états contribuent à moduler l'expression génique et plus particulièrement la traduction médiée par les IRES.

2.2.1. Processus physiologiques impliquant les sites d'entrée interne des ribosomes

Les IRES jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques. Ils ne sont pas actifs dans tous les tissus in vivo, ce qui signifie qu'ils ne sont pas nécessaires dans tous les organes (Creancier J Cell Bio 2000, Mol Cell Biol 2001). Le FGF1 (fibroblast growth factor 1) a une expression importante dans le muscle squelettique et joue un rôle crucial dans la régénération musculaire (Conte et al., 2009). L'IRES de son ARNm est de fait très actif dans le muscle et le FGF1 est ainsi induit traditionnellement durant la différenciation des myoblastes (Martineau Mol Cell Biol 2004, Conte et al., 2009). Un autre facteur de croissance de la même famille, le FGF2, dont nous avons fait mention un peu plus en amont, possède également une activité IRES tissus-spécifique dans son ARNm : l'IRES est actif exclusivement dans le cerveau et dans les testicules des souris ; l'activité de IRES du FGF2 y est encore plus forte que dans les cellules en culture (Créancier et al., 2000). Il a ainsi été montré que l'IRES du FGF2 participe aux processus de spermatogenèse et de la formation des réseaux synaptiques entre les neurones (Audigier et al., 2008; Gonzalez-Herrera et al., 2006). De fait, le FGF2 est induit via son IRES durant la spermatogenèse et également durant la formation des réseaux synaptiques. (Audigier et al., 2008; Irma G. Gonzalez-Herrera et al., 2006). Les IRES sont particulièrement impliqués lors du processus de développement embryonnaire. Les IRES de c-myc et du FGF2 sont très actifs dans l'embryon de souris contrairement à ce qui a été observé chez l'adulte (Créancier et al., 2001, 2000). Une autre preuve importante de leur implication dans l'expression des gènes au cours du développement est leur découverte dans plusieurs membres de la famille des gènes HOX (Hoxa3,

Hoxa4, Hoxa5, Hoxa9 et Hoxa11) qui sont des facteurs de transcription à homéodomaines dont la principale fonction est d'orchestrer des processus de développement séquentiels au cours de l'embryogenèse (Montavon and Soshnikova, 2014). Ces processus ont pour rôle de spécifier l'organisation corporelle de l'embryon le long de l'axe tête-queue. Le mode d'activation de l'IRES est conféré par un élément TIE (Translational inhibitory Element) capable de bloquer la traduction coiffe-dépendante, garantissant ainsi que les ARNm Hox sont traduits via leur IRES (Oh et al., 1992; Xue et al., 2015, 2015). Les auteurs montrent par des alignements de séquences que la structure minimale de l'IRES de Hoxa9 est très conservée chez les vertébrés et que l'activité de l'IRES l'est aussi entre le poisson zèbre et la souris. Les auteurs, par des expériences de SHAPE, montrent que l'IRES de Hoxa9 forme une structure capable de recruter le ribosome. Ils démontrent également que cet IRES est essentiel des modèles de souris KO pour l'IRES ou du gène Hoxa9 complet ont le même phénotype : une perte des côtes sur la vertèbre T13. Enfin, de nombreux ARNm intervenant dans les processus de mitose ou d'apoptose possèdent des IRES activés en réponse au blocage de la traduction et à la séquestration du facteur eIF4E par 4E-BP1 (Holcik and Sonenberg, 2005a; Pyronnet et al., 2000; Spriggs et al., 2005).

2.2.2. La traduction IRES-dépendante en réponse au stress et dans les processus pathologiques

Le blocage de la traduction afin d'économiser de l'énergie est un mécanisme de défense des cellules qui sont soumises à des stress, aussi bien physiologiques, qu'environnementaux tel que l'hypoxie, la privation en nutriments, les chocs thermiques, le stress génotoxique ou encore le stress du réticulum endoplasmique. Ces contextes de stress peuvent survenir dans de multiples situations pathologiques. Afin de restaurer l'homéostasie, de nombreux gènes essentiels à la survie sont munis d'IRES pour continuer à être traduits et « sauver » la cellule. L'augmentation de la traduction IRES-dépendante en réponse au stress a un impact dans de nombreuses pathologies. Nous allons aborder ci-dessous de façon non exhaustive les gènes qui peuvent être induits en réponse au stress via leur IRES et les situations pathologiques associées.

Les IRES activés en réponse à l'hypoxie

Commençons par l'hypoxie, l'hypoxie survient dans de nombreuses pathologies comme les tumeurs solides par exemple qui en prenant du volume atteignent un diamètre trop important et ne sont plus irriguées correctement par les vaisseaux sanguins. La tumeur, afin d'être approvisionnée en oxygène

et en nutriments, a donc besoin de créer de nouveaux vaisseaux sanguins afin de restaurer le flux. Outre la nécessité pour la tumeur de former de nouveaux vaisseaux sanguin, elle détourne également le système lymphatique afin de pouvoir disséminer via le reseau de vaisseaux et de ganglions lymphatiques a d'autre organes (Morfoisse et al., 2015) . Il se trouve que les facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques majeurs comme ceux appartenant à la famille des FGF (fibroblast growth factor) et des VEGFC (vascular endothelial growth factor) possèdent des IRES dans leur ARNm. Ces facteurs sont induits en réponse au stress hypoxique (Braunstein et al., 2007; Conte et al., 2008a; Morfoisse et al., 2014a). L'angiogenèse et la lymphangiogenèse tumorale qui en résultent vont permettre à la tumeur de se développer et de pouvoir coloniser d'autres endroits du corps en métastasant. Un autre type de pathologies associées à l'hypoxie concerne les pathologies cardiovasculaires, comme l'ischémie d'un membre ou du cœur. Il a été montré que dans des cardiomyocytes soumises à l'hypoxie, de nombreux IRES de facteurs de croissance des familles FGF (le FGF1 et le FGF2) et VEGF (VEGFA, VEGFC et VEGFD) sont induits de manière précoce (4 à 8h) (Hantelys et al., 2019). Enfin une autre étude démontre que l'IRES de l'ARNm FGF1 est activé dans un cœur ischémique *in vivo* dans un modèle murin d'ischémie du myocarde (Renaud-Gabardos et al., 2018). La traduction IRES-dépendante dans ce cas de figure permet une réponse angiogénique rapide qui contribue à la survie des cardiomyocytes. Les facteurs de croissance ne sont pas les seuls à être régulés en cas de stress hypoxique, le proto-oncogène c-myc mais aussi le récepteur du facteur de croissance à l'insuline (IGF1R) sont régulés positivement par l'hypoxie via leur IRES. Le facteur majeur de la réponse au stress hypoxique HIF est lui aussi contrôlé traditionnellement par la traduction IRES-dépendante (Lang et al., 2002). Ces données mettent en évidence le fort impact physiopathologique de la traduction dépendante de l'IRES pour stimuler l'angiogenèse et la lymphangiogenèse tumorales et non tumorales en réponse à l'hypoxie.

Les IRES activés en réponse au stress du RE

Le stress du réticulum est le point de chute vers lequel convergent presque tous les stress cellulaires. De nombreuses études font le lien entre le stress du RE et le cancer. En effet les tumeurs, par des conditions microenvironnementales défavorables (privation en nutriment, hypoxie), la surproduction de ROS (Reactive Oxygen species). Les traitements générant des stress génotoxiques, créent un environnement hostile qui perturbe l'homéostasie du RE. L'IRES du proto-oncogène c-myc est activité en réponse au stress du RE dans les cellules de myélome. En effet le stress du RE entraîne un blocage de mTORC1 et l'activation de la voie UPR, ces deux signaux convergeant vers une inhibition de la traduction canonique, l'IRES présent sur l'ARNm c-myc lui garantit une traduction maintenue.

Dans ce cadre, les auteurs proposent que l'inhibition de l'IRES de c-myc pourrait être une cible thérapeutique prometteuse lors d'un stress du RE, rendant les cellules plus sensibles aux anti-cancéreux (Shi et al., 2016). Les IRES des facteurs angiogéniques peuvent également être activés par le stress du RE dans un contexte ischémique. En effet, la privation en oxygène induite par l'ischémie provoque un stress du RE et il a été montré que les ARNm du VEGFA et du FGF2 continuent à être traduits via leur IRES, cela se produit via la signalisation de la kinase PERK (Philippe et al., 2016). L'IRES présent dans l'ARNm de Staufen1 peut aussi répondre au stress du RE. Cette protéine est impliquée dans le transport des ARNm et elle est également recrutée dans les granules de stress en cas des stress du RE afin de réduire leur assemblage et de garantir une meilleure survie des cellules (Thomas et al., 2009). Stau1 possède un IRES dans le 5'UTR de son ARNm qui est activé en réponse au stress du RE (et au stress hypoxique également). C'est la kinase PERK qui est la principale kinase régulatrice de l'activité IRES de stau1 (Bonnet-Magnaval et al., 2016). Enfin, les IRES d'ARNm codant de nombreux autres facteurs comme c'est le cas des facteurs anti et pro apoptotiques XIAP et APAF-1, de p53, et bien d'autres (Godet et al., 2019; Holcik and Sonenberg, 2005a) sont activés en réponse au stress du RE.

Les IRES activés par le stress génotoxique

Le stress génotoxique active l'IRES de l'ARNm Myc (Subkhankulova et al., 2001). Plusieurs facteurs impliqués directement dans la réponse au stress génotoxique comme la gardienne du génome p53, sa cible transcriptionnelle, la p27 , sont induits par des mécanismes IRES-dépendants (Halaby and Yang, 2007). L'apoptose est une conséquence directe du stress génotoxique. Un stress trop intense conduira à une mort des cellules par apoptose. MDM2 (mouse double minute 2), acteur majeur de la réponse au stress génotoxique, est capable de réguler l'IRES du facteur apoptotique XIAP. Il se lie à l'IRES de XIAP dans le 5'UTR et régule positivement son activité. Le stress génotoxique entraine une déphosphorylation et une relocalisation de MDM2 au cytoplasme et c'est ainsi qu'il agit sur l'IRES de XIAP. Cette augmentation de XIAP dans les cellules cancéreuses entraîne une résistance des cellules à l'apoptose induite par l'irradiation (Gu et al., 2009).

De nombreux autres stress peuvent conduire à l'activation de la traduction IRES-dépendante : Le choc thermique, qui induit l'expression du VEGF-D via son IRES et promeut la lymphangiogenèse tumorale (Morfoisse et al., 2016), la privation en nutriment, les toxines et encore l'infection virale (Godet et al., 2019).

De nombreux stress et pathologies conduisent à une apoptose des cellules. Dans ce contexte, le processus de traduction coiffe-dépendante est bloqué, suite au clivage de eIF4G par les caspases activées durant l'apoptose. Cependant, la synthèse des protéines nécessaires au processus d'apoptose ne s'arrête pas. Deux régulateurs clé de l'apoptose, le facteur pro-apoptotique APAF1 ainsi que la protéine anti-apoptotique XIAP ont leurs ARNm traduits par un mécanisme IRES-dépendant (Coldwell et al., 2000; Holcik et al., 1999; Holcik and Sonenberg, 2005a). De même, les ARNm des facteurs associés à l'apoptose, c-myc et p53, possèdent des IRES actifs lors de l'apoptose (Ray et al., 2006; M. Stoneley et al., 2000). La plupart des stress peuvent conduire à l'apoptose.

Un dysfonctionnement de la traduction IRES-dépendante est associé à de nombreuses pathologies. Entre autres, une mutation dans l'IRES de c-myc entraîne sa surexpression et est associée au myélome multiple (Chappell et al., 2000). Plus récemment, une augmentation aberrante de la traduction IRES-dépendante des ARNm de gènes clés du cancer a été signalée dans les cellules cancéreuses, incluant les ARNm des principaux facteurs angiogéniques FGF1, FGF2 et VEGFA, ainsi que de c-myc et du récepteur IGF1R (Insulin-like growth factor receptor) (Marcel et al., 2013). L'IRES de l'ARNm de la gardienne du génome p53 est lui aussi sujet à une régulation positive dans le cadre d'un contexte tumoral. P53 régule négativement la fibrillarine, donc dans les tumeurs où p53 est mutée, la fibrillarine est surexprimée et les ARNr sont davantage méthylés ce qui entraîne une augmentation de la traduction IRES-dépendante (nous détaillerons cette étude un peu plus loin dans la partie dédiée aux modifications des ARNr) (Marcel et al., 2013).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, beaucoup d'IRES viraux et cellulaires ont besoin de facteurs d'initiation canoniques pour leur activité. Mais ce n'est pas tout, la plupart des IRES et particulièrement les IRES cellulaires requièrent la présence de facteurs auxiliaires pour fonctionner. Ces facteurs sont appelés ITAF (*IRES Trans Acting Factor*).

2.3. Les facteurs régulateurs des IRES : acteurs clés de la réponse au stress

Les messagers qui contiennent des IRES sont de puissants régulateurs des grandes fonctions biologiques, c'est pourquoi leur fonction doit être étroitement régulée. La régulation de la traduction IRES-dépendante est en grande partie réalisée par les ITAF, bien que la nécessité de ces protéines ne soit pas absolue et semble être spécifique à chaque IRES. Le premier ITAF identifié a été la PTB dont

nous avons précédemment fait mention dans la partie sur les IRES viraux (Godet et al., 2019; Kolupaeva et al., 1996). A ce jour, un nombre important d'ITAF a été découvert, contrôlant la traduction IRES-dépendante de nombreux transcrits différents dans de nombreux contextes de stress et avec une spécifié spatio-temporelle précise. Ils jouent un rôle essentiel dans la réponse cellulaire aux conditions de stress et dans de nombreux autres processus physiologiques, notamment la différenciation et la prolifération cellulaires, la régulation de la migration et de l'invasion, la progression du cycle cellulaire ou l'apoptose. Il a été montré que la régulation par les ITAF favorise l'expression de nombreux ARNm oncogénique (Godet et al., 2019). Outre le cancer, l'initiation de la traduction contrôlée par l'IRES et les ITAF a été étroitement liée à d'autres pathologies, telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, les atrophies musculaires et d'autres maladies génétiques.

Ces facteurs d'origine nucléique ou protéique, peuvent être des régulateurs positifs de la fonction IRES ou négatifs et exercer leur contrôle à travers une grande variété de mécanismes dont nous explorerons l'étendue dans la partie qui va suivre (Godet et al., 2019).

2.3.1. Un ITAF pour plusieurs IRES et plusieurs ITAF pour un IRES

Un ITAF commun pour plusieurs IRES

Malgré l'absence de structure secondaire ou tertiaire spécifique conservée entre les différents IRES cellulaires, il existe certains ITAF communs à différents IRES, comme c'est le cas de la PTB qui interagit avec plusieurs IRES aussi bien cellulaires que viraux. Elle a été décrite pour la première fois en tant qu'ITAF de l'IRES d'EMCV puis dans la régulation de l'activité de plusieurs IRES de virus comme le HCV, poliovirus ou encore le FMDV et d'IRES cellulaires comme ceux de p53, APAF-1, VEGFC (Godet et al., 2019; Jang and Wimmer, 1990; Romanelli et al., 2013). Les sites de liaisons de la PTB avec les IRES d'EMCV et d'APAF-1 ont été cartographiés. La liaison de la PTB sur l'IRES d'EMCV dépend de six sites dont deux sont d'une importance capitale pour l'activité de l'IRES. Pour l'IRES de APAF-1, deux sites de liaisons ont été identifiés (Jang and Wimmer, 1990; Kolupaeva et al., 1996; Mitchell et al., 2003). Pour les deux IRES, les sites de liaison cruciaux se situent dans des boucles. Unr (upstream of N-ras) est un autre ITAF de APAF-1 qui se lie dans une boucle riche en purine (Mitchell et al., 2003). Dans cette étude les auteurs montrent que la PTB et Unr agissent comme des chaperonnes pouvant modifier la conformation de l'IRES. En effet, ils montrent qu'en présence de l'Unr, les boucles sont ouvertes et que la PTB peut s'y lier plus facilement pour recruter le ribosome.

Un autre exemple d'ITAF qui agit sur différents IRES est la protéine ribosomique RPS25. Cette protéine ribosomique a été rapportée depuis plusieurs années comme impliquée dans la régulation de la traduction IRES-dépendante de nombreux IRES viraux et cellulaires (nous décrirons son rôle et ses cibles plus tard dans ce manuscrit)(Hertz et al., 2013). Parmi les nombreux exemples d'ITAF, on peut encore citer DAP5, hnRNPA1, nucléoline… Les ITAF peuvent contrôler à la fois des IRES viraux et cellulaires et peuvent agir sur nombre d'IRES différents. Ces observations concernant la régulation d'IRES très différents par plusieurs ITAF indiquent que les ITAF agissent sans doute par des mécanismes d'action différents. Ces mécanismes ont été répertoriés (Godet et al, 2018). Les IRES cellulaires à la différence des IRES viraux sont très tissu-spécifiques (Créancier et al., 2000). Cela indique que des ITAF exprimés spécifiquement dans certains tissus ou types cellulaires pourraient participer à ce contrôle spécial de l'activité de l'IRES. Des ITAF spécifiques pourraient réguler des groupes d'ARNm de manière coordonnée, définissant ainsi des régulons. La protéine RPL38 peut être prise comme exemple : elle a été identifiée comme régulant spécifiquement les IRES de plusieurs gènes HOX pendant le développement embryonnaire exclusivement (Xue et al., 2015). De plus le même ITAF peut être un activateur ou un inhibiteur en fonction de l'IRES ciblé. Les nombreux ITAF identifiés et leurs multiples cibles ont été très exhaustivement référencés dans la revue de Godet et al 2019 (Godet et al., 2019).

Plusieurs ITAF pour un IRES

Réciproquement, le même IRES peut être régulé par différents ITAF, c'est le cas de l'IRES de p53 par exemple (Ji et al., 2017). L'ARNm p53 possède deux IRES qui génèrent deux isoformes en condition de stress génotoxique : Une isoforme entière et une plus petite tronquée en N-ter par une initiation à un codon plus tardif (ΔN-p53) (Ray et al., 2006; Yang et al., 2006). En condition de stress, plusieurs ITAF régulent positivement les IRES de p53 : en condition de stress génotoxique induit par la doxorubicine, la PTB est transloquée du noyau au cytoplasme et régule positivement l'activité des deux IRES (Grover et al., 2008). D'autre protéines favorisent l'activité de l'IRES de p53 : DAP5, PSF et l'annexine2 induisent une régulation positive qui génère préférentiellement la petite isoforme (Ji et al., 2017; Sharathchandra et al., 2012; Weingarten-Gabbay et al., 2014). Les facteurs TCP80 et l'ARN helicase RHA ont eux aussi été décrits comme des régulateurs positifs de l'IRES de p53 en cas de stress génotoxique (Halaby et al., 2015b). De plus, deux autres protéines, la protéine ribosomale L26 (RPL26) et la nucléoline, se sont avérées avoir un effet positif ou négatif sur l'induction de p53, respectivement (Takagi et al., 2005a). RPL26 et la nucléoline se lient au 5′UTR de l'ARNm p53 et

contrôlent l'induction et la synthèse de p53 après une lésion de l'ADN. De la même façon, on a découvert que de nombreux autres ITAF potentiels des IRES p53 se lient au 5′UTR de p53 et affectent les niveaux de p53. Certaines protéines, comme la hnRNPQ, régulent positivement l'expression de p53, tandis que d'autres, comme Pdcd4 et FBL (fibrillarine), la régulent négativement (Kim et al., 2013; Wedeken et al., 2011). Il est probable que de nombreux IRES, comme c'est le cas des IRES de p53, soient régulés par un complexe protéique plutôt que par un ITAF unique. La composition de ce complexe, appelé IRESome, varie selon les IRES et constitue probablement un moyen de réguler spécifiquement l'activité de l'IRES. La présence de différents partenaires dans le complexe peut également nous aider à comprendre pourquoi un ITAF donné peut-être négatif ou positif en fonction de l'IRES (Godet et al., 2019).

Nature des ITAF

On peut répartir les ITAF en différentes classes : De nombreuses ITAF sont capables de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme et cette localisation subcellulaire est critique pour leur rôle de régulateur des IRES dans des conditions de stress. On peut prendre l'exemple de la PTB qui se relocalise au cytoplasme en réponse aux dommages à l'ADN et active les IRES de p53 (Grover et al., 2008; Lewis et al., 2007). D'autres ITAF nucléaires, comme hnRNPA1, la p54^{nrb}/Nono ou encore la nucléoline peuvent réaliser ce switch (Ainaoui et al., 2015; Morfoisse et al., 2016) . Il y a également les ITAF qui sont exclusivement cytoplasmiques comme les facteurs associés au ribosome ou les protéines ribosomiques elles même, cette classe peut également concerner des protéines qui ne sont pas associées à la machinerie de traduction comme la protéine vasohibine qui régule l'IRES du FGF1 et qui est majoritairement cytoplasmique (Hantelys et al., 2019). La troisième et dernière catégorie comporte de long ARN non codants (lnc). Plusieurs long ARN non codants régulent la traduction notamment en réponse au stimulus physiologiques ou au stress (Godet et al., 2023). Le premier longARN non codant identifié comme ITAF a été UCA1 (Urothelial carcinoma associated 1), ce dernier est capable d'interagir avec hnRNPI (qui est un ITAF positif) et réguler la traduction de l'ARNm p27^{kip} (Huang et al., 2014). UCA1 en séquestrant hnRNPI régule négativement la traduction de p27^{kip}. P27 est un suppresseur de tumeur, donc l'inhibition de sa traduction par UCA1 favorise la croissance tumorale. Le longARN non codant TRMP a lui aussi été identifié comme ITAF négatif de p27, il agit via une compétition de liaison avec la PTBP1 pour la liaison à l'ARNm de p27 (Yang et al., 2018a).

Les ITAF sont nombreux, de nature et de localisation très différentes. Cette différence notable provient du fait que ces facteurs ne sont pas seulement des régulateurs de l'activité des IRES mais sont impliqués dans un nombre important et varié d'autres processus biologiques. Le facteur p54^{nrb} par exemple qui régule les IRES de nombreux ARNm a également un rôle de facteur de transcription, qui agit sur l'activité du promoteur du FGF1 (Ainaoui 2015). Les hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) sont des facteurs d'épissage alternatif. Cette variété de rôles extra-traductionnels confère aux ITAFs des localisations et des natures variables, ainsi, il ne fait aucun doute que leurs mécanismes d'action sur les IRES sont eux aussi très variables. Leur capacité à transiter du noyau au cytoplasme est importante dans leur rôle sur la traduction médiée par les IRES. Ainsi, de nombreuses protéines comme la hnRNPA1, la PTB, la nucléoline sont transloquées vers le cytoplasme en réponse à divers stress (Cammas et al., 2007; Grover et al., 2008; Morfoisse et al., 2016). La nucléoline par exemple est transloquée au cytoplasme où elle active l'IRES du VEGFD et favorise la lymphangiogenèse en réponse au choc thermique. La localisation et par extension l'activité des ITAF peuvent aussi être régulées par des modifications post-traductionnelles. La RBM4 (RNA-binding motif) qui joue initialement un rôle dans l'épissage alternatif est phosphorylée sur sa serine 309 en condition d'exposition à l'arsenite et elle est ensuite relocalisée au cytoplasme dans les granules de stress. Dans ces conditions, RBM4 inhibe la traduction coiffe-dépendante par liaison avec un motif riche en CU dans le 3'UTR des ARNm et active la traduction IRES-dépendante probablement en favorisant l'association des ARNm avec eIF4A (Lin et al., 2007). La méthylation de hnRNPA1 sur son motif riche en glycine-arginine est requise pour qu'elle puisse exercer son contrôle sur l'IRES de la cycline D1, de c-myc, et du facteur hypoxique HIF1a-α (Gao et al., 2017).

2.3.2. Mécanismes d'actions des ITAF

Nous allons maintenant faire un petit tour d'horizon des différents mécanismes par lesquels les ITAF exercent leur activité sur les IRES. Ces différents mécanismes ont été très largement décrits et extrêmement bien illustrés dans la revue de Godet et al (Godet et al., 2019). Précisons que les mécanismes d'action décrits ci-dessous ne sont pas exclusifs et que certains ITAF peuvent utiliser plusieurs de ces mécanismes à la fois (Figure 10).

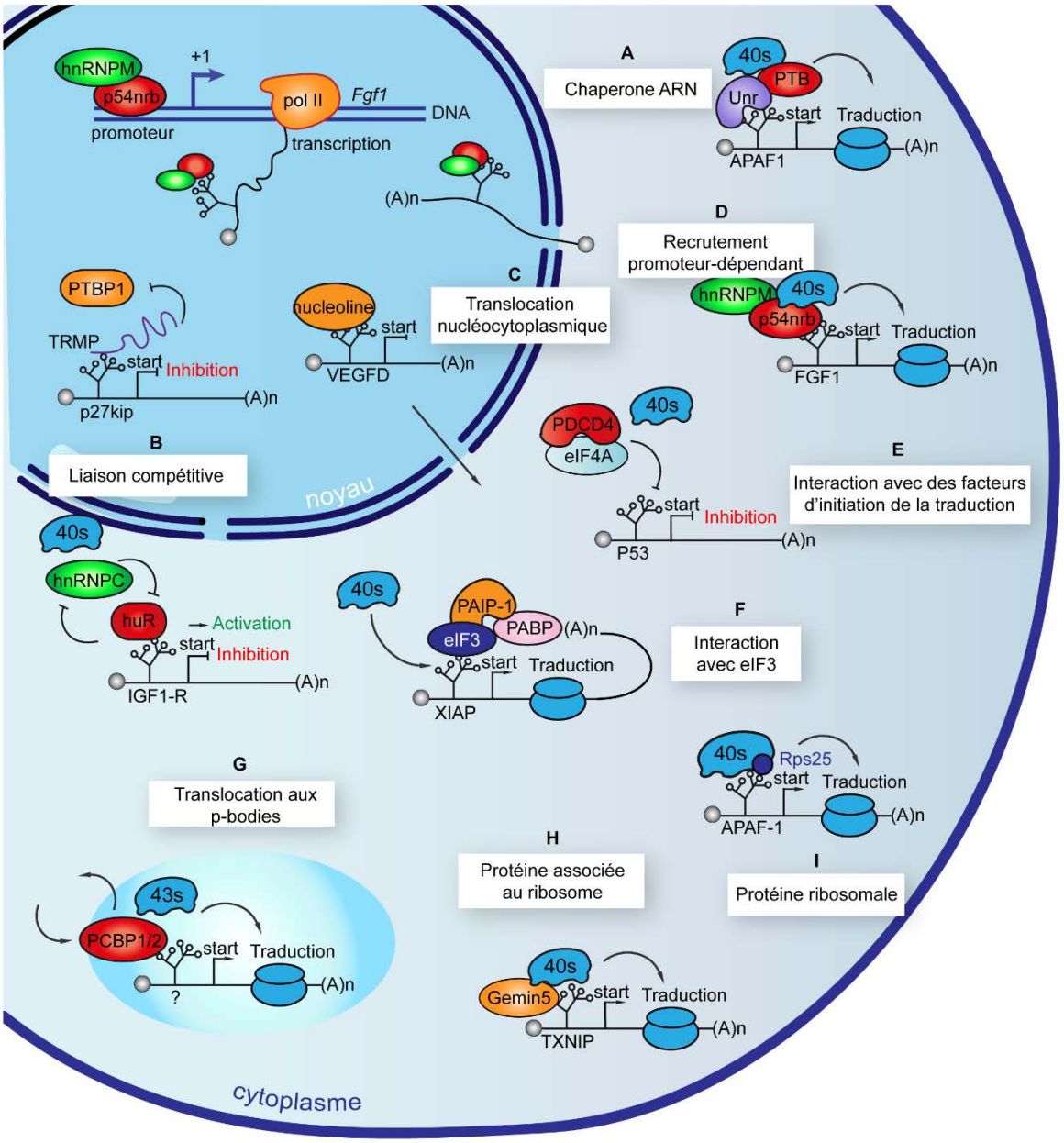


Figure 10 : Mécanismes d'action des ITAF. D'après Godet et al 2019.

Chaperonne

Le premier ITAF décrit, la PTB, exerce son activité par un mécanisme de chaperonne. PTB et Unr activent l'IRES de APAF-1 en modifiant la structure secondaire de l'IRES (Mitchell et al., 2003). La première à se lier est Unr, qui se lie sur deux motifs en tige et boucle et induit un changement de conformation de l'IRES qui permet à la PTB se lier à ses sites de liaison. La PTB induit elle aussi un changement de conformation qui va permettre à la petite sous-unité du ribosome d'être recrutée. Les interactions de la PTB et de la PCBP1 avec leurs sites de liaison sur l'IRES perturbent de nombreuses

interactions ARN-ARN et créent une région non structurée d'environ 40 nucléotides pour permettre la liaison des ribosomes (Pickering et al., 2004).

Compétition

Les ITAF peuvent agir de façon compétitive sur un même IRES. Par exemple, Hur et hnRNPC sont en compétition pour leur liaison à l'IRES du facteur IGF1R. L'IRES de IGF1R est inhibé par la liaison de HuR et en revanche activé par la liaison de hnRNPC. Les auteurs montrent que hnRNPC entre en compétition avec HuR pour la liaison de l'IGF-IR 5'-UTR et améliore l'initiation de la traduction médiée par l'IRES d'une manière dépendante de la concentration. En outre, les auteurs montrent que dans des cellules de tumeurs mammaires T47D où IGF1R est fortement induit via son IRES, hnRNPC est fortement lié au 5'UTR de l'IGF1R tandis que HuR non. Alors que dans les cellules de tumeurs mammaires MCF-10A où l'activité de l'IRES de IGF1R est plus faible, le schéma de liaison des protéines HuR et hnRNPC est inversé. (Meng et al., 2008). Un autre exemple de mécanisme compétitif est celui de l'ARNlnc TRMP (a p53-inducible long noncoding RNA) qui inhibe l'activité IRES de p27kip en entrant en compétition avec l'IRES pour la liaison à la PTB et en empêchant ainsi l'activation de l'IRES médiée par la PTB (Yang et al., 2018b). Un long ARN non codant comme ITAF est une découverte très intéressante qui pourrait bien s'étendre à d'autre lnc ARN dans les années à venir.

Translocation nucléo-cytoplasmique

Le mécanisme translocation nucléo-cytoplasmique concerne de nombreux ITAF capables de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme pour exercer leur fonction régulatrice des IRES. Plusieurs possibilités sont envisageables, l'ITAF peut être transloqué vers le cytoplasme dans des conditions de stress par exemple pour se lier dans le cytoplasme à l'ARNm contenant l'IRES. La liaison pourrait également se faire dans le noyau et le complexe être exporté au cytoplasme. Dans le second cas, alors l'ITAF pourrait jouer un rôle dans la rétention de l'ARNm au noyau dans des conditions normales et activer son export au cytoplasme pour être traduit dans des conditions de stress. Pour le cas de figure numéro 1, prenons l'exemple de la liaison de Unr et de la PTB à l'IRES d'APAF-1 : la localisation presque exclusivement cytoplasmique de Unr indique que la liaison ne peut avoir lieu que dans le cytoplasme (Mitchell et al., 2003). Cependant, plusieurs études indiquent qu'un passage par le noyau est nécessaire pour la liaison de certains ITAF : les IRES FGF1 et c-myc ou encore smad5 ne sont activés que dans le cas où le rapporteur est un ADN alors que si les cellules sont transfectées avec un

ARNm contenant exactement la même cassette d'expression ces IRES sont inactifs (Ainaoui et al., 2015; Shiroki et al., 2002; M. Stoneley et al., 2000). Ces observations indiquent que l'étape de transcription est nécessaire et qu'il faut un passage par le noyau. Il est à noter que ce n'est pas le cas pour les IRES viraux comme EMCV (Ainaoui et al, 2015). Dans l'étude par Ainaoui *et al*, le mécanisme de passage nucléaire a été décrypté pour l'IRES du FGF1, avec les ITAF hnRNPM et $p54^{nrb}$: l'activité de l'IRES du FGF1 dépend de la liaison des ITAFs au promoteur du gène FGF1. L'hypothèse émise est que la liaison des ITAFs au promoteur pourrait favoriser leur recrutement sur l'IRES de l'ARNm naissant. Ainsi il est apparu que dans ce cas-là l'activité de l'IRES est régulée de manière promoteur-dépendante (Ainaoui et al., 2015). Au contraire, dans l'étude de Morfoisse et al (2016), la nucléoline (protéine nuléolaire) se relocalise au cytoplasme après le choc thermique afin de promouvoir l'activité IRES du VEGFD (Morfoisse et al., 2016). Cette étude ne permet pas de statuer sur la liaison nucléaire ou cytoplasmique de la nucléoline : celle-ci peut soit être exportée après le choc thermique et se lier à l'IRES dans le cytoplasme ou s'y lier dans le noyau et être exportée en complexe avec l'IRES. Comme cité un peu plus haut, un évènement peut être nécessaire pour l'activité de l'IRES et plus précisément un passage forcé par un évènement de transcription.

Interaction avec des facteurs d'initiation de la traduction

L'interaction de l'IRES avec des facteurs d'initiation de la traduction est un mécanisme cytoplasmique. Prenons l'exemple de PDCD4 qui est un ITAF : son interaction avec le facteur d'initiation eIF4A bloque l'activité hélicase de eIF4A et inhibe l'activité IRES de plusieurs ITAF dont p53, IGF1R, BcL-XL et XIAP. PDCD4 empêche l'hélicase 4A de dérouler l'ARN ce qui empêche la liaison de la sous-unité 40S (Liwak et al., 2012; Wang and Yang, 2018). eIF3 est requis pour l'activation de nombreux IRES viraux mais également pour les IRES cellulaires, il se lie directement à l'IRES de XIAP via un domaine structurel qui se situe proche du codon initiateur. La liaison d'eIF3 avec PABP potentialise le recrutement du ribosome à l'IRES. De plus, les auteurs montrent que l'interaction avec la protéine PAIP-1 avec eIF3 et PABP augmente le recrutement du ribosome. Le modèle proposé par les auteurs est le suivant : eIF3 se lie directement à l'ARN XIAP IRES en fonction de sa structure et agit comme un échafaudage pour l'ARN IRES, PABP et le ribosome 40S (Thakor et al., 2017).

La translocation dans des granules de stress et des P-bodies

Les granules de stress, comme leur nom l'indique, sont induites en réponse au stress. Lorsqu'eIF2α est phosphorylé, ces complexes emplis de 43S bloqué se forment dans le cytoplasme. Les P-bodies quant

à eux s'assemblent également pendant le stress, ils intègrent des ARNm qui doivent être dégradés car non traduits. Plusieurs ITAF ont été retrouvés associés à ces corps de stress comme la PTB par exemple. Un des composants importants des granules de stress, G3BP1 (GTPase SH3 stress granule assembly factor1), a été caractérisé comme un ITAF inhibiteur de l'IRES du FMDV (Galan et al., 2017). IL interagit aussi avec deux autres ITAF activateurs. Le rôle de G3BP1 serait donc de séquestrer l'ARNm du virus ainsi que les ITAF qui sont nécessaires à son activation (Godet et al., 2019). L'exemple illustré dans la figure 10 est celui de la translocation de PCBP1 et 2 entre le cytoplasme et les P-bodies (Fujimura et al., 2009). Ces auteurs suggèrent que les PCBP pourraient jouer un rôle dans le passage rapide de certains ARNm non traduits à un état actif sur le plan de la traduction.

Association avec des constituants du ribosome ou des facteurs associés

Plusieurs protéines associées au ribosome ont été identifiées comme étant des ITAF. C'est le cas de la protéine RACK1 qui est associée à la sous-unité 40S. RACK1 est un ITAF des IRES de HCV , CrPV et d'autres IRES viraux (LaFontaine et al., 2020; Majzoub et al., 2014). La protéine Germin5, qui est associée au P-bodies, est aussi associée aux ribosomes. Elle inhibe l'activité de l'IRES de FMDV (Piñeiro et al., 2013). C'est également un ITAF positif pour l'IRES de la TXNIIP (Lampe et al., 2018). Enfin, depuis quelques années, il apparait que des protéines ribosomiques participent à la régulation de la traduction de messagers spécifiques via la traduction IRES-dépendante. La protéine RPS25 a été la première à être identifiée en tant qu'ITAF des IRES de CrPV et de HCV (Landry et al., 2009). Depuis, d'autres études ont montré que les IRES viraux ne sont pas les seuls à bénéficier d'une régulation par la RPS25 mais que de nombreux IRES cellulaires comme c-myc, p53 ou encore APAF-1 sont aussi régulés positivement par la protéine ribosomique (Hertz et al., 2013). D'autres protéines ribosomiques ont un rôle régulateur de la traduction IRES-dépendante : c'est le cas de RPL38, RPL10A , qui se comportent comme des ITAF capables de réguler la traduction de messagers spécifiques. La capacité de protéines ribosomiques à réguler la traduction IRES-dépendante a mis fin à un dogme ancestral stipulant que le ribosome était comme un appareil capable de traduire le code génétique sans avoir de capacité de régulation intrinsèque. Aujourd'hui il a révélé sa capacité à traduire des messagers spécifiques en fonction de sa composition, d'où la naissance du concept de « ribosome spécialisé ». Une grande partie de mon travail de thèse a porté sur la recherche de ribosomes spécialisés en cas de stress. Je détaillerai donc de la façon la plus exhaustive possible cette notion dans la partie 3 de mon introduction.

Partie 2 : Neat1 et les paraspeckles : régulateurs de l'expression génique en réponse au stress

En biologie moléculaire et cellulaire, on apprécie de plus en plus le rôle des condensats biomoléculaires, ou organites membranaires, dans la construction de compartiments dynamiques dans la réponse au stress cellulaire qui agissent sur la régulation des gènes. Nous allons au cours de cette partie nous intéresser à un corps nucléaire du nom de paraspeckle, ce corps nucléaire contient de nombreux ITAF et pourrait bien être la clé d'un mécanisme de régulation traductionnelle encore inconnu et palpitant.

1. Les corps sans membrane dans le contrôle de l'expression génique : zoom sur les paraspeckles

1.1. Les corps sans membrane : des régulateurs de l'expression génique en réponse au stress

Il existe dans les cellules eucaryotes une hiérarchie organisationnelle très précise permise par la compartimentalisation des fonctions. Ces compartiments sont appelés des « organites » et peuvent être pourvus ou non de membranes pour les séparer de l'environnement nucléaire ou cytosolique. Intéressons-nous tout particulièrement aux organites sans membrane. Tout comme les organites à membranes, ils contribuent à la compartimentalisation cellulaire des fonctions biologiques spécifiques. Ils existent sous forme de gouttelettes liquides à l'intérieur de la cellule et résultent de la condensation du matériel cellulaire dans un processus appelé séparation de phase liquide-liquide. (Gomes and Shorter, 2019). Les organites cellulaires dynamiques qui se forment sans frontière membranaire fascinent depuis longtemps les scientifiques. Les interactions multivalentes entre les protéines et/ou les acides nucléiques sont des forces motrices importantes de la formation de ces corps sans membrane par la séparation de phase liquide-liquide (LLPS). Ces corps nucléaires ou cytoplasmiques sont des

structures du nucléoplasme ou du cytosol qui remplissent les conditions suivantes : (1) ils sont visibles au microscope (au moins pendant certaines périodes du cycle cellulaire) ; (2) ils concentrent des facteurs nucléaires ou cytoplasmique spécifiques, à savoir des protéines et des ARN et (3) ils échangent constamment leurs composants avec le nucléoplasme ou le cytoplasme environnant. Ces corps se présentent sous diverses formes, allant de sphères à des structures de forme irrégulière. Chez les organismes eucaryotes, des dizaines de corps sans membrane (CSM) ont été identifiés : dans le noyau, on retrouve notamment les nucléoles, les corps de Cajal, les paraspeckles, les speckles nucléaires, les corps polycomb et les corps de la leucémie promyélocytaire (PML). Le cytoplasme contient également plusieurs organites sans membrane, notamment les P-bodies et les granules de stress. De nombreux CSM contribuent à la régulation des gènes à travers différents mécanismes, en séquestrant des facteurs spécifiques, les CSM favorisent les réactions biochimiques en concentrant simultanément les substrats et les enzymes, et/ou en supprimant l'activité des facteurs séquestrés ailleurs dans la cellule. La formation de CSM spécifiques est induite en réponse à divers stress causés par les changements de température, la pression osmotique, les radiations et les produits chimiques qui endommagent souvent l'ADN.

Dans la partie qui va suivre nous allons décrire brièvement le rôle des différents CSM identifiés à ce jour et comment ils peuvent servir de plateforme à régulation et à l'expression des gènes et dans la réponse au stress.

1.1.1. Les corps sans membrane cytoplasmiques

Les P-bodies sont des granules cytoplasmiques de ribonucléoprotéines (RNP) principalement composés d'ARNm réprimés au niveau de la traduction et de protéines liées à la dégradation et à la répression traductionnelle de l'ARNm. Les granules de stress sont formés en réponse à divers stress environnementaux comme ceux associés à des produits chimiques (par exemple, l'arsénite), à la lumière UV, à la chaleur et aux radicaux oxygène. La formation de granules de stress est induite par un arrêt global de la traduction dans des conditions de stress, entraînant l'accumulation de RBP associées à des ARNm non associés au ribosome, qui se condensent ensuite pour former des granules de stress (Ivanov et al., 2019). Elles contiennent plus de 200 protéines, dont la plupart sont des RBP impliquées dans diverses formes de contrôle post-transcriptionnel, telles que la stabilité de l'ARNm et le contrôle de la traduction. Des RBP spécifiques, notamment G3BP1 et G3BP2, UBAP2L, TIA1, TTP, FMRP et CAPRIN1, agissent comme des facteurs de nucléation des granules de stress. Ils sont

composé d'ARNm bloqués en traduction et de nombreux facteurs de traduction (Ivanov et al., 2019; Luo et al., 2018; Protter and Parker, 2016).

1.1.2.Les corps nucléaires sans membranes

Les nucléoles : Les nucléoles (que nous avons précédemment abordés en détail) sont les sites d'initiation de la biogenèse des ribosomes. Les nucléoles sont formés au niveau de locus d'ADNr actifs sur le plan de la transcription. Leur nombre (généralement deux à cinq par cellule), leur taille et leur forme varient en fonction du type de cellule et des conditions et sont principalement corrélés au niveau de transcription du pré-ARNr par l'ARN polymérase I (Lafontaine et al., 2021). Les corps de Cajal : sont le site d'assemblage et de maturation des snRNP (small nuclear ribonucleoprotein) et font partie du complexe d'épissage : le spliceosome. Les speckles nucléaires peuvent servir de sites de stockage et/ou de modification, ils contiennent divers snRNP et facteurs d'épissage ainsi que de très nombreuses protéines impliquées dans la maturation et l'export des ARN. Leur fonction est donc d'être un « réservoir » de facteurs d'épissage et notamment en cas d'inhibition de la transcription. Ainsi, ils peuvent être considérés comme tamponnant activement les niveaux nucléoplasmiques des facteurs de transcription et de l'épissage de l'ARN (Chen and Belmont, 2019). Il a également été proposé que les speckles nucléaires soient des centres d'expression génique, qui favorisent la transcription et les processus co-transcriptionnels tels que l'épissage, grâce au recyclage rapide des facteurs. De plus, une analyse a révélé que de nombreux gènes actifs se localisent à proximité des speckles (Quinodoz et al., 2018). L'ARNm a tendance à être situé loin du centre du speckle nucléaire, ce qui suggère un modèle dans lequel les speckles ont un noyau protéique agissant comme un réservoir, entouré d'une enveloppe d'ARN active et en cours d'épissage. Les corps PML interviennent dans de nombreuses voies cellulaires, y compris la réparation de l'ADN, la sénescence, la réponse au stress et le contrôle de la transcription, en séquestrant, modifiant et dégradant de nombreux facteurs de transcriptions. Enfin les paraspeckles sont induits en réponse au stress et sont impliqués dans la rétention nucléaire de certains ARNm édités d'adenosine en inosine et de facteurs de transcription. Cette rétention est modifiée en cas de stress environnemental, ce qui constitue un mécanisme de contrôle de l'expression des gènes (Fong et al., 2013; Staněk and Fox, 2017). Les paraspeckles sont impliquées dans les processus de développement, les réponses au stress, divers types de cancer et d'infection virale, bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents à leurs fonctions physiologiques restent pour le moment largement méconnus.

Au-delà d'un simple outil organisationnel, la concentration des composants cellulaires dans des organites sans membrane permet d'harmoniser les réactions biochimiques et d'améliorer l'aptitude cellulaire en cas de stress en régulant l'expression génique. Dans la partie qui va suivre, nous allons tout particulièrement nous intéresser aux paraspeckles, de leur découverte en 2002 à leur structure, leur apparition en condition de stress, leur implication dans un nombre important de pathologies et enfin leur fonction dans le contrôle de l'expression génique.

2. Les paraspeckles et leur découverte

Les paraspeckles sont de petit corp nucléaire de taille irrégulière retrouvés dans la région interchromatinienne des cellules. Ils sont composés de multiples protéines ainsi que d'un long ARN non codant du nom de NEAT1 (nuclear enriched abundant transcript 1). Des paraspeckles de taille et d'abondance variables sont présents dans le noyau de la plupart des cellules en culture, y compris les lignées cellulaires primaires et transformées, mais sont absents des cellules souches embryonnaires et des cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Ce sont des structures sensibles à la RNase, dont la formation dépend de la transcription de l'ARN Neat1 par l'ARN pol II. Ils sont impliqués dans le contrôle de l'expression génique, notamment de par leur capacité à séquestrer des ARNm édités ou bien encore des facteurs de transcription. NEAT1 a été associé à de nombreuses pathologies. Les paraspeckles ont été initialement découverts par microscopie électronique en tant que zones associées à des granules inter-chromatiniennes (Visa et al., 1993). C'est en 2002 que l'équipe de Archa Fox les signale comme des corps nucléaires adjacents aux speckles nucléaires et enrichis en RBP PSPC1 (Paraspeckle component 1) et en $p54^{nrb}$ dans les noyaux des cellules HeLa (Fox et al., 2002). Du fait de sa localisation à proximité d'un autre domaine inter-chromatinien appelé speckle, le nouveau domaine est appelé paraspeckle. Par la suite, en 2009, plusieurs études identifieront le long ARN non codant NEAT1 comme un composant essentiel des paraspeckles (Clemson et al., 2009; Sasaki et al., 2009; Sunwoo et al., 2009).

2.1. La composition des paraspeckles

Les paraspeckles sont composés de plus de 60 protéines et sont structurés autour du long ARN non codant NEAT1 qui possède deux isoformes : une petite isoforme d'environ 3kb et une plus grande de 23kb. Nous allons voir en détail la composition du paraspeckle et sa formation conjointement à la transcription de son squelette, le long ARN non codant NEAT1 (Fox et al., 2018).

2.1.1. Le long ARN non codant Neat1 : squelette du paraspeckle

Cet ARN non-codant a été pour la première fois caractérisé en 1997 par l'équipe de Guru et al, sous le nom de MEN1 (multiple endocrine neoplasia type 1). En 2007, Hutchinson *et al* l'identifient en tant qu'ARN non codant (Hutchinson et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs étaient à la recherche d'ARN non codants polyadénylés enrichis dans le noyau. Leur criblage leur a permis d'identifier XIST (pour X Inactive Specific Transcript) ainsi que NEAT1 et NEAT2 (nuclear enriched abundant transcripts). NEAT2 est aussi retrouvé sous le nom de MALAT1. Les gènes des deux ARN NEAT1 et NEAT2 sont séparés de moins de 60kb l'un de l'autre sur le chromosome 11. Ils sont très conservés chez la souris suggérant des fonctions importantes. Dans cette étude, il apparaît que deux transcrits de NEAT1 sont détectés en Northern Blot. Ils sont chevauchants avec des tailles d'environ 3kb et 23kb. Par la suite, les auteurs ont découvert que NEAT1 se localise sous forme de foci nucléaires. Peu de temps après 3 équipes ont montré que ces foci sont en fait les paraspeckles et que NEAT1 est essentiel pour leur formation (Clemson et al., 2009; Sasaki et al., 2009; Sunwoo et al., 2009). Dans ces études, les deux isoformes MEN ε (Neat1_1) et MEN β (Neat 1_2) ont été identifiées comme des composants des paraspeckles essentiels pour leur intégrité. NEAT1 ayant été retrouvé à proximité des speckles nucléaires qui sont riches en SC35, l'association de NEAT1 avec les paraspeckles a été un questionnement évident (Fox et al., 2002; Hutchinson et al., 2007). D'étroites colocalisations entre NEAT1 et les composants des paraspeckles que sont $p54^{nrb}$ et PSPC1 (paraspeckle component 1) ont été rapportées par ces trois études, aussi bien pour les cellules de souris que les cellules humaines, primaires ou transformées. De plus les auteurs ont observé une perte des paraspeckles suite à la déplétion de NEAT1, suggérant que NEAT1 jouerait un rôle dans l'intégrité des paraspeckles. A l'appui de cette hypothèse, les auteurs ont observé que la distribution de NEAT1 ainsi que des paraspeckles est « bipolaire » durant l'interphase, indiquant une corrélation entre la transcription de NEAT1 et la formation des paraspeckles. Par des expériences de marquage ARN/ADN, ils ont pu montrer que les paraspeckles se forment au niveau du foyer de transcription de Neat1. Ces données ainsi que des données similaires obtenues dans d'autres études ont permis de caractériser NEAT1 comme un déterminant structurel essentiel des paraspeckles (Clemson et al., 2009; Sasaki et al., 2009; Sunwoo et al., 2009). Plus précisément l'étude de Sasaki montre que l'isoforme Neat1_1 n'est pas essentielle pour l'intégrité des paraspeckles mais que c'est la longue isoforme Neat1_2 qui joue ce rôle.

Le gène Neat1

Chez l'homme, le locus du gène NEAT1 se trouve sur le chromosome 11 et chez la souris on le retrouve sur le chromosome 19 (Guru et al., 1997; Hutchinson et al., 2007; Sunwoo et al., 2009). Ce gène est transcrit par la polymérase II et ne possède pas d'intron dans sa séquence, cela explique pourquoi les transcrits ne sont pas épissés. Les deux transcrits ne possèdent qu'un seul exon.

Les isoformes de Neat1

Deux transcrits sont générés par la polymérase II depuis le locus de Neat1 : NEAT1_1 and NEAT1_2. Dans de nombreuses études ils ont aussi été appelés Men ε et Men β (Sasaki et al., 2009; Sunwoo et al., 2009). NEAT1_1 (3,7 kb chez l'homme, 3,2 kb chez la souris) chevauche complètement l'extrémité 5' de NEAT1_2 (23 kb chez l'homme, 20,8 kb chez la souris). Donc la séquence de NEAT1_1 est comprise dans la séquence de NEAT1_2, c'est au niveau de leur extrémité 3' qu'ils diffèrent : NEAT1_1 est polyadénylé d'une manière semblable à un ARNm classique, tandis que NEAT1_2 a une structure inhabituelle en triple hélice à l'extrémité 3'. La maturation de l'extrémité 3' de NEAT1 est unique car deux extrémités 3' sont générées par des mécanismes de maturation distincts : polyadénylation canonique pour NEAT1_1 et clivage par la RNase P pour NEAT1_2. Plusieurs protéines du paraspeckle (PSP) interviennent dans la production de ces 3' alternatifs : CPSF6 et NUDT21, formant un hétérodimère fonctionnel appelé CFIm (cleavage factor Im complex) pour faciliter la maturation canonique de l'extrémité 3' de NEAT1_1. En effet, NEAT1_1 va suivre un schéma classique de clivage et de polyadénylation. Le complexe CFIm se lie juste en amont du site de polyadénylation (AAUAAA), sur un site UGUA et recrute la machinerie de polyadénylation ce qui va induire le clivage endonucléolytique suivi de l'ajout de résidus adénosine et la libération de l'isoforme NEAT1_1 (Figure 11). En revanche, la hnRNPK (hetegenous nuclear ribonucleoprotein K) réprime la polyadénylation de l'extrémité 3' de NEAT1_1. La hnRNPK se lier sur l'ARN en amont du site de polyadénylation sur une séquence polypyrimidique (UCCCCUU), et déplace NUDT21 du complexe fonctionnel CFIm, entraînant l'arrêt de la maturation de l'extrémité 3' de l'isoforme NEAT1_1. C'est donc la compétition entre les protéines du complexe de polyadénylation et hnRNPK qui est responsable de la synthèse de l'une ou l'autre des isoformes. Cette inhibition par hnRNPK va permettre à la polymérase II de poursuivre sa transcription en « ignorant » le signal de polyadénylation (Naganuma et al., 2012). La mutation du site polyA de NEAT1_1 par édition du génome peut également reproduire cet effet (R. Li et al., 2017). La plus longue isoforme n'est pas polyadénylée en 3' et possède une

triple hélice à la place. Ce mode de terminaison et cette structure en forme de trèfle semblables à ce qu'on observe pour l'ARN MALAT (NEAT2) (Wilusz et al., 2012). NEAT1 et MALAT possèdent tous les deux un motif riche en A et deux motifs riches en U qui encadrent la structure tige-boucle. Ces motifs sont capables de s'apparier pour former une structure en triple hélice U-A.U. C'est le clivage par la RNAse P qui va permettre la formation de cette tige-boucle : cette RNAse va se fixer en aval de la structure tige boucle en amont d'une structure ressemblant à un ARNt (appelé ARNt-like) et induire le clivage et la libération d'un « ARNt-like ». Ce dernier est ensuite clivé par la RNase Z et cela génère un petit ARN de 60 pb qui sera rapidement exporté puis dégradé. MALAT comme NEAT1_2 génère un petit ARNt like qui est clivé par la RNAse Z afin de générer un « mascARN ». La structure en tige-boucle en 3' de Neat1_2 lui confère une stabilité et une protection contre la dégradation par les exonucléases ainsi qu'un avantage traductionnel (Wilusz et al., 2012). Après la transcription de NEAT1_2, les protéines SFPQ et p54nrb ainsi que RBM14 vont rapidement s'y fixer afin de le stabiliser et de démarrer l'assemblage des paraspeckles.

Rôle essentiel de Neat1 dans la formation des paraspeckles

Le rôle de NEAT1 en tant que constituant essentiel des paraspeckles a été mis en évidence depuis 2009. De nombreuses études employant diverses méthodes afin de d'éteindre NEAT1, soit par interférence à l'ARN, soit par édition du génome ou encore par traitement à la RNAse ont permis de mettre en évidence son rôle-clé dans la formation des paraspeckles (Chen and Carmichael, 2009; Clemson et al., 2009; Fox et al., 2002; Nakagawa et al., 2011; Sasaki et al., 2009; Sunwoo et al., 2009). Il n'est pas chose aisée d'évaluer la contribution des deux isoformes dans le maintien des paraspeckles. En effet, la séquence de NEAT1_1 étant comprise dans celle de NEAT1_2 il est difficile de cibler l'isoforme NEAT1_1 seul. Cependant, de nombreuses études ont montré que la déplétion de NEAT1 ou de NEAT1_2 seul induit la disparition des paraspeckles (Clemson et al., 2009; Sasaki et al., 2009; Sunwoo et al., 2009).

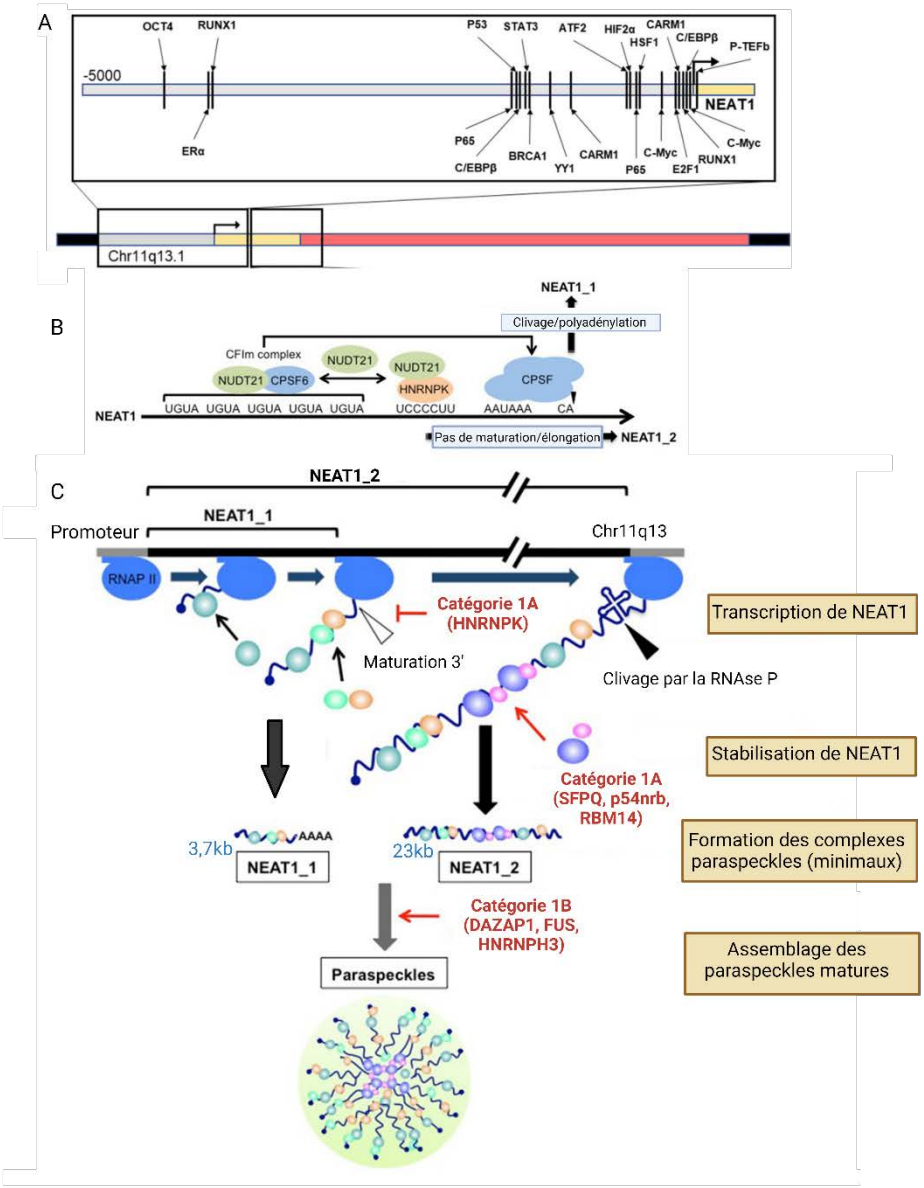


Figure 11 : Modèle de biogenèse des paraspeckles. A. Sites de liaison proposés pour les facteurs de transcription qui se lient directement au promoteur de NEAT1 pour réguler NEAT1 à la hausse B**.** Modèle de transcription des deux isoformes de NEAT1 par modulation de la polyadénylation. Le complexe CFIm (NUDT21/CPSF6) va se lier au cluster de séquence UGUA en amont du site de polyadénylation (AAUAAA) pour recruter le complexe de polyadénylation CPSF. La hnRNPK se lie au site UCCCCUU se situant entre le site de liaison de CFIm et le site de polyadénylation. Elle entre en compétition avec NUDT21 pour la liaison à CPSF6. Cela entraîne une inhibition du clivage/polyadénylation menant à l'isoforme NEAT1_1 et favorise la poursuite de l'élongation et ainsi l'expression de l'isoforme NEAT1_2. C. Modèle actuel pour la formation des paraspeckles. La formation des paraspeckles se décompose en 4 grandes étapes, la transcription de NEAT1, sa stabilisation, l'agrégation de protéines du paraspeckle pour former un complexe intermédiaire et enfin un assemblage final du complexe. Adapté de Yamazaki et al, 2015 et Archa H. Fox 2020.

Réciproquement la surexpression de NEAT1_2 exclusivement conduit à une élévation du nombre de paraspeckles (Naganuma et al., 2012; Nakagawa et al., 2011). Enfin, seules les populations cellulaires qui expriment NEAT1_2 sont pourvues de paraspeckles (Nakagawa et al., 2011). L'isoforme NEAT1_2 semble donc être majoritairement requise pour la formation des paraspeckles.

La localisation et l'expression de NEAT1

Les isoformes de NEAT1 et les paraspeckles sont présents dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses et cellules primaires. Cependant, chez la souris, NEAT1_1 et NEAT1_2 sont exprimés dans une sous-population de cellules dans les organes adultes, y compris l'estomac et les intestins (Nakagawa et al., 2011). La sous-population de cellules qui exprime fortement NEAT1_2 est en corrélation avec les cellules qui contiennent des paraspeckles. Le KO de NEAT1 n'est pas létal chez la souris et dans un premier temps n'a pas conduit à l'observation de phénotypes particuliers. La formation des paraspeckles se fait au niveau du site de transcription de NEAT1. Cependant de nombreux paraspeckles sont retrouvés loin du locus de NEAT1, ce qui signifie qu'une fois formés, ces derniers sont délocalisés au niveau du nucléoplasme. L'expression de NEAT1 est régulée par différents facteurs de transcription, notamment par le facteur HIF2 en réponse à l'hypoxie (Choudhry et al., 2015) et le facteur p53 (Adriaens et al., 2016). Son expression est aussi régulée par des protéines de liaison à l'ARN tel que $p54^{nrb}$, SFPQ ou RBM14 (Naganuma et al., 2012; Sasaki et al., 2009). A travers différentes expériences d'immunoprécipitation, les chercheurs ont montré que de nombreux facteurs de transcription se lient au promoteur de Neat1 (McCluggage and Fox, 2021; Wang et al., 2020) (Figure 11). Au niveau post-transcriptionnel, NEAT1 est principalement régulé par la modulation de sa maturation au niveau de son l'extrémité 3' pour ajuster le rapport NEAT1_1:NEAT1_2. Plusieurs régions de NEAT1 sont importantes, notamment près du site polyA de NEAT1_1 où des protéines telles que hnRNPK et TDP43 se lient et modifient le la maturation de NEAT1_1 (Barra et al., 2020; Naganuma et al., 2012).

2.1.2.Les protéines du paraspeckle

La première protéine à avoir été identifiée en tant que composant du paraspeckle est PSPC1. Depuis, de nombreuses autres protéines ont été identifiées. Notamment, l'étude de Naganuma a permis l'identification de 32 nouvelles protéines des paraspeckles (Naganuma et al., 2012). On sait aujourd'hui que les paraspeckles contiennent plus de 60 protéines différentes. Ces protéines ont été classées en différentes catégories en fonction de leur importance pour la formation des paraspeckles et leur

interaction avec Neat1 (Fox et al., 2018; Yamazaki and Hirose, 2015). La classification de ces PSP est réalisée sur la base d'expériences d'interférence à l'ARN. Ces protéines sont recrutées grâce à des interactions protéine-ARN et protéine-protéine. Parmi les protéines associées aux paraspeckles, les premières protéines identifiées incluent les protéines de de la famille des DBHS (Drosophila behaviour human splicing) : PSPC1, SFPQ (splicing factor, proline- and glutamine-rich, also known as PSF) et $p54^{nrb}$. RBM14 et CPSF6 ont aussi été découvertes par la suite (Fox et al., 2002; Yamazaki and Hirose, 2015). Depuis, d'autres études sont venues étayer la listes des composants du paraspeckle (An et al., 2019; Fong et al., 2013; Quiskamp et al., 2014). Voyons un peu de quelle façon ces protéines sont classées par ordre d'importance.

Les protéines essentielles pour la formation des paraspeckles (classe I)

La première classe de protéine (classe I), regroupe celles qui sont essentielles pour la formation des paraspeckles, leur déplétion entraîne une perte de plus de 75% des paraspeckles. Elle est subdivisée en 2 classes A et B, la classe A comprend les protéines dont la déplétion entraîne la perte de NEAT1_2 et la classe B les protéines qui n'altèrent pas les niveaux de NEAT1_2. Les protéines essentielles de classe IA regroupent deux protéines de la famille des DBHS : $p54^{nrb}$ ainsi que SFPQ, mais aussi les protéines RBM14 et hnRNPK. $P54^{nrb}$, SFPQ ainsi que RBM14 peuvent se lier à NEAT1_2 pour le stabiliser alors que hnRNPK quant à elle permet la génération de l'isoforme NEAT1_2 en inhibant la polyadénylation (vu précédemment). Les protéines de la classe IB regroupent FUS (fused to sarcoma), DAZAP1 (DAZ associated protein 1), HNRNP3 ainsi que le complexe SWI/SNF.

Les protéines importantes mais non essentielles à la formation des paraspeckles (classe II)

Les protéines de classe II sont importantes mais non essentielles pour l'intégrité des paraspeckles. Leur perte entraîne une baisse modérée de 25 à 75% des paraspeckles. On retrouve dans cette catégorie, les protéines hnRNP (hnRNPA1, R, UL1), CPSF7, FAM98A, FAM113A, FIGN, RBM12, FUSPI1 et TDP-43.

Les protéines non essentielles à la formation des paraspeckles (classe III)

Cette catégorie contient des protéines qui ne sont pas essentielles pour le maintien des paraspeckles, leur extinction entrainant une baisse de moins de 25% des paraspeckles. Cette catégorie est à son tour subdivisé en deux : A : les protéines qui interfèrent avec la génération de NEAT1_1 et B celles qui n'interfèrent pas. Dans la catégorie IIIA on peut donc retrouver les protéines qui forment le complexe de polyadénylation CFIm : CPSF6 avec NUDT21 et également la protéine UBAP2L. Les protéines de

la catégorie IIIB comprennent le troisième membre des DBHS : PSPC1, en effet bien qu'ils s'agisse d'un marqueur des paraspeckles, la perte de PSPC1 n'affecte ni la présence des paraspeckles, ni l'expression de NEAT1 (Naganuma et al., 2012; Sasaki et al., 2009). D'autres protéines tel que RBM3, RBM7, CIRBP appartiennent aussi à cette catégorie.

Les domaines de liaison des PSP pour cibler les paraspeckles

Beaucoup des protéines du paraspeckle sont des protéines de liaison à l'ARN qui contiennent des motifs RRM, un domaine KH, une boîte RGG ou un motif a doigt de zinc comme domaines canoniques de liaison à l'ARN. Les protéines DBHS, par exemple, ont des domaines très conservés incluant des domaines RRM et coiled-coil. Ils forment toutes les combinaisons possibles d'hétérodimères. Les trois membres de la famille des DBHS, SFPQ, $p54^{nrb}$ et PSPC1, possèdent à la fois des sites de liaison protéine-protéine et protéine-acide nucléique qui leur permettent de se comporter comme un « échafaud moléculaire ». SFPQ (splicing factor, proline- and glutamine-rich), $p54^{nrb}$ et PSPC1 partagent environ 50% de leur séquence. Elles sont définies par un noyau conservé d'environ 300 acides aminés comprenant des motifs de reconnaissance d'ARN N-terminaux en tandem hautement conservés (RRM), un domaine NonA/paraspeckle (NOPS) d'interaction protéine-protéine et un domaine C-terminal coiled-coil. Les régions RRM facilitent l'engagement des DBHS avec les acides nucléiques, tandis que les régions NOPS et coiled-coil jouent principalement sur la formation de dimère et d'oligomère pour les DBHS (Knott et al., 2016). En dehors de cette région conservée, les membres de la famille diffèrent considérablement, à la fois en longueur et en complexité de séquence. Les protéines DBHS ont un signal de localisation nucléaire à leur extrémité C-terminale. Les DBHS fonctionnent donc en dimères, cette dimérisation implique les domaines RRM2, NOPS et le domaine coiled-coil. Ces protéines fonctionnent en hétéroduplex, deux à deux et peuvent se supplanter l'une à l'autre.

Les protéines du paraspeckle identifiées comme ITAF

De nombreuses protéines qui composent les paraspeckles ont été identifiées comme étant des ITAF. Par exemple les protéines hnRNPM et $p54^{nrb}$ ont été identifiées comme étant des régulateurs de la traduction IRES-dépendante du facteur de croissance FGF1 dans le cadre de la différenciation des myoblastes (Ainaoui et al., 2015). Ces facteurs ainsi que les études correspondantes sont répertoriés dans la table 1. La question se pose alors : si tant de protéines qui composent les paraspeckles sont des facteurs régulant la traduction IRES-dépendante, y aurait-il un lien entre ces corps nucléaires induits

en cas de stress et la régulation de la traduction IRES-dépendante ? Cette question sera l'objet de la première partie de mes travaux de thèse.

2.2. Assemblage et structure des paraspeckles

Les découvertes de ces dernières années ont révélé que la formation des paraspeckles dépend du long ARN non codant NEAT1 qui est « la graine » par laquelle germent les paraspeckles. En effet, la formation des paraspeckles débute par la transcription de NEAT1. Cette graine va ensuite recruter les protéines spécifiques par le biais d'interactions ARN-protéines, générant ainsi une forte concentration locale à un endroit spécifique du noyau. Une fois à proximité et liées à leur squelette d'ARN, ces protéines s'oligomérisent et recrutent d'autres protéines qui assurent la médiation d'un processus de séparation de phase liquide-liquide et la formation du paraspeckle. Malgré cet état liquide, il existe des preuves d'une structure au sein des paraspeckles. La microscopie à fluorescence à super-résolution révèle des régions distinctes de "cœur" et de "coque" contenant des parties spécifiques de l'ARN NEAT et des protéines distinctes. Les premières protéines du cœur vont interagir afin de stabiliser NEAT1_2 et par la suite d'autres protéines viennent s'assembler.

2.2.1.Organisation des paraspeckles : coeur, coque, patch

La microscopie électronique et la microscopie à haute résolution ont révélé que les paraspeckles sont des structures sphérique ou allongé avec une largeur uniforme d'environ 360 nm dans les cellules humaines et un peu moins dans les cellules murines, avec une longueur variant jusqu'à 1–2 µm. Le nombre et la longueur des paraspeckles sont directement proportionnels à la transcription de NEAT1_2 (Hirose et al., 2014; Souquere et al., 2010). Les paraspeckles possèdent une compartimentalisation « coeur-coque-patch » spécifique, avec le core qui se trouve au centre, le shell qui constitue l'enveloppe et le patch qui se situe entre les deux. L'hybridation in situ contre différentes régions de NEAT1_2 au microscope à haute résolution a révélé que les extrémités 5' et 3' de cet ARN sont clairement confinées dans la coque ou enveloppe du paraspeckle, alors que la région centrale de l'ARN est située dans le coeur (West et al., 2016). Ces extrémités ne se mélangent pas mais sont organisées en « faisceaux » (figure 12). Les protéines elles aussi sont localisées dans des zones distinctes du paraspeckle. Les protéines essentielles NONO, SFPQ et FUS sont localisées dans le coeur, avec RBM14 et BRG1 dans le patch, alors que TDP43 est localisé dans la coque avec les extrémités 5' et 3' de NEAT1 (Fox et al., 2018).

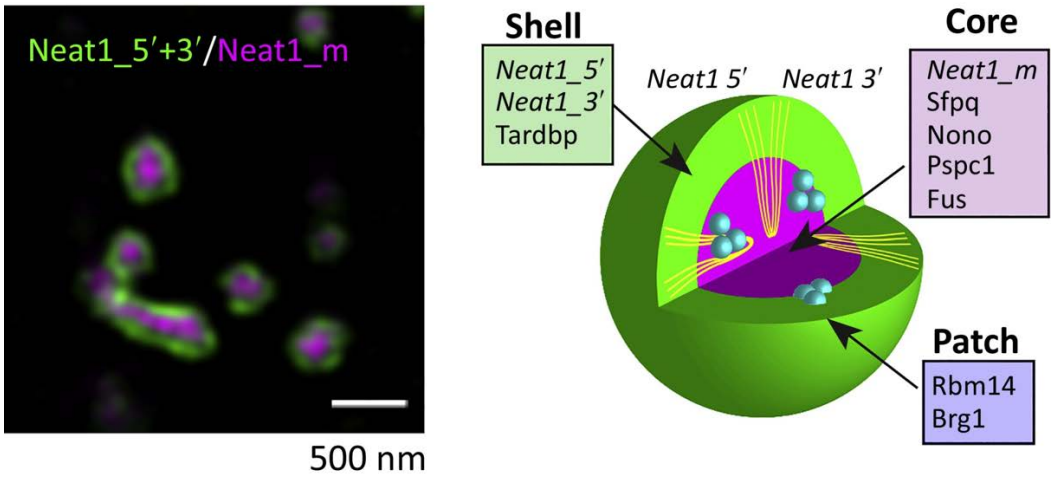


Figure 12 : Structure « Patch-cœur-coque" du paraspeckle. Sur la gauche, on peut observer une image en haute résolution des paraspeckles, en vert on peut observer la coque mise en évidence par FISH avec des sondes dirigées contre les parties 5' et 3' de NEAT1_2 et en rose on peut observer le cœur mis en évidence avec des sondes dirigées contre la partie centrale de NEAT1_2. A droite, on peut observer une illustration modélisée de l'image de gauche, illustrant l'emplacement de NEAT1_2 ainsi que les protéines du paraspeckle dans les différentes régions. Image provenant de Fox et al 2018.

2.2.2. La biogenèse des paraspeckles et la séparation en phase liquide-liquide

La biogenèse des paraspeckles commence par la transcription de NEAT1_2, les paraspeckles se forment près du gène NEAT1, c'est pourquoi ils sont souvent retrouvés près de ce locus. Une fois que NEAT1_2 est transcrit, les protéines essentielles du paraspeckle p54nrb et SFPQ se lient rapidement pour former et stabiliser une particule de ribonucléoprotéine minimale, qui est un intermédiaire de la formation des paraspeckles (West et al., 2016). $P54^{nrb}$ et SFPQ se fixent sous forme de dimère, grâce à leur domaine NOPS et se polymérisent ensuite grâce à leur domaine « coiled-coil ». Des protéines supplémentaires tel que FUS sont requises pour former le paraspeckles matures. RBM14 et le composant swi / snf BRG1 se trouvent tous deux dans le patch reliant les régions du coeur et de la coque du paraspeckle. Ces deux protéines sont toutes deux nécessaires pour des interactions protéines-protéines supplémentaires essentielles pour former des paraspeckles. En effet, les protéines FUS et RBM14 ont la capacité de réaliser la séparation en phase liquide-liquide de la part leur domaine prion-like. Le domaine prion-like permet la formation de fibrille. En fait, les domaines prion-like sont présents dans près de la moitié des protéines du paraspeckle. Ces domaines permettent l'agrégation

des protéines et la formation d'un hydrogel (Hennig et al., 2015). Les protéines s'auto-assemblent par oligomérisation et par la suite les autres PSP viennent s'assembler.

2.3. Rôle des paraspeckles dans la réponse au stress

Une fois les paraspeckles formés, quel est leur rôle dans la cellule ? Jusqu'à présent, aucune activité catalytique distincte n'a été démontrée dans le paraspeckle. Les principaux mécanismes moléculaires identifiés pour sa fonction concernent la séquestration de molécules, qu'il s'agisse d'ARN ou de protéines.

2.3.1. Rôle dans le contrôle de l'expression génique

Rétention d'ARN édités

Au-delà de NEAT1, d'autres ARN peuvent se localiser dans les paraspeckles. La classe la mieux caractérisée de ces ARN retenus dans le noyau concerne les ARN double brin avec des séquences répétées inversées. Ce mécanisme de rétention nucléaire est piloté par la liaison de $p54^{nrb}$ et SFPQ. Le premier ARN décrit comme retenu dans les paraspeckles est CTN, cela avant même la découverte de Neat1 (Prasanth et al., 2005). Les auteurs ont cherché à étudier les ARN poly(A)+, ils ont trouvé un ARN retenu dans les paraspeckles, ce dernier est transcrit à partir du gène de transporteur d'acide aminés cationique mCAT2. Ce gène code également pour l'ARNm mCTAT2 codant, les exons contenus dans l'ARN CTN se chevauchent avec ceux contenus dans l'ARNm mCAT2. Cependant les deux transcrits n'utilisent pas le même site de polyadénylation, ce qui entraine une transcription plus longue pour l'ARN-CTN. L'ARN CTN contient l'intégralité du cadre de lecture ouvert de mCAT2 et possède des UTR 5' et 3' étendus. L'ARN CTN possède dans son 3'UTR une séquence en épingle à cheveux provenant de séquences répétées inversées qui lui permet d'être édité d'adénosine en inosine par l'enzyme ADAR. Les résidus I dans l'ARN édité interagissent avec un complexe protéique composé de $p54^{nrb}$, PSF et matrin 3, ce qui entraîne la rétention de ce complexe RNP dans le noyau (Zhang and Carmichael, 2001). Dans des conditions de stress, telles que le traitement par interféron-gamma et lipopolysaccharide, l'ARN-CTN est clivé post-transcriptionnellement et libéré sous forme d'ARNm mCAT2 d'environ 4,2 kb dans le cytoplasme pour traduction. Cette étude révèle un stockage des ARN édités possédant des régions répétées inversées dans les paraspeckles, ce mécanisme semble servir à une réponse rapide de production d'une protéine en cas des stress. Cependant, une étude a montré que l'ARN-CTN est tout de même retenu au noyau même en l'absence de paraspeckles

(Anantharaman et al., 2016). En l'absence de Neat1, CTN est retenu en association avec $p54^{nrb}$ et capable de former des paraspeckles « résiduels ». De plus, il apparait que l'enzyme ADAR n'influence pas la localisation de CTN dans les paraspeckles, mais que ce serait la présence de région répétées inversées qui favorise la rétention de l'ARN. Dans des cellules Hela, l'appauvrissement en NEAT1 à conduit à une diminution importante de la rétention nucléaire de plusieurs ARN édités, confirmant le rôle de NEAT1 et des paraspeckles dans la rétention nucléaire.

Rétention des protéines

Lorsque les niveaux de NEAT1_2 augmentent, les paraspeckles s'allongent (Hirose et al., 2014). Une conséquence de l'augmentation de la longueur des paraspeckles est qu'une plus grande quantité de protéines constitutives des paraspeckles est nécessaire pour construire les structures, avec une réduction concomitante de la disponibilité des protéines nucléoplasmiques. Ce concept a été bien défini pour la protéine SFPQ du paraspeckle. Au fur et à mesure que les paraspeckles s'allongent, nécessitant plus de SFPQ, les niveaux relatifs de SFPQ diminuent dans le nucléoplasme. La conséquence de la raréfaction de SFPQ dans le nucléoplasme est l'altération de ses gènes cibles directs. Par exemple, SFPQ réprime normalement l'IL-8, un gène de réponse immunitaire, ou active le gène ADARB2 (Imamura et al., 2014). L'expression du gène ADARB2 est régulé à la hausse lors de la déplétion de NEAT1. Lors du stress induit par l'utilisation d'un traitement inhibant le protéasome, une diminution de l'expression du gène ADARB2 est observée. Cette perte d'expression est accompagnée de la dissociation de SFPQ sur le promoteur d'ADARB2 (Hirose et al., 2014). Inversement, lors de la stimulation par l'infection virale, les paraspeckles sont induits par l'expression de NEAT1. Cela favorise donc la séquestration de SFPQ et le maintien cette dernière hors de portée du promoteur de l'IL8 qu'elle réprime habituellement. Ces données suggèrent un modèle dans lequel les paraspeckles agissent comme une éponge pour séquestrer des facteurs de transcription spécifiques et/ou des protéines de liaison à l'ARN. De cette manière, des gènes cibles spécifiques peuvent être régulés en modifiant la taille des paraspeckles, ce qui peut contribuer aux réponses cellulaires.

Une étude a montré que le paraspeckle pourrait contribuer à réguler négativement la traduction. La déplétion de Neat1 entraîne en effet un relargage de ces deux protéines et une augmentation de la synthèse de la protéine c-myc. Même si les auteurs ne le démontrent pas dans cette étude, les résultats suggèrent que le paraspeckle pourrait avoir un rôle inhibiteur de la traduction IRES-dépendante en séquestrant les protéines SFPQ (PSF) et $p54^{nrb}$ (Shen et al., 2017).

2.3.2.Rôle des paraspeckles et de Neat1 dans les processus physiologiques

Rôle dans le développement et l'organogenèse

Les premières observations ont montré que les paraspeckles n'étaient pas présents dans l'embryon précoce de souris, à l'exception des cellules de l'intestin postérieur et des crêtes génitales, alors que les souris KO pour NEAT1 ne présentaient pas de phénotype particulier (Nakagawa et al., 2011). Cependant, Magdalena-Goetz et ses collègues ont récemment montré que la formation du paraspeckle pourrait jouer un rôle beaucoup plus important dans le développement de l'embryon que ce que l'on pensait à l'origine. Des paraspeckles sont retrouvés aux stades 2 et 4 cellules dans le zygote de souris. La méthylase CARM1 se localise dans les paraspeckles en association avec $p54^{nrb}$ et NEAT1 à ces stades. Elle est responsable de la méthylation de l'histone H3R26 et permet la mise en place des deux lignages embryonnaire et extra-embryonnaire. Lorsque l'on supprime NEAT1 ou des composants essentiels du paraspeckle tel que p54nrb/NONO ou SFPQ, la méthylase CARM1 se redistribue dans le noyau. En conséquence la méthylation de l'histone H3R26 est perturbée, entraînant une élévation de l'expression du facteur de transcription Cdx2, ce qui favorise la mise en place d'un lignage extra-embryonnaire et un arrêt du développement au stade 16 à 32 cellules (Hupalowska et al., 2018).

Rôle dans la reproduction

NEAT1 joue un rôle important dans la reproduction. Sa perte est délétère pour la fertilité des souris. En effet, il a été montré que cet ARN non-codant participe à la formation du corps jaune (structure qui se forme dans l'ovaire pour favoriser la gestation en sécrétant de la progestérone) (Nakagawa et al., 2014). NEAT1_2 est exprimé dans le corps jaune et entraine la formation de paraspeckles dans les cellules de cette structure. Dans les souris KO pour NEAT1, la formation du corps jaune est inhibée ce qui s'accompagne d'une baisse des grossesses viables, de portées plus petites et d'une infertilité certaine. Le corps jaune se forme rapidement lorsque l'ovule mature est libéré. Cette formation provient d'une reprogrammation des cellules ovariennes et confirme le fait que les paraspeckles jouent un rôle important dans la transition d'un état à un autre. En outre, le fait que certaines souris knock-out NEAT1 puissent encore réussir à former le corps jaune montre que le phénotype ne se manifeste que lorsque les souris sont exposées à des facteurs environnementaux non encore caractérisés.

Rôle dans le vieillissement

NEAT1 impacte également les processus de vieillissement. En effet, une étude a montré que la présence de NEAT1 dans l'hippocampe était délétère pour l'établissement de la mémoire (Butler et al., 2019). L'expression de NEAT1 conduit à une diminution de l'expression de c-Fos qui est impliqué dans la formation de la mémoire. La déplétion de Neat1 entraîne une amélioration de la mémoire des souris âgées ; sa surexpression induit en revanche une altération de la formation de la mémoire chez les jeunes souris adultes, récapitulant les déficits de mémoire observés chez les souris adultes âgées. Comme NEAT1 augmente dans l'hippocampe avec l'âge, cela pourrait expliquer en partie les troubles de la mémoire observés chez les patients vieillissants en bonne santé (Butler et al., 2019). À l'instar de l'hippocampe, la tendance à l'augmentation de l'expression de NEAT1 au cours du vieillissement est également observée dans la zone sous-épendymaire du cerveau humain. Peut-être qu'au fil du temps, des cycles continus d'assemblage de paraspeckles induits par le stress dans des cellules individuelles à longue durée de vie peuvent épuiser la machinerie de désassemblage, ce qui entraîne une accumulation de NEAT1 de plus en plus importante.

2.3.3. Rôle des paraspeckles dans les processus pathologiques et la réponse au stress

Rôle dans la réponse au stress cellulaire

Au cours de la dernière décennie, l'accent a été mis sur les condensats cytoplasmiques : les chercheurs ont acquis une nouvelle compréhension de la façon dont la séparation de phase conduit à la formation de granules de stress et de P-bodies, qui influencent largement la traduction des protéines. En revanche, on en sait moins sur les condensats à l'intérieur du noyau cellulaire qui se réorganisent en réponse au stress. Les paraspeckles sont-ils présents dans les cellules non stressées ? Dans les souris élevées en laboratoire, les paraspeckles sont restreint a certains tissus, comme l'intestin (Nakagawa et al., 2011). Cela consolide l'idée que les paraspeckles seraient plus apparents en réponse au stress. En revanche, dans les cellules en culture, NEAT1_2 se trouve à des niveaux élevés. Les paraspeckles sont induits lorsque les cellules souches embryonnaires se différencient ou lorsque les cellules musculaires lisses vasculaires passent d'un phénotype contractile à prolifératif (Ahmed et al., 2018; Modic et al., 2019). Le premier lien entre le stress cellulaire et les paraspeckles remonte à 2005, quand l'équipe de Spector a identifié le relargage cytoplasmique d'un ARN en réponse au stress (Prasanth et al., 2005). Le traitement par des inhibiteurs de la transcription par la pol II a induit l'augmentation du signal

cytoplasmique de l'ARN CTN et la diminution de sa rétention nucléaire. L'ajout d'IFNγ et de LPS a exacerbé le phénotype. Depuis, de plus en plus d'études ont montré que, bien que les paraspeckles soient présents dans les cellules de manière basale, différents types de stress peuvent induire une augmentation de leur nombre. Notamment le stress mitochondrial (Y. Wang et al., 2018), l'hypoxie (Choudhry et al., 2015), le choc thermique (Lellahi et al., 2018), les apports mécaniques et de nombreux facteurs de stress supplémentaires qui déclenchent la réponse intégrée au stress (Todorovski et al., 2020). En général les paraspeckles ont un rôle cytoprotecteur dans ces conditions. La plupart des types cellulaires peuvent basculer d'un niveau basal de paraspeckles à un niveau plus élevé en réponse au stress. Cette formation de paraspeckles dépend non pas des protéines du paraspeckle mais des niveaux de NEAT1_2. Les niveaux de PSP ne varient pas avec le stress (Hirose et al., 2014; Mao et al., 2011; Sunwoo et al., 2009; Wang et al., 2020). En revanche la transcription de NEAT1 va être favorisée par certains stress (Choudhry et al., 2015; Lellahi et al., 2018). Dans certains contextes de stress, l'apparition de paraspeckles nécessite l'apparition préalable de granules de stress (An et al., 2019).

Le stress hypoxique

Choudhry *et al* ont montré qu'en réponse à l'hypoxie dans les cellules cancéreuses, les deux isoformes de NEAT1 sont induites et que cette induction est corrélée à la liaison des sous-unités HIF-1α, HIF-2α et HIF-1β de HIF, le régulateur transcriptionnel majeur des réponses cellulaires à l'hypoxie, sur le promoteur de NEAT1 (Choudhry et al, 2015). Mais bien que les deux isoformes de HIF α se lient au promoteur, la transcription de NEAT1 est principalement régulée par HIF-2. NEAT1 est aussi présent à de plus faible niveau en normoxie mais indépendamment de HIF. L'induction de NEAT1 s'est avérée visible dans de nombreuses tumeurs mammaires en condition d'hypoxie. Les patientes atteintes de cancer du sein qui présentent des niveaux élevés de NEAT1 ont un pronostic vital plus mauvais que les patientes présentant des niveaux plus faibles de NEAT1 (Choudhry et al., 2015).

Choc thermique

La production de protéines de choc thermique (Hsp) est induite par le facteur de transcription HSF1 (heat shock factor 1). Une augmentation de l'abondance des paraspeckles a été observée après une élévation de la température et une exposition au sulforaphane. La transcription de NEAT1 est activée par HSF1 qui se lie à un élément de choc thermique dans le promoteur NEAT1, s'accompagnant de la formation de paraspeckles. Plusieurs chaperonnes induites par HSF1 sont davantage exprimées dans les cellules dépourvues de NEAT1 (Lellahi et al., 2018).

Rôle dans le cancer

De nombreuses études font désormais le lien entre NEAT1, les paraspeckles et la progression du cancer (Dong et al., 2018; Klec et al., 2019). Nous avons précédemment abordé l'étude de Chouldry *et al* qui montre que NEAT1 est la cible transcriptionnelle du facteur HIF2. NEAT1 est donc induit en réponse à l'hypoxie dans les cellules de cancers du sein de même que la formation de paraspeckles. Dans ce contexte, cet ARN non codant favorise la progression tumorale et inhibe l'apoptose des cellules cancéreuses. NEAT1 est dérégulé dans un grand nombre de formes de cancers. Une expression accrue de NEAT1 corrèle avec un faible pronostic vital et augmente le risque de métastases chez les patients atteins de cancers (Chen et al., 2017; Yang et al., 2016). La déplétion de NEAT1 agit en synergie avec le traitement médicamenteux pour réduire la progression du cancer, ce qui suggère que NEAT1 confère une chimiorésistance (Shin et al., 2019). Inversement, dans certains contextes cancéreux, NEAT1 paraît agir comme suppresseur de tumeur. Par exemple, dans le contexte des néoplasies intraépithéliales pancréatiques précancéreuses, la régulation à la hausse de NEAT1/paraspeckles dépendante de p53 exerce une fonction suppressive sur l'initiation et la transformation du cancer en réponse aux signaux oncogéniques (Mello et al., 2017). Il convient tout de même de noter que la majorité des recherches explorent NEAT1 dans un contexte de cancer indépendant des paraspeckles, en se concentrant uniquement sur le niveau d'ARN de NEAT1.

Rôle dans les infections neurologiques

De nombreuses études ont fait le lien entre des niveaux altérés de paraspeckles et de NEAT1 corrélés à des pathologies neurodégénératives comme la pathologie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Huntington, la sclérose en plaques et la démence frontotemporale (An et al., 2018). De manière globale, il semble que dans de nombreuses études réalisées sur le rôle de NEAT1 et des paraspeckles dans les pathologies neurodégénératives, celui-ci joue majoritairement un rôle protecteur (McCluggage and Fox, 2021), bien que d'autres études le désignent comme néfaste pour la progression de ces maladies. Dans la maladie de Parkinson (PD) par exemple, qui résulte de la perte de neurones dopaminergiques dans la substance grise, des niveaux élevés de NEAT1 ont été détectés, cette association suggère que NEAT1 pourrait bien être un biomarqueur dans ce type de pathologies. Dans d'autres études sur la maladie de Parkinson, il a été suggéré que NEAT1 serait neuroprotecteur. Les auteurs ont montré que NEAT1 et les paraspeckles sont induits dans les neurones dopaminergique de la substance grise chez les patients atteints de PD. De plus, le stress oxydatif qui se manifeste dans la maladie de Parkinson induit également une

expression accrue de NEAT1 et la présence de paraspeckles. La neuroprotection conférée par NEAT1 provient de son rôle dans la séquestration de LRRK2 (les mutations de gain de fonction dans le gène LRRK2 sont liées à la maladie de Parkinson). En effet, la perte de NEAT1 a induit une diminution de la viabilité cellulaire quand les cellules sont soumises au stress oxydatif et que le prétraitement des cellules avec des inhibiteurs de LRRK2 permettait de sauver la viabilité des cellules. Les auteurs suggèrent que l'abondance accrue des paraspeckles peut séquestrer les protéines LRRK2 à la suite d'un stress oxydatif, agissant ainsi de manière neuroprotectrice (Simchovitz et al., 2019). A l'inverse, d'autres études montrent que des niveaux élevés de NEAT1 peuvent exacerber la neurodégénérescence dans des modèles cellulaires simples de la maladie de Parkinson. La viabilité des cellules SH-SY5Y est plus importante en l'absence de NEAT1 après induction d'un stress oxydatif (Liu and Lu, 2018).

Rôle dans l'immunité et l'infection virale

L'infection peut être considérée comme l'un des facteurs de stress les plus importants pour les cellules de mammifères et les paraspeckles ont été impliqués dans de nombreux aspects de la réponse immunitaire. Les premières observations ont établi un lien entre l'augmentation de l'expression de NEAT1 et la réponse immunitaire innée à la suite d'une infection par le virus de l'encéphalite japonaise et de la rage dans le cerveau de souris infectées (Saha et al., 2006). Plus récemment, on a établi un lien entre la modification de l'abondance des paraspeckles et plusieurs stimuli activant la réponse immunitaire innée, notamment l'infection virale induite par l'ADN et l'ARN, l'activation de l'inflammasome et l'infection bactérienne (Imamura et al., 2018). Outre le virus de l'encéphalite japonaise et de la rage, les paraspeckles augmentent également dans les cellules infectées par plusieurs autres virus à ARN, tels que le VIH, l'hantavirus, la dengue, la grippe,et l'hépatite D, et plusieurs virus à ADN, tels que le virus de l'herpès simplex 1, le virus d'Epstein-Barr, et l'herpès virus associé au sarcome de Kaposi (McCluggage and Fox, 2021). Les paraspeckles jouent principalement un rôle antiviral, l'un des principaux mécanismes passe par la séquestration de la protéine SFPQ : cette dernière réprime normalement la transcription de nombreux gènes antiviraux tels que RIG-I et IL-8. La séquestration accrue de SFPQ en réponse à l'augmentation des paraspeckles induit donc l'expression (par dérepression) de ces gènes antiviraux. Dans le cas de l'infection par un hantavirus par exemple, NEAT1 va être surexprimé, résultant en une augmentation des paraspeckles. De ce fait SFPQ ne pourra plus inhiber la transcription de RIG-I, dont la cascade de signalisation induit l'expression de IFN-B (Ma et al., 2017). Le deuxième mécanisme par lequel les paraspeckles sont supposés jouer un rôle antiviral est la rétention nucléaire de l'ARNm viral. Par exemple, l'infection par le VIH-1 entraîne une augmentation des paraspeckles, ce qui se traduit par la rétention nucléaire des

transcrits du VIH-1 dépendant de REV (Zhang et al., 2013). L'inhibition de NEAT1, après une infection par le VIH-1, bloque la formation des paraspeckles et augmente considérablement la réplication du VIH-1 du fait de l'augmentation de l'exportation de l'ARNm viral du noyau vers le cytoplasme de l'ARNm. De plus, l'expression de NEAT1 est impliquée dans l'assemblage de plateformes de signalisation appelées " inflammasomes " dans le cytoplasme. L'assemblage des inflammasomes dépend de l'activation d'un sous-ensemble de PRR qui se lient et induisent l'oligomérisation de l'ASC (protéine de type speck associée à l'apoptose et contenant CARD). Dans ce contexte, les paraspeckles nucléaires diminuent et NEAT1_1 se déplace dans le cytoplasme par des mécanismes inconnus pour faciliter l'assemblage de l'inflammasome en se liant à la pro-caspase-1 et en la stabilisant (Zhang et al., 2019).

Enfin, NEAT1 et les paraspeckles peuvent également jouer un rôle dans les pathologies vasculaires comme l'ischémie cardiaque. Dans une étude de Kenneweg *et al*., il a été montré que NEAT1 est induit en réponse à l'hypoxie dans les cardiomyocytes par HIF2 et par p53 dans des conditions basales. Dans un contexte d'ischémie cardiaque, NEAT1 est induit par HIF2 et sécrété dans des petites vésicules avec comme cible les fibroblastes, pour lesquels il va jouer un rôle pro-fibrotique. De plus, cette étude a montré que Neat1 est indispensable à la survie des fibroblastes et des cardiomyocytes. Le KO de NEAT1 in vivo entraîne une altération de la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde (Kenneweg et al., 2019).NEAT1 semble donc jouer un rôle cardioprotecteur dans le cadre de l'ischémie. Bien que l'étude de Kenneweg *et al* suggère que NEAT1 est surexprimé dans l'ischémie, une autre étude réalisée par Zhang en 2019 suggère au contraire que ce dernier est sous-exprimé en réponse à l'ischémie/reperfusion *in vivo* ; les auteurs montrent que l'apport ectopique de NEAT1 après un stress oxydatif permet de favoriser la survie des cardiomyocytes.

Partie 3 : L'hétérogénéité ribosomique : vers une spécialisation du ribosome en réponse au stress

Le contrôle traductionnel est comme nous avons pu le voir précédemment une pierre angulaire de la régulation de l'expression génique dans des contextes physiologiques et de réponse au stress/ pathologiques. L'étude de la contribution des facteurs non ribosomiques, y compris les ARNm (tous les éléments *cis*) et les facteurs liés à l'ARNm (tous les éléments *trans*), représente une part importante des recherches sur le contrôle de la traduction. Récemment, l'hypothèse d'une régulation contrôlée par les ribosomes a émergé, elle propose que les cellules produisent des ribosomes de composition différente et présentant des propriétés de traduction différentes.

1.Le ribosome

Le ribosome, composé de 4 ARN et 80 protéines, assure une fonction fondamentale pour les cellules, celle de décoder l'information génétique portée par l'ARN messager et de la traduire en protéine. A priori son rôle est simple, et pourtant celui qu'on a longtemps considéré comme un simple automate dont la tâche était de décoder l'ARN révèle petit à petit sa capacité à traduire des messagers spécifiques en fonction de sa composition. Serait-il plus complexe, sophistiqué et flexible qu'on ne le pensait ?

1.1. Biogenèse des ribosomes

Le ribosome est un complexe qui résulte de l'alliage entre des ARN et des protéines ribosomiques, c'est donc ce que l'on va appeler un complexe ribonucléoprotéique. Le ribosome humain est composé de 4 ARN ribosomiques (ARNr) et 80 protéines (RP) qui s'assemblent en deux sous-unités, une petite et une grande. Elles sont assemblées dans le nucléole et exportées vers le cytoplasme. La petite sous-unité 40S comporte l'ARNr 18S associé à 33 protéines ribosomiques. La grande sous-unité 60S contient les ARN 28S, 5S et 5,8S ainsi que 47 protéines associées. La biogenèse des ribosomes est un processus complexe qui implique la synthèse, la maturation et l'assemblage des ARN et des protéines ribosomiques afin de former les deux sous-unités ribosomiques. Ce processus nucléolaire se divise en plusieurs étapes : La synthèse des pré-ARNr et des protéines ribosomiques, la maturation par des

clivages endo- et exonucléolytiques des pré-ARNr, les modifications transcriptionnelles et post-transcriptionnelles des pré-ARNr et des protéines ribosomiques, l'assemblage des sous-unités ribosomiques et l'export au noyau puis au cytoplasme. Ces processus sont très couplés et sont réalisés dans les particules ribosomiques tout au long de leur voyage vers le cytoplasme. La biogenèse des ribosomes fait intervenir environ 200 facteurs protéiques et 80 snoARN (small nucleolar ARN) (Baßler and Hurt, 2019). On estime que des centaines de ribosomes sont produits chaque minute. C'est un processus très gourmand en énergie (Warner et al., 2001).

La biogenèse des ribosomes débute dans le nucléole où survient la transcription de l'ADN ribosomique (ADNr). L'ADNr présent dans les nucléoles code pour un gène polycistronique qui contient trois des quatre ARNr. Le transcrit est généré sous la forme d'un précurseur de 47S. Il va subir plusieurs clivages et des réactions chimiques afin d'aboutir aux ARN 18S, 28S et 5.8S matures. Les protéines ribosomiques sont traduites dans le cytoplasme puis importées dans le nucléole où elles vont s'associer aux ARNr naissants. Ces protéines sont également modifiées post-traductionnellement. De nombreux facteurs pré-ribosomiques et des snoRNP (small nucleolar Ribonucleoprotein) vont s'associer à l'ARN précurseur en cours de synthèse afin de permettre le repliement, les modifications et l'assemblage des particules ribosomiques. Dans un premier temps, ce précurseur en cours de maturation sera assemblé avec des protéines ribosomiques et des facteurs d'assemblage pour former des particules intermédiaires 90S que l'on qualifie de pré-ribosomiques. Ces particules vont continuer à être maturées jusqu'à être scindées en deux particules les pré-40S et les pré-60S. Chez les humains, l'ARN 5S n'est pas présent dans l'opéron et il est transcrit par la polymérase III. Il s'associe à la pré-sous-unité 60S néo-formée dans le nucléole. Ces sous-unités sont exportées dans le cytoplasme et après d'ultimes étapes de maturation et de contrôle-qualité elles donneront les deux sous- unités fonctionnelles du ribosome. La majeure partie de cette maturation se déroule dans le nucléole mais une part a également lieu dans le nucléoplasme (Figure 13). Dans la partie qui suit, je détaillerai plus en profondeur ce processus qui conduit à la formation des ribosomes matures chez les eucaryotes.

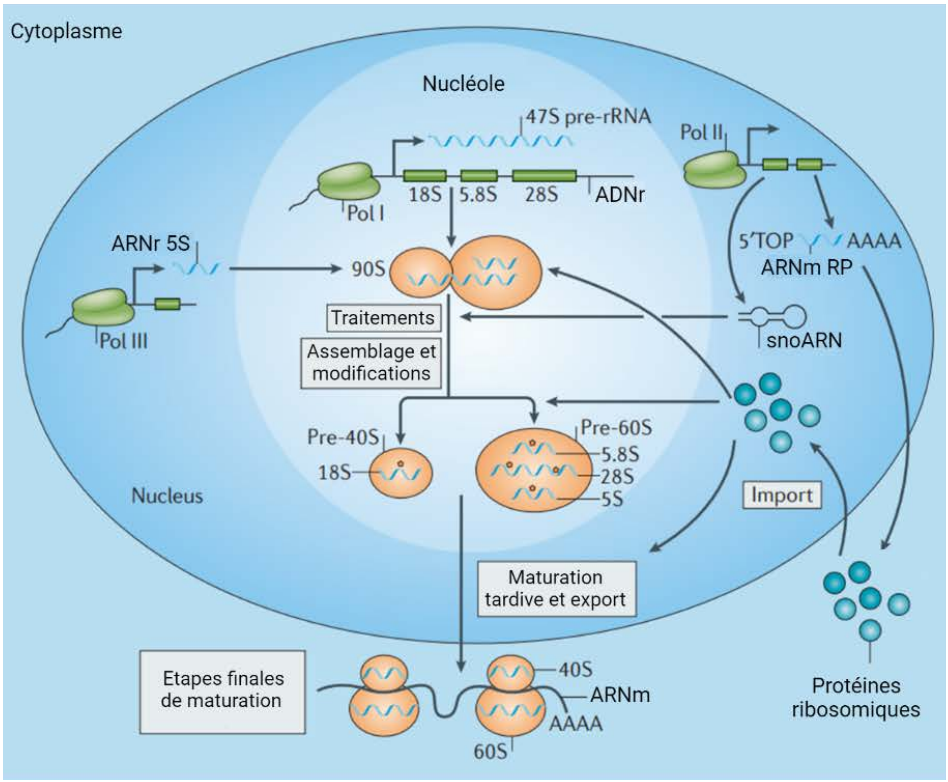


Figure 13 : Biogenèse des ribosomes Le ribosome 80S mature est composé d'une sous-unité 40S contenant l'ARN ribosomique 18S (ARNr) et 33 protéines ribosomiques (PR) et une sous-unité 60S contenant les ARNr 5S, 5,8S et 28S et les 47 PR. La majorité des étapes de la biogenèse des ribosomes se produit dans le nucléole, où l'ARN polymérase I (Pol I) transcrit les ARNr précurseurs 47S (pré-ARNr 47S) à partir de l'ADN ribosomique (ADNr), qui contiennent les séquences des ARNr 18S, 5,8S et 28S. Le pré-ARNr 47S est assemblé de manière co-transcriptionnelle dans le processome 90S avec l'ARNr 5S qui est transcrit par l'ARN polymérase III (Pol III) dans le nucléoplasme, et les PR dont les ARNm des RP sont transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II) dans le noyau. Les ARNm des RP sont exportés vers le cytoplasme pour être traduits, et les RP sont ensuite réimportées dans le nucléole. Lors de la maturation du processome 90S en pré-sous-unités ribosomiques pré-40S et pré-60S, le pré-ARNr est modifié par des mécanismes qui impliquent environ 200 petits ARN nucléolaires (snoARN) principalement transcrits à partir d'introns d'autres gènes induits par Pol II dans le nucléoplasme. Quelques RP supplémentaires sont assemblées dans les pré-40S et pré-60Ssous-unités ribosomiques dans le nucléoplasme et dans le cytoplasme. Le processus complet de la biogenèse des ribosomes implique plusieurs centaines de facteurs accessoires, donnant naissance au ribosome 80S mature (qui ne s'assemble qu'au niveau de l'ARNm pour l'élongation de la traduction). Dans la figure, les modifications de ARNr sont indiquées par des pentagones orange. 5′TOP, voie oligopyrimidique 5′-terminale. (Adapté de Siniša Volarevic et al, 2017). contraste de phase. (A) On peut observer les nucléoles dans les noyaux des cellules HeLa, il s'agit des agrégats plus contrastés. On dénombre deux à trois nucléoles par noyaux. (B) Nucléole en microscopie électronique à transmission. (B') Organisation schématique du nucléole qui se trouve en B; On peut observer les centres fibrillaires en jaune (CF) qui sont entourés par le composant fibrillaire dense en vert (CFD); ces deux derniers baignent dans le corps granulaire en rose (CG). On peut observer une invagination représentée en blanc qui correspond au contact entre le nucléole et l'enveloppe nucléaire et enfin en gris est représentée la chromatine qui peut s'engouffrer dans le nucléole. (De Hernandez-Verdun)

1.1.1. Le nucléole

Le nucléole est un domaine nucléaire dynamique dépourvu de membrane qui est le centre de la synthèse des ARN ribosomiques (ARNr) et d'assemblage des sous-unités ribosomiques. C'est un domaine nucléaire dynamique qui disparaît avant la division cellulaire et réapparaît juste après. Sa structure est visualisable en microscopie par contraste de phase. Il a été identifié pour la première fois dans les années 1700 mais ce n'est que dans les années 1960 que son rôle dans la biogenèse des ribosomes a été décrit (Brown and Gurdon, 1964). Dans les nucléoles humains, on distingue trois composants qui sont observables en microscopie : les centres fibrillaires qui sont enveloppés par le composant fibrillaire dense et enfin le composant granulaire qui est l'environnement dans lequel baignent ces deux composants (Figure 14). Le nucléole est formé autour d'unités répétées d'ADN ribosomique (NOR, nucleolar organisation regions). Chez l'homme, le nucléole est formé d'une coopération entre plusieurs NOR. Ces gènes codants les ARN ribosomiques sont présents sur les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 et il en existe entre 300 et 400 copies chez les humains. Toutes les copies ne sont pas actives (Hernandez-Verdun and Louvet, 2004; Russell and Zomerdijk, 2005). Le nucléole humain est entouré de chromatine condensée et cette dernière peut parfois infiltrer la partie nucléolaire (Hernandez-Verdun and Louvet, 2004). En somme, le nucléole est le berceau de la production des ribosomes et tout commence par la synthèse des ARNr ribosomiques.

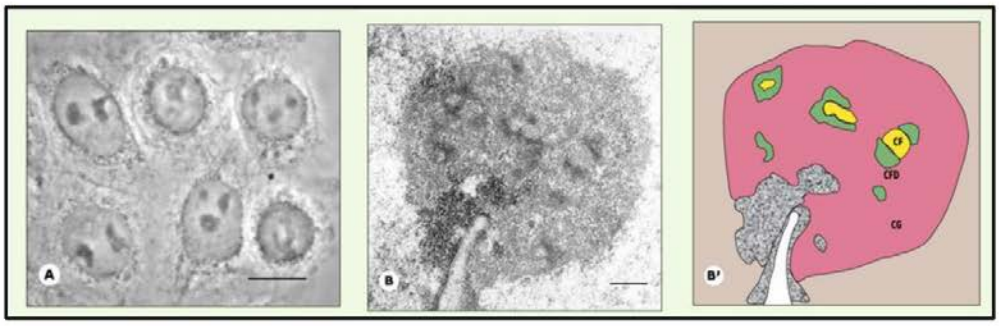


Figure 14 : Organisation d'un nucléole Cellules HeLa observées au microscope à contraste de phase. (A) On peut observer les nucléoles dans les noyaux des cellules HeLa, il s'agit des agrégats plus contrastés. On dénombre deux à trois nucléoles par noyaux. (B) Nucléole en microscopie électronique à transmission. (B') Organisation schématique du nucléole qui se trouve en B; On peut observer les centres fibrillaires en jaune (CF) qui sont entourés par le composant fibrillaire dense en vert (CFD); ces deux derniers baignent dans le corps granulaire en rose (CG). L'invagination représentée en blanc correspond au contact entre le nucléole et l'enveloppe nucléaire. En gris est représentée la chromatine qui peut s'engouffrer dans le nucléole. (De Hernandez-Verdun et Emilie Louvet, 2004)

1.1.2. Synthèse des ARNr

Les ribosomes sont des ribozymes, c'est-à-dire qu'ils sont composés d'ARN ayant la propriété de catalyser des réactions chimiques. En effet, ils sont composés comme mentionné ci-dessus de deux sous-unités, qui renferment des ARN ribosomique siège de son activité catalytique comme le centre peptidyltransférase. La transcription des gènes de l'ARN ribosomique (ARNr) représente 50 % de la synthèse de l'ARN naissant dans une cellule. L'ADN ribosomique qui est présent dans le nucléole est transcrit à l'interface entre les centres fibrillaires et le composant fibrillaire dense sous la forme d'un précurseur de 47S (pré-ARN 47S) (Grummt, 1999; Russell and Zomerdijk, 2005). La transcription par l'ARN Pol I commence par la formation du PIC (preinitiation complex) au niveau de la région promotrice de l'ADNr. Chez les mammifères, il y a deux facteurs qui sont requis pour la formation du PIC : UBF (Ubpstream Binding factor) et SL1 (selectivity factor 1). UBF va se lier au promoteur de l'ADNr. Il est capable d'activer la transcription par la Pol I et de stabiliser le facteur SL1. SL1 est un complexe protéique qui contient la TBP (TATA box binding protein) et 5 autres protéines, il interagit avec UBF et le promoteur de l'ADNr et confère la spécificité à la Pol I par une interaction spécifique entre le promoteur de l'ADNr et la Pol I (Friedrich et al., 2005; Russell and Zomerdijk, 2005). UBF et SL1 interagissent donc de concert afin de donner au promoteur sa spécificité pour la Pol I et recruter efficacement la polymérase. Le facteur RRN3 est aussi requis pour l'initiation de la transcription dépendante de la Pol I. RRN3 se lie à la Pol I afin de promouvoir la liaison de la polymérase avec les facteurs d'initiation liés au promoteur. L'ARN Pol I se lie au facteur SL1 par l'intermédiaire de RRN3. RRN3 agit comme un pont entre la polymérase et le promoteur (Cavanaugh et al., 2008; Miller et al., 2001). Une fois le complexe de pré-initiation formé, RRN3 se dissocie et la phase d'élongation peut commencer. Les facteurs SL1 et UBF restent accrochés au promoteur afin de permettre une nouvelle initiation rapide. La terminaison est contrôlée par le recrutement de deux facteurs au niveau du site de terminaison, TTF1 (Transcription Terminaison Factor) et PRTF (Pol I Transcript-Release Factor), qui permettent à la polymérase de se dissocier de l'ADN.

L'ARNs 5S quant à lui est transcrit dans le nucléoplasme par l'ARN polymérase III en périphérie des nucléoles à partir de multiples gènes (Ciganda and Williams, 2011; Henras et al., 2015; Thomson et al., 2013).

1.1.3. Maturation des ARN ribosomiques

Le précurseur 47S nouvellement transcrit est un ARN polycistronique qui va subir de nombreuses étapes de maturation avant de donner les ARNr matures : 28S, 18S et 5.8S. La maturation

comprend de nombreuses étapes de clivage et d'ajout de modifications chimiques. Cette maturation est très complexe et fait intervenir de nombreux snoARN.

Clivages des ARNr

Le précurseur 47s d'environ 13 kb issu de la transcription par la Pol I contient les ARN 18S, 28S et 5.8S séparés par des régions intergéniques connues sous le nom de séquence ETS (external transcribed sequence) en 5' et 3' et des séquence ITS (internal transcribed sequence) au nombre de deux qui séparent les cistrons. Ces régions intergéniques vont être successivement éliminées à travers de multiples étapes de clivage endonucleolytique et exonucleolytique afin de générer les molécules d'ARN ribosomiques 18S, 28S et 5.8S. L'analyse de la maturation des ARNr a permis d'identifier les nombreuses étapes de clivage et les multiples voies possibles (qui résultent d'un ordre différent dans le clivage) aboutissant à la formation des ARNr matures (Mullineux and Lafontaine, 2012).Le premier clivage a lieu aux sites 01 et 02, et permet de produire le pré-ARNr 45S. Par la suite trois voies alternatives peuvent se mettre en place. Dans la première, majoritaire, l'ARN 45S est coupé au niveau de l'ITS1 en position 2, ce qui génère deux précurseurs : le pré-30S portant le 18S et le pré-32S portant le 5.8S et le 28S (Figure 15). Le pré-30S va être clivé au sites A0 et A1, le plus souvent de façon simultanée, ce qui donne le pré-21S (quand le clivage est découplé on voit apparaître le 26S). Le pré-ARN est ensuite clivé par l'exosome jusqu'à obtenir le 18S (le dernier clivage au site 3 a lieu dans le cytoplasme). Le pré-ARN 32S est clivé dans l'ITS2 au site 3', ce qui crée le 28S final ainsi que le précurseur du 5.8S : le 12S qui conserve encore une partie de l'ITS2. L'exosome va cliver ce précurseur jusqu'à obtenir le 5.8S mature. La deuxième voie clive le précurseur 45S aux sites A0 et A1 de manière concomitante dans le 5'ETS, formant ainsi le pré-41S ; lorsque ce clivage est dissocié on peut voir apparaître le pré-43S, ce dernier est très peu stable. Le pré-41S va ensuite être clivé au site 2 présent dans l'ITS1 qui va générer le 21S et le 32S ; la suite des clivages est la même que décrite précédemment. Dans une troisième et dernière voie alternative, le clivage du 41S ne se fait pas au site 2 mais E, ce qui génère un précurseur 36S qui va subir un clivage aux extrémités et au site 2 pour aboutir au 32S et poursuivre alors son clivage comme vu dans la voie 1 (Henras et al., 2015; Tafforeau, 2015).

De nombreux facteurs sont impliqués dans ces processus de clivage (Figure 15). Notamment le snoRNA U3 qui joue un rôle central dans le clivage au 5'ETS. Il entre dans la composition du complexe responsable des clivages des précurseurs de la petites sous unité « SSU processome », à l'origine des clivages 01, A0 et 1. Le snoARN U8 est quant à lui requis pour le clivage des précurseurs aboutissant à la grande sous-unité, notamment le clivage du 5.8S ainsi que le clivage en 3'. (Tafforeau, 2015)

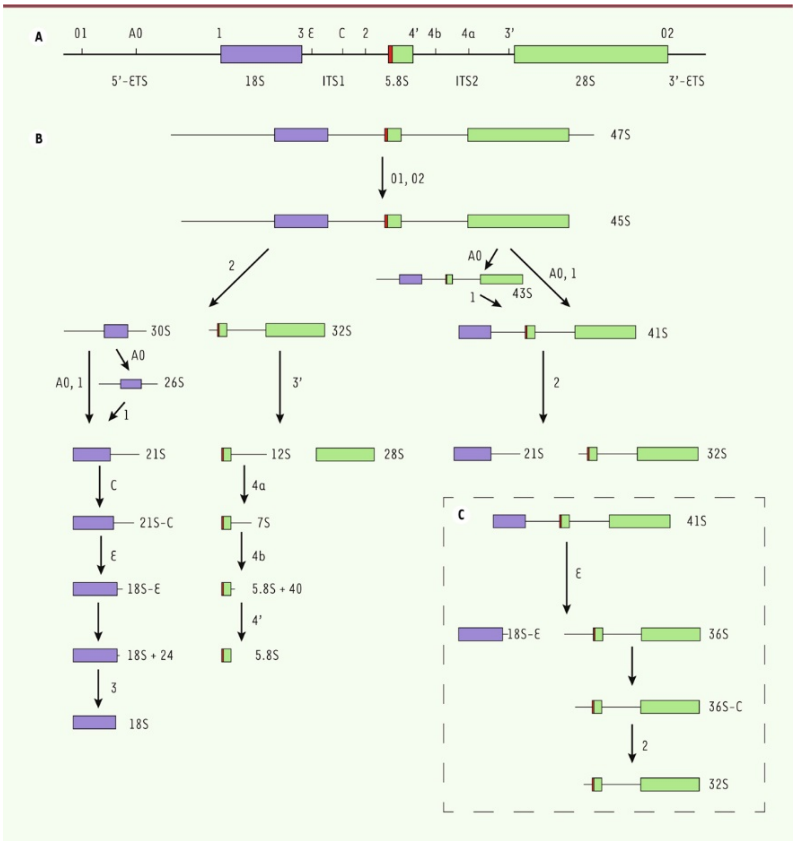


Figure 15 : Les différentes voies de clivage des ARNr (Par Tafforeau et al 2015)

Modification post-transcriptionnelle des ARNr

La structure conservée des ARNr repose sur les protéines ribosomiques mais aussi dans une certaine mesure sur la présence de modifications chimiques au niveau de certains nucléotides d'ARNr particuliers. Les modifications chimiques sont les mécanismes majeurs qui régulent les propriétés et les fonctions des molécules biologiques. Les modifications des ARN sont retrouvées dans toutes les classes d'ARN dans tous les organismes vivants. 171 types de modifications ont été identifiées (Boccaletto et al., 2022, 2018). Parmi les ARN les plus fortement modifiés, on retrouve les ARNt qui contiennent 17% de nucléotide modifiés et juste derrière les ARNr avec approximativement 2% (Boccaletto et al., 2018; Cantara et al., 2011; Jackman and Alfonzo, 2013; Natchiar et al., 2017). Durant leur maturation, les ARNr vont donc subir des modifications co-transcriptionnelles et post-transcriptionnelles. En effet, comme mentionné précédemment, l'assemblage des protéines ribosomiques pour former les sous- unités fonctionnelles du ribosome se fait de façon concomitante avec la maturation et le repliement des ARNr. Durant la formation des pré-sous-unités qui seront ensuite exportées au cytoplasme, un grand nombre de facteurs vont intervenir afin de coordonner ce processus complexe. Ces modifications qui vont être introduites à différents stades de la biogenèse permettent de stabiliser les structures secondaires et tertiaires des ARNr, ce qui permet de maintenir la

structure du ribosome et de garantir son activité catalytique ainsi que sa précision de traduction (Sloan et al., 2016). Ces modifications peuvent affecter la fidélité de traduction, la vitesse de la synthèse protéique et la spécificité de traduction de certains ARN messagers. Malgré l'abondance des nucléotides modifiés dans les ARNr et la diversité des modifications des ARN qui existent dans la nature, seul un petit nombre de modifications chimiques différentes est retrouvé dans les ARNr. Chez les êtres humains, les modifications les plus fréquemment retrouvées sur les ARNr sont les 2'O-méthylations (2'-O-me) des riboses avec 112 sites identifiés, suivi des pseudouridylation (Ψ), avec 104 sites (Krogh et al., 2016; Taoka et al., 2018). Ensemble, ces modifications sont presque 10 fois plus nombreuses que les modifications de bases, ce qui contraste fortement avec la distribution des modifications chez *Escherichia coli*, où l'on trouve deux fois plus de méthylations de bases que de méthylations de riboses et de pseudouridylations. D'autres modifications moins abondantes sont également présentes telle que les méthylations ou les acétylations de bases (Penzo and Montanaro, 2018; Sloan et al., 2016; Tafforeau, 2015). Ces modifications sont souvent retrouvées au niveau de sites importants pour la fonction du ribosome. Il a récemment été montré qu'en plus de leur rôle dans l'activité et la fiabilité du ribosome, les modifications des ARNr peuvent être une source d'hétérogénéité ribosomique et participer à réguler la traduction (Marcel et al, 2013) (nous détaillerons cet aspect dans une partie ultérieure). Nous détaillerons ci-dessous uniquement les modifications les plus fréquentes.

Les pseudouridylation Ψ : La pseudouridine est une modification abondante de l'ARN que l'on retrouve dans tous les domaines de la vie. Elle est retrouvée dans de nombreux ARNnc et les ARNm. Particulièrement dans les ARN de transfert et les ARN ribosomiques (Li et al., 2015; Schwartz et al., 2014). Les ribosomes humains comprennent 104 sites de pseudouridylation. (Taoka et al., 2018). La pseudouridylation consiste en l'isomérisation d'une uridine en pseudouridine (figure 16). Dans la formation d'une pseudouridine à partir d'une uridine, la liaison nitrogène-carbone (N1-C1') qui lie l'uracile au ribose est rompue et la libération de la base induit une rotation à 180° autour de l'axe N3-C6. Cette rotation forme une nouvelle liaison (C5-C1') entre la base et le sucre. Cette modification ne modifie pas les propriétés d'appariement Watson-Crick par rapport à l'uridine mais augmente la stabilité thermodynamique de la base pseudouridylée et permet de stabiliser la molécule d'ARN en offrant un potentiel de liaison hydrogène plus important que celui de l'uridine, et en renforçant la rigidité du squelette sucre-phosphate (De Zoysa and Yu, 2017). Les pseudouridylations sont principalement ajoutées par des complexes snoRNP à boîte H/ACA (Ganot et al., 1997; Henras et al., 2017). Ces complexes sont composés de plusieurs protéines et d'un snoARN guide. Les snoARN H/ACA puisent leur nom de la présence d'une boîte H et d'un motif ACA. Le snoARN à boîte H/ACA

forme généralement 2 structures en tige-boucle, la charnière aussi appelée « boîte H » (5'-ANANNA-3') se localise entre les deux tiges-boucles. Les snoARN à boîte H/ACA possèdent également une séquence ACA aussi nommée « boîte ACA » qui se localise en 3' du snoARN. Ces snoARN sont associés à 4 protéines pour donner le complexe snoRNP: NOP10, NHP2, GAR1 ainsi qu'une enzyme : la dyskerine :DKC1 (Cbf5 chez la levure) . DKC1 est la pseudouridine synthase qui catalyse la Ψ des ARNr. Elle interagit avec le motif ACA. Le snoARN guide sert à diriger la modification par complémentarité de bases avec un site spécifique sur l'ARNr. L'appariement se fait dans la « poche de pseudouridylation » qui se trouve dans la boucle, laissant l'uridine cible non appariée et donc accessible à l'isomérisation par la dyskerine (figure 16). Les protéines NOP10, NHP2, GAR1 assurent des fonctions de chaperonnes, elles permettent de stabiliser la structure tertiaire des ARN et garantir le bon positionnement du nucléotide cible dans le site actif de DKC1 (Penzo and Montanaro, 2018; Sloan et al., 2016). Dans certains rares cas, chez la levure, les modifications pseudouridines dans l'ARNr 5S peuvent être introduites par une pseudourisine synthétase du nom de Pus7 (Decatur and Schnare, 2008).

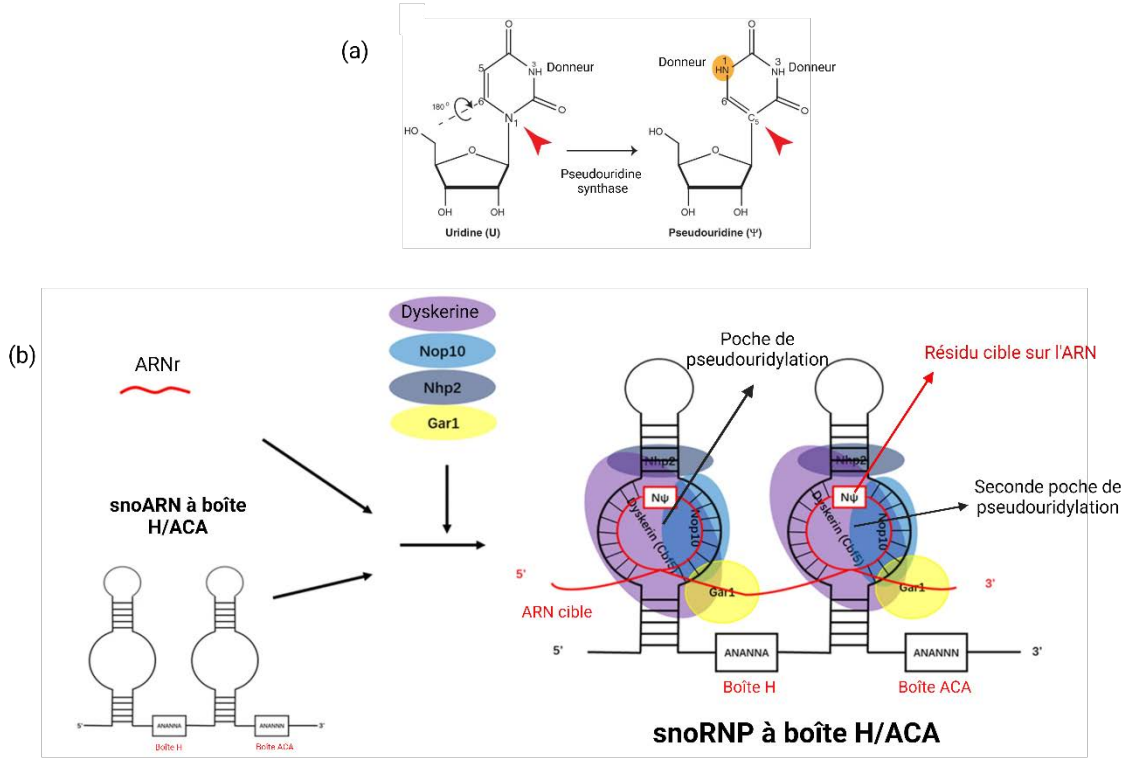


Figure 16 : **snoRNP à boîte H/ACA** (a) La pseudouridine est une isomère de l'uridine. L'isomérisation de l'uridine en pseudouridine implique le détachement de la base uracile en position N1 (tête de flèche rouge) et une rotation (180°) dans l'axe N3-C6. La peudouridine nouvellement synthétisée possède un nouveau site donneur de liaison hydrogène (en orange). (b) Le snoARN H/ACA forme un snoRNP fonctionnel en se liant à des protéines incluant : Nop10p, Nhp2p, Gar1p et Dyskerine. Le snoARN H/ACA contient des éléments conservés qui incluent la boîte H (ANANNA) et la boîte ACA ainsi que deux poches de pseudouridylation. La position de l'uridine cible sur l'ARN est indiquée par une flèche rouge. (Adapté de Ruggero et al, 2014 et de Y. Zhao et al 2022)

2'O-Méthylation : La 2'O-méthylation consiste en l'ajout d'un groupement méthyl en position 2' du ribose (Figure 17). Les méthylations sont principalement ajoutées par des complexes snoRNP à boîte C/D (Lafontaine, 2015; Monaco et al., 2018). Ils sont composés d'une methylatransférase la fibrillarine (FBL, Nop1 chez la levure), des protéines chaperonnes Nop56, Nop58 et la protéine 15,5kDa et d'un snoARN guide. L'ajout de 2'Ome se produit au niveau de certains nucléotides particuliers le long des ARNr et est guidé par la famille des snoARN qui présentent des boîtes C/D, appelées SNORD. En effet, les SNORD interagissent directement avec les ARNr par homologie de séquence pour guider la fibrillarine sur le nucléotide à modifier. La protéine fibrillarine contient un motif conservé de liaison à la S-adénosyl méthionine (SAM) et fournit l'activité catalytique des snoRNP C/D. Les snoARN à boîte C/D forment une structure tige boucle unique, ceci grâce à des motifs conservés appelés boîtes C (5'-RUGAUGA-3') et D (5'-CUGA-3') qui se localisent près de l'extrémité 5' et 3' du snoARN (figure 17). Des motifs internes C' et D' sont également présents. Les motifs C et D ainsi que C' et D' sont capables de s'apparier afin de former respectivement une tige-boucle k-turn et une tige-boucle K-loop (Henras et al., 2017; Watkins and Bohnsack, 2012). Les chaperonnes permettent de positionner le site catalytique de la FBL correctement afin de modifier sa cible, 5 nucléotides en amont de la boîte D/D'. L'interaction entre le snoARN guide et l'ARNr est étendue sur une longueur de 10 à 21 nucléotides et parfois plus, afin d'augmenter la méthylation (van Nues et al., 2011). Les motifs C/D et C'/D' peuvent tous deux lier le groupement des 4 protéines. Ceci signifie qu'à chaque motif est associé une molécule de FBL : il y en a donc deux par snoRNP et cela permet de modifier deux sites à la fois. Les 2'-O-méthylations peuvent aussi être ajoutées par des enzymes autonomes spécifiques d'un site, comme la Sbp1 chez la levure qui modifie le site G2922 de l'ARNr 25S (Lapeyre and Purushothaman, 2004). Chez les bactéries, toutes les 2'Ométhylations sont ajoutées par des enzymes autonomes, qui sont au nombre de 4 (Motorin and Helm, 2011). Ainsi, on peut facilement émettre l'hypothèse que les méthylations par les snoARN et leur nombre élevé sont le fruit de la complexification de l'évolution. On retrouve 4 sites méthylés chez les bactéries, 55 chez la levure et 112 chez l'homme.

Ces modifications sont ajoutées à différents stades de la maturation des ribosomes. Chez la levure, la plupart des 2-O-méthylations de l'ARN 18S sont ajoutées de façon co-transcriptionnelle alors que celles qui sont ajoutées sur le 25S le sont aussi de façon post-transcriptionnelle (Kos and Tollervey, 2010). Dans les cellules humaines également, les modifications sont introduites dans des phases précoces de biogenèse. Ce fait est en accord avec le mécanisme d'appariement des snoARN, dans les étapes précoces, les complexes pré-ribosomiques sont alors dans une structure plus ouverte, ce qui rend l'accès aux sites de modification plus facile pour les complexes de modifications.

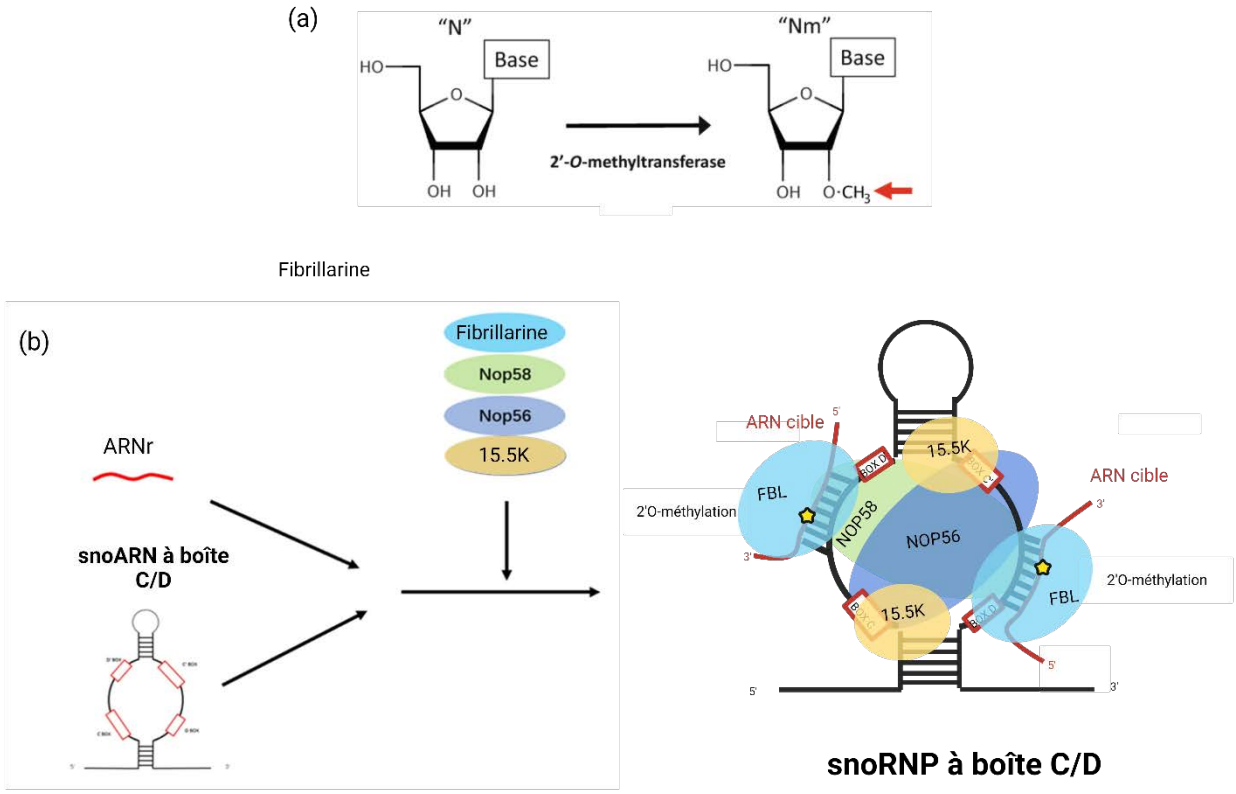


Figure 17 : **snoRNP à boîte C/D** (a) La 2'-O-méthylation (Nm) est l'ajout d'un groupement méthyl sur un ribosome (flèche rouge), cette réaction est médiée par une méthyltransférase (fibrillarine ou autre) (b) Les SnoARN se lient aux ARN cibles par des éléments antisens en amont de la boîte D et/ou de la boîte D'. Les snoARN forment des snoRNP fonctionnelles en se liant à quatre protéines centrales, notamment fibrillarin (FBL), Nop56p, Nop58p et 15,5K. Parmi elles, FBL transfère le groupe méthyle de la s-adénosine-méthionine au groupe 2′-hydroxyle du ribose de l'ARN cible (Adapté de Y. Zhao et al 2022).

Cependant, il a été démontré que des modifications pouvaient être apportées à des phases plus tardives de la formation de la petite sous-unité. Une étude montre que l'hélicase DDX21 pourrait favoriser le recrutement tardif de plusieurs snoARN sur la pré-40S. L'activité de l'hélicase est requis pour le recrutement tardif des SNORD56 et SNORD68 et la méthylation des sites correspondants (Sloan et al., 2015). Ce n'est pas la seule étude qui témoigne du rôle d'une hélicase dans l'ajout de modifications sur les ARNr. Chez la levure également, il a été montré que Prp43 favorise la 2'-O-méthylation par le recrutement de snR64 et que la déplétion de l'hélicase induit une baisse de la méthylation à ce site (Bohnsack et al., 2009). Ces études permettent de comprendre le calendrier et la hiérarchie ordonnée de l'action de snoRNP dans la maturation pré-40S et révèlent un nouveau mode de régulation de la fonction de snoRNP par une hélicase à ARN dans les cellules humaines.

snoARN C/D et H/ACA

Les snoARN sont de petits ARN très abondants et très stables. Ils sont synthétisés par l'ARN polymérase II. Chez l'homme, ils sont régulièrement retrouvés dans les régions introniques de gènes codants pour des protéines ribosomiques et des protéines impliquées dans la traduction (facteurs d'élongation). Ils ont été découverts chez tous les eucaryotes et également chez les archées. Ils agissent dans les modifications, le repliement et le clivage des pré-ARNr par le biais de complémentarité de séquences. Il existe 3 classes de snoARN : les C/D box, les H/ACA et les MRP qui sont actifs en tant que snoRNP, c'est-à-dire en association étroite avec des protéines. La plupart des snoARN C/D et H/ACA sont impliqués dans la modification de l'ARNr (Wayne A Decatur and Fournier, 2002; Watkins and Bohnsack, 2012). Comme mentionné ci-dessus ils possèdent des motifs conservés qui permettent la liaison avec des protéines spécifiques importantes pour la stabilité et la fonction du complexe snoRNP. Une base de données exhaustive des snoARN C/D et H/ACA est disponible (Bergeron et al., 2023). Elle permet d'obtenir de nombreuses informations sur les différents snoARN, leur séquence, leur sites cibles, leur localisation ainsi que leur abondance dans différents types de tissus ou lignées cellulaires. Ces snoARN varient en taille, pouvant aller de 60 à 200 nt (Lafontaine, 2015). Il existe d'autres snoARN, impliqués dans le clivage des pré-ARNr. Parmi elles, on trouve la Rnase MRP, composée de l'ARN MRP (268nt chez l'homme) lié à 10 protéines. Le complexe MRP contient 8 protéines communes avec la RNase P, nécessaires pour la maturation des ARNt à leur extrémité 5'. Les membres de la famille C/D et H/ACA sont aussi impliqués dans le clivage des pré-ARNr ; par exemple le snoARN U3 de la famille C/D également appelé « SSU processome » participe à la maturation des petites sous-unités chez la levure et l'homme, alors que le snoARN U8 est nécessaire pour la maturation de la grande sous-unité (Lafontaine, 2015; Watkins and Bohnsack, 2012). Enfin, les snoARN ont sans nul doute des rôles dans le repliement des pré-ARNr, parce qu'ils agissent par le biais d'un vaste appariement de bases Watson-Crick et peuvent avoir plusieurs cibles sur les pré-ARNr, situées à des distances très éloignées les unes des autres. Il existe approximativement 80 snoARN qui ont été identifiés, 45 snoARN à boîte C/D, communément immunoprécipités avec la FBL, et 30 snoARN à boîte H/ACA. La plupart des snoARN à boîte C/D à l'exception de U3, U14 et U17 jouent un rôle dans la 2'-O-méthylation. La plupart des complexes snoARN à boîte C/D ou H/ACA sont spécifiques d'un seul site sur l'ARNr, cependant il existe également des snoARN capables de modifier plusieurs positions.

Fonction des modifications des ARNr

Les modifications des ARNr ne sont pas réparties uniformément sur le ribosome, mais elles se regroupent plutôt dans les régions fonctionnellement importantes, incluant notamment le site de décodage et de liaison des ARN de transfert (ARNt)(A, P et E), le centre peptidyltransférase et enfin la région entre les deux sous-unités. Cette distribution spatiale indique un rôle clé de ces modifications dans la fonction du ribosome. (Wayne A Decatur and Fournier, 2002; Polikanov et al., 2015; Sloan et al., 2016). Bien que la perte des enzymes composant les snRNP à boîte C/D ou H/ACA démontre un défaut important dans la traduction globale, la croissance et la production de ribosome, la perte de seulement quelques sites individuels peut également impacter la fonction du ribosome. Notamment, la perte de snoARN impliqués dans les modifications de régions fonctionnellement importantes montre des défauts de fonction du ribosome (Esguerra et al., 2008). En plus de leurs impacts sur la synthèse protéique globale, les modifications des ARNr peuvent jouer sur la traduction de messagers spécifiques comme ceux comportant des éléments IRES. Nous détaillerons plus cet aspect dans une partie ulterieur.

En résumé, les modifications des ARNr permettent non seulement de maintenir la structure du ribosome mais aussi de réguler finement la traduction et l'expression génique.

1.1.4. Synthèse des protéines ribosomiques

Les gènes codants pour les protéines ribosomiques sont répartis sur l'ensemble du génome (Uechi et al., 2001). Les protéines ribosomiques sont transcrites par l'ARN polymérase II, les ARN sont ensuite épissés et traduits en protéines ribosomiques, les régions introniques de ces ARNm contiennent de petits ARN nucléolaires ou snoARN. Les protéines ribosomiques sont essentielles pour l'assemblage des ribosomes, la maturation des ARNr et l'export des particules au cytoplasme. La nomenclature des protéines ribosomiques a été récemment redéfinie par un nouveau système de nomination qui prend en considération les homologies entre les espèces (Ban et al., 2014). La plupart des ARNm des RP contiennent des éléments TOP dans leur 5'UTR (5'TOP) (Levy et al., 1991; Yamashita et al., 2008). Cet élément est essentiel pour leur régulation. Il a été démontré que le remplacement de l'extrémité 5' de RPL32 par l'extrémité 5' de l'actine induit une abolition de la régulation de la traduction de l'ARNm RPL32 (Avni et al., 1997). Il a été montré que mTORC1 améliore la traduction de l'ARNm de 5′-TOP via deux mécanismes : phosphorylation de 4EBP1 et/ou LARP1. La phosphorylation de 4EBP1 par mTORC1 prévient la séquestration du facteur d'initiation 4E et promeut la traduction des messagers via leur 5'TOP (Thoreen et al., 2012). LARP1 a un double rôle dans la régulation des messagers qui possèdent un 5'TOP, un rôle de répresseur et aussi

d'activateur. En tant que répresseur, LARP1 perturbe la liaison de 4E à l'ARNm en se liant directement au motif TOP et empêche ainsi la formation du complexe 4F. L'activation de la voie mTORC1 entraîne la phosphorylation de LARP1 par la kinase S6. LARP1 phosphorylé ne peut plus se lier au 5'UTR et réprimer la traduction, à la place, se lie au 3' des ARNm avec un 5'TOP et favorise leur traduction (Harvey et al., 2018; Hong et al., 2017).

Les ARNm des protéines ribosomiques sont traduits dans le cytoplasme et subissent des modifications post-traductionnelles, tel que des acétylations, des méthylations, des phosphorylations ou encore des ubiquitylations (Simsek and Barna, 2017). La présence de chaperonnes et de transporteurs est nécessaire afin que les protéines ribosomiques soient réimportées dans le noyau. Les protéines ribosomiques pourvues de séquence NLS vont être importées dans le noyau via entre autres des importines. Une partie d'entre elles sont importées jusqu'au nucléole afin de débuter l'assemblage afin qu'ils puissent être incorporés dans la particule pré-ribosomique.

1.1.5. Assemblage, maturation et export du ribosome

La phase d'assemblage débute dès la transcription du précurseur polycistronique 47S. Elle s'effectue tout au long du processus de biogenèse depuis le nucléole jusqu'au cytoplasme. L'assemblage et le remodelage des particules fait intervenir de nombreux facteurs tel que des ARN hélicases, des GTPases et des ATPases (Klinge and Woolford, 2019; Peña et al., 2017). En outre, des chaperonnes spécifiques contribuent à l'importation nucléaire et au chargement ultérieur de plusieurs protéines ribosomiques sur ces particules préribosomiques, contribuant ainsi à leur incorporation hiérarchique (Baßler and Hurt, 2019). Tout d'abord, les RP (ribosomal protein) vont se lier avec la partie du précurseurs 47S qui correspond au 18S (Fox et al., 2019). Ces incorporations font intervenir de nombreux facteurs d'assemblage (plus de 200), et l'assemblage des protéines ribosomiques avec le précurseur 47S forme la particule pré-ribosomique 90S. Ce processus se déroule dans le compartiment fibrillaire dense du nucléole. Suite au clivage du précurseur (vue précédemment) les pré-sous-unités 40S et 60S sont formées. L'ARNr 5S est incorporé à la sous-unité pré-60S dans le nucléole sous forme de complexe RNP en association avec les protéines RPL5 et RPL11. L'incorporation des RP suit une hiérarchie bien précise et bien conservée. Plusieurs étapes de maturation seront nécessaires avant l'obtention des sous-unités matures. La maturation se poursuivra dans le noyau puis après export dans le cytoplasme.

1.2. Régulation de la biogenèse

Les cellules régulent de façon très étroite la quantité de ribosomes, et c'est la transcription de l'ADNr qui est limitante dans ce processus. Dans différents contextes, physiologiques ou pathologiques, la production de ribosomes va être régulée. Les rythmes circadiens jouent un rôle important dans le processus de coordination de la synthèse des ARNr et des RP. Ils régulent aussi l'assemblage des ribosomes (Jouffe et al., 2013; Sinturel et al., 2017). L'altération de la biogenèse des ribosomes est une caractéristique clé du cancer. En effet, dans les cellules cancéreuses, on peut observer une augmentation importante de la production de ribosomes principalement par le biais d'une transcription accrue par l'ARN Pol I, l'ARN Pol II et l'ARN Pol III (Bustelo and Dosil, 2018; Ruggero, 2013). La voie mTOR est fortement impliquée dans la régulation de la biogenèse des ribosomes en stimulant la transcription par l'ARN pol I et III des ARN ribosomiques. mTOR participe aussi à la régulation la traduction des RP à travers l'élément 5'TOP de leur ARNm (Iadevaia et al., 2014). Plusieurs onco-supresseurs comme p53 et BRCA1 peuvent réguler la biogenèse des ribosomes. La gardienne du génome p53, qui est une protéine suppresseur de tumeur, est impliquée dans une régulation négative de la production de ribosome en réprimant la transcription de l'ARN Pol I et Pol III (Cairns and White, 1998; Zhai and Comai, 2000). P53 est également capable d'interagir avec la région promotrice du gène de la FBL et d'inhiber sa transcription. Plus intéressant encore, comme la FBL est une méthyltransférase responsable de la méthylation du 2′ ribose de l'ARNr, p53 contrôle également l'état de méthylation des ARNr dans les ribosomes (Marcel et al., 2013). Le proto-oncogène Myc quant à lui régule positivement la biogenèse des ribosome en favorisant la transcription par la Pol I, II et III (Arabi et al., 2005; Boon et al., 2001; Gomez-Roman et al., 2003; van Riggelen et al., 2010).

Aujourd'hui, il a été démontré qu'en fonction de leur statut, de leur environnement, de leur développement ou de leurs conditions pathologiques, les cellules produisent différents types de ribosomes qui diffèrent dans leur composition en RP (par exemple, absence de certaines RP, remplacement par des protéines orthologues, modifications post-traductionnelles des RP) et dans les modifications chimiques des ARNr. Ces observations ont donné naissance au concept de "ribosomes spécialisés". Ce concept se base des données substantielles provenant de divers domaines de la biologie, apportant un soutien convaincant à cette audacieuse perspective sur le rôle des ribosomes dans l'expression des gènes et sa contribution au phénotype cellulaire. Dans la partie qui va suivre, nous allons aborder ce concept plus en profondeur.

2. De l'hétérogénéité ribosomique aux ribosomes spécialisés dans la réponse au stress et leur rôle dans les pathologies

Au cours de la dernière décennie, les progrès dans les technologies de génomique et de protéomique qui permettent la comparaison des niveaux d'ARNm (séquençage), de l'occupation des ribosomes (ribosome profiling) et du niveau de protéines (spectrométrie de masse) ont permis de construire des cartes complètes d'expression des gènes. L'analyse de ces ensembles de données a révélé que les niveaux de transcription ne suffisent pas à eux seuls à prédire les niveaux de protéines et que le contrôle traductionnel est susceptible de jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes, en particulier lors de processus comme le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, les réponses aux stimuli et au stress (Liu et al., 2016). Les données portant sur les analyses des transcrits en cours de traduction sont davantage prédictives de l'expression des gènes que l'analyse de la quantité de transcrits (Liu et al., 2017). Dans des cellules cardiomyocytaires humaines (HL-1), l'expression des facteurs de croissance angiogéniques et lymphangiogéniques est prinicpalement régulée au niveau traductionnel plutôt qu'au niveau transcriptionnel en réponse au stress hypoxique (Hantelys et al., 2019). Durant le processus de développement également, de nombreux gènes sont régulés au niveau de la traduction, tels que les gènes Hox et les composants de la voie MAPK, WNT, PI3K (Fujii et al., 2017; Kondrashov et al., 2011). La manière dont la régulation traductionnelle de l'expression des gènes est contrôlée mécaniquement est un domaine de recherche intense. Des travaux récents examinant le ribosome et plusieurs complexes de facteurs d'initiation de la traduction dans les populations cellulaires ont révélé l'hétérogénéité et les fonctions spécialisées des composants individuels. En effet, au cours des dix dernières années, il est devenu de plus en plus évident que les ribosomes sont nettement plus hétérogènes qu'on ne le pensait à l'origine, les variations émanant à la fois de la teneur en ARNr et en protéines des ribosomes. Plus précisément, ces variations comprennent l'expression de ARNr et de RP spécifiques du type cellulaire, la modification de l'ARNr (par exemple, la pseudo-uridylation, la méthylation), la modification de RP (par exemple, l'acétylation, la glycosylation, l'hydroxylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, l'ufmylation), de la stoechiométrie des RP, des facteurs d'assemblage des ribosomes, et des protéines associées aux ribosomes (RAP, ribosomal associated protein) (Figure 18). Il est proposé que certains de ces ribosomes distincts sur le plan de la composition puissent être fonctionnellement spécialisés et capables de réguler la traduction d'ARNm spécifiques. L'identification et la caractérisation fonctionnelle des ribosomes spécialisés

pourraient permettre de comprendre un nouveau pan du contrôle de l'expression génique, au niveau de la traduction, où le ribosome lui-même est un acteur clé de la régulation. Mais il ne s'agit a priori pas d'une définition au sens strict qui signifierait que « ribosome spécialisé » = « 1 enzyme, un substrat », non ici le concept et les différentes études qui ont vu le jour favorisent le concept selon lequel une machinerie de traduction spécialisée à la capacité à traduire des groupes de messagers particuliers, tout en conservant sa capacité à traduire les autres messagers et garantir une traduction globale également (Gabut et al., 2020; Monaco et al., 2018; Sharma and Lafontaine, 2015). La composition des ribosomes est susceptible d'être dynamique et donc de changer rapidement en réponse aux défis environnementaux et développementaux.

Dans la partie ci-dessous, je présenterai un petit ensemble de travaux et d'arguments en faveur de ce nouveau concept. Nous verrons comment les ribosomes et leur composition peuvent affecter la traduction de messagers spécifiques et quelle influence cela peut avoir dans les pathologies humaines tels que les cancers, les maladies cardiovasculaire, neuronales ou les maladies congénitales comme les ribosomopathies.

2.1. Un peu d'histoire

Les origines conceptuelles de la spécialisation des ribosomes remontent aux premiers jours de la biologie moléculaire. Pourtant, ce domaine n'a que récemment commencé à prendre de l'ampleur, avec de nombreuses études identifiant des populations de ribosomes hétérogènes distinctes à travers plusieurs espèces et systèmes modèles. Dans les années 1950, après la découverte de l'ADN, Francis Crick proposa une hypothèse audacieuse pour expliquer le flux d'information génétique du noyau vers le cytoplasme. Étant donné qu'il observait que beaucoup d' ARN de la cellule étaient des ARN ribosomiques, il postula que le ribosome était un porteur d'information intermédiaire et que donc chacun des millions de ribosomes présents dans la cellule était personnalisé pour un seul transcrit (Crick, 1958). Dans cette conception de l'expression génique « 1 gène, 1 ribosome, 1 protéine », la version la plus extrême de l'hétérogénéité ribosomique est présentée. Cette hypothèse a été débattue par le club RNA Tie (le groupe exclusif de 20 scientifiques - un par acide aminé - qui se sont rencontrés et ont correspondu pour discuter du code génétique). L'hypothèse était donc qu'un gène contrôlerait l'expression d'un ribosome particulier qui à son tour dirigerait la synthèse de la protéine correspondante. L'ARNr serait la matrice utilisée pour la synthèse protéique. Cependant, ce modèle a rencontré une difficulté majeure : la grande homogénéité dans la taille et la composition des ARNr qui ne reflétait pas la diversité des protéines. Parallèlement, François Jacob et Jacques Monod ont postulé que des ribosomes de même composition pourraient traduire indifféremment tous les ARNm

rencontrés (Jacob and Monod, 1961). Jacob et son équipe ont démontré qu'un ARNm de phage était efficacement traduit par le ribosome bactérien, ce qui a conduit à l'hypothèse que les ribosomes sont des structures invariables, qui synthétisent le messager qu'ils contiennent. Ce manuscrit, à l'aide d'autres études, a suffi à mettre « au placard » l'hypothèse des ribosomes sur mesure pendant de nombreuses années et a réduit le ribosome au rôle de simple « automate » destiné à traduire sans fonction de régulation intrinsèque.

Néanmoins, depuis les années 80, de nombreuses études sont venues contester cette interprétation en soutenant l'hétérogénéité des ribosomes : sur l'expression des transcrits de protéines ribosomiques, les allèles variants d'ARNr, l'incorporation de paralogues RP, les altérations de la stœchiométrie des RP, ainsi que les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr et post-traductionnelles des RP (Gay et al., 2022; Genuth and Barna, 2018a; Xue and Barna, 2012). Deux facteurs importants ont contribué à l'idée de ribosomes spécialisés : (a) la prévalence de l'expression de RP spécifiques de certains tissus et (b) les phénotypes distincts observés lorsque les gènes des RP sont perturbés (Bortoluzzi et al., 2001; Guimaraes and Zavolan, 2016; Kampen et al., 2020; Kondrashov et al., 2011). En effet, l'existence de populations hétérogènes de ribosomes chez les eucaryotes supérieurs est étayée par l'observation que des perturbations génétiques des RP ou de la machinerie de biogenèse des ribosomes chez l'homme et la souris conduisent à des pathologies tissu-spécifiques, appelées ribosomopathies (Kampen et al., 2020). En effet, alors qu'il existe de nombreuses preuves démontrant l'hétérogénéité des ribosomes, il y a encore peu d'études qui déterminent si ces ribosomes hétérogènes présentent une spécialisation fonctionnelle, en particulier chez les eucaryotes supérieurs.

Les Ribosomopathies

Les ribosomopathies sont un groupe de troubles hétérogènes résultant de mutations dans les gènes codants pour les RP, les gènes qui codent pour les facteurs de clivage ou de modification des ARNr ou les facteurs de biogenèse des ribosomes. Cela peut conduire soit à une altération de la traduction globale, soit à celle d'ARNm spécifiques exprimés uniquement dans certains tissus. Voici quelques exemples de ribosomopathies : l'anémie Diamond-Blackfan (DBA) : les patients atteints présentent une réduction des érythrocytes, mais peuvent également présenter d'autres symptômes cliniques, notamment des anomalies cardiaques, en fonction du gène RP muté. Environ 60 % des patients DBA présentent des mutations hétérozygotes dans l'un des 17 gènes codant pour une RP telle que RPS19, RPL5 ou RPL11 (A and Bl, 2010; Boria et al., 2010; Mirabello et al., 2017). Dans la dyskératose congénitale (DC), les patients atteints présentent généralement une insuffisance médullaire et une hyperpigmentation cutanée, entre autres caractéristiques cliniques. La DC est considérée comme une

ribosomopathie due à des mutations de DKC1, l'enzyme qui pseudouridyle les ARNr (Aspesi and Ellis, 2019). Ces pathologies causées par des défauts au niveau des composants de la machinerie de traduction a fortement appuyé l'existence de ribosome de composition variable.

2.2. L'hétérogénéité des composants protéiques du ribosome : rôles physiologiques et pathologiques

Plusieurs études récentes ont porté sur la composition protéique des ribosomes. Protéines ribosomiques paralogues, stœchiométrie, modifications des PR, les sources d'hétérogénéité provenant des protéines ribosomiques sont nombreuses. Dans la partie qui va suivre nous allons les aborder. En plus des protéines ribosomiques, les protéines associées au ribosome (RAP, ribosomal-associated protein) peuvent représenter une source d'hétérogénéité ribosomique. Ces nombreuses variables peuvent conduire à une capacité du ribosome à traduire des messagers spécifiques en réponse à différents stress et dans différentes pathologies.

2.2.1. Composition en protéines ribosomiques

On a longtemps pensé que toutes les RP étaient présentes dans le ribosome à tout moment (Uechi et al., 2001). D'ailleurs certaines d'entre elles sont toujours utilisées comme gène de référence pour normaliser les qPCR (Thorrez et al., 2008). Cependant de nombreuses preuves démontrent maintenant que la composition, la stœchiométrie et la présence de paralogues peuvent varier dans le ribosome et que cela peut influencer la traduction.

L'hétérogénéité ribosomique médiée par les paralogues

L'incorporation différentielle de protéines ribosomiques paralogues dans les ribosomes fournit une source d'hétérogénéité. Les paralogues de RP sont des protéines ribosomiques qui ont subi une duplication de gènes dans de nombreux cas et peuvent donc exister sous forme de paires de paralogues comprenant des isoformes de haute similitude. Il existe toujours une forme majeure qui est plus incorporée que la forme mineure, ces deux formes sont régulièrement notées A ou B. Chez les mammifères, bien qu'il existe environ 2 000 séquences codant pour des protéines ribosomiques, la plupart d'entre elles sont supposées être des pseudogènes, et la plupart des protéines ribosomiques fonctionnelles sont codées par un seul gène. En revanche, chez les levures, les plantes et les mouches,

de nombreuses protéines ribosomiques sont codées par plus d'un gène. *Saccharomyces cerevisiae*, par exemple, présente 59 des 78 protéines ribosomales avec deux copies génomiques. Au départ, on pensait que les paralogues avaient des rôles redondants car la croissance des mutants de RP était sauvée grâce à l'expression de leurs paralogues (Rotenberg et al., 1988). Des études ultérieures ont révélé que ces paralogues pouvaient être associés à la traduction d'ensembles spécifiques d'ARNm et/ou avaient une expression tissus-spécifiques. Pour que de telles paires aient été maintenues, il a été proposé que les isoformes individuelles puissent posséder une spécificité fonctionnelle et conférer des fonctions uniques indépendantes de leur paralogue partenaire. Et il se trouve que malgré une homologie de séquence élevée, les deux copies du gène de la protéine ribosomique ne sont pas toujours fonctionnellement redondantes. Par exemple, la délétion d'une RP mais pas de son paralogue peut donner lieu à des phénotypes différents. Chez la mouche par exemple, on retrouve certains paralogues différentiellement exprimés dans les tissus. Le paralogue RPL22, RPL22-like est spécifiquement enrichi dans les testicules alors que RPL22 est quant à lui ubiquitaire. Les deux protéines sont essentielles et sont incorporées dans les polysomes et les monosomes, mais pas dans les fractions libres (Marygold et al., 2007). Chez les mammifères, peu de RP possèdent des paralogues, mais ces rares exceptions illustrent bien leur rôle. Des exemples connus sont la protéine RPL22-like et la protéine RPL4Y dans les testicules de mammifères. On peut également citer RPS4 qui est codée par trois gènes (RPS4X, RPS4Y1 et RPSY2) situés sur le chromosome X et le chromosome Y. Chez les hommes, RPS4X et RPS4Y1 sont exprimées de manière ubiquitaire, mais l'expression de RPS4Y2 est limitée aux testicules et à la prostate, suggérant un rôle spécifique de la protéine ribosomique codée par RPS4Y2 chez l'homme et la possibilité de ribosomes spécifiques aux niveau des testicules (Lopes et al., 2010). RPL10, RPL22 et RPL39 possèdent des paralogues chez la souris. Ces derniers ont tout comme RPS4 une localisation différentielle. RPL10-like et RPL39-like sont retrouvées uniquement dans les testicules alors que RPL22-like est absente les testicules mais présente dans le foie et la glande mammaire. De façon intéressante RPL39-like a été identifiée dans les polysomes et les monosomes (Sugihara et al., 2010). L'expression de RPL3L, un paralogue de la protéine ribosomale canonique RPL3, est nettement plus élevée dans le muscle squelettique - où il a été constaté qu'elle régulait la croissance (Chaillou et al., 2016; Guimaraes and Zavolan, 2016). En réponse à un stimulus hypertrophique, l'expression de RPL3L dans le muscle squelettique diminue de 82 %, tandis que l'expression du paralogue principal RPL3 est significativement augmentée. Ainsi RPL3L fonctionne comme un régulateur négatif de la croissance musculaire. Il est tentant de supposer que ces gènes dupliqués ont été cooptés pour des fonctions extra-ribosomiques dans les tissus dans lesquels ils sont exprimés. Cependant, au moins dans certains cas comme celui de RPL39L, les paralogues font partie

du ribosome, ce qui suggère fortement qu'ils s'engagent activement dans des complexes de traduction (Sugihara et al., 2010). Une possibilité est que les paralogues de RP entrent en compétition avec leurs homologues canoniques au cours de la biogenèse des ribosomes pour produire des "ribosomes spécialisés" qui permettent la traduction sélective des ARN.

Dans la levure *S. cerevisiae*, les gènes des protéines ribosomiques sont principalement produits à partir de gènes dupliqués régulés de manière indépendante. 75% des gènes codant des RP sont dupliqués. Récemment également, des travaux ont montré que l'exposition au stress peut moduler l'expression des paralogues dits mineurs chez la levure et moduler la composition des ribosomes en réponse au stress (Ghulam et al., 2020). Dans la même série, il a été démontré que les paralogues peuvent participer à la régulation de la traduction en réponse à l'exposition à des médicaments. En effet, dans le modèle de levure, la RPL7 possède un paralogue. La forme majeure régule la biogenèse des ribosomes et la croissance cellulaire tandis que la forme mineure est impliquée dans la résistance à la staurosporine (Ghulam et al., 2022). Les deux paralogues agissent en régulant des sous-groupes de messagers différents. Le paralogue mineur régit la traduction de gènes impliqués dans l'intégrité de la paroi cellulaire. Ces deux paralogues sont acétylés de manière différente : la forme mineure est hyperacétylée dans son domaine N-terminal. Dans des conditions normales, la plupart des ribosomes incorporent la forme majeure hypoacétylée, ce qui favorise la traduction des gènes avec des cadres de lecture ouverts courts. L'exposition à différents médicaments (Staurosporine, l'Hygromycine et le NaCl) augmente la production de ribosomes portant le paralogue mineur hyperacétylé qui favorise la traduction des cadres de lecture ouverts longs. Un grand nombre de ces gènes dépendants des paralogues codent des protéines de la paroi cellulaire qui pourraient favoriser la tolérance aux médicaments, car leur traduction augmente après l'exposition aux médicaments. Ces mécanismes suggèrent qu'un contrôle de la traduction est possible grâce à l'utilisation d'isoformes spécifiques (Malik Ghulam et al., 2022).

L'hétérogénéité ribosomique médiée par la stœchiométrie des PR

La stœchiométrie des protéines ribosomiques est une source importante d'hétérogénéité pour le ribosome. En effet, avec l'émergence des théories sur l'hétérogénéité, la question de savoir si les protéines ribosomiques étaient présentes dans le ribosome en un seul exemplaire et avec un ratio 1 : 1 s'est posée. La première étude montrant une différence de stœchiométrie entre les protéines ribosomiques a été réalisée en 1972 chez *E. Coli*. Dans cette étude, les auteurs montrent que toutes les RP ne sont pas présentes avec le même ratio dans les deux sous-unité 30S (équivalent du 40S chez

l'humain) et 50S (équivalent du 60S chez l'humain)(Weber, 1972). Plus récemment, deux études réalisant de la spectrométrie de masse sur des fractions isolées à partir de profils de polysomes ont identifié une stœchiométrie différentielle des RP dans les cellules souches embryonnaires de souris (mCSE) et l'une de ces études a également montré des changements dans la stœchiométrie des RP chez la levure entre deux conditions de croissance différentes (Slavov et al., 2015). Slavov et al ont analysé la composition des monosomes et des polysomes de levure bourgeonnante. Leur analyse a montré que la stœchiométrie entre les RP dans les cellules de levure et les mCSE dépend à la fois des conditions de croissance et du nombre de ribosomes liés par ARNm. Ainsi, la stœchiométrie différentielle des RP a été associée à différents statuts traductionnels dans les cellules souches embryonnaires murines. Ce résultat suggère que la stœchiométrie différentielle des RP ne se limite pas aux RP paralogues. Dans la seconde étude, Shi et al ont à leur tour utilisé la spectrométrie de masse afin d'identifier l'abondance des RP dans les CSE (Shi et al., 2017). Ils ont rapporté que les RPL10a/uL1, RPL38/eL38, RPS7/eS7, RPS25/eS25 sont présentes dans seulement 40 à 60 % des ribosomes en moyenne. L'hétérogénéité de la composition des ribosomes a été révélée pour la première fois au sein d'un seul type de cellules et d'une seule fraction de profil de polysomes. Afin d'étudier l'impact fonctionnel de cette hétérogénéité, les auteurs ont choisi de suivre par un marquage endogène les protéines RPS25 et RPL10A. Ces deux protéines se localisent au niveau du tunnel de sortie des ARNm. Les auteurs ont pris soin de vérifier que les protéines taguées étaient correctement incorporées dans les ribosomes avant de poursuivre leurs investigations. Par la suite ils ont regardé si les messagers recrutés par les ribosomes contenant RPS25 et RPL10A ou ne les contenant pas étaient différents. Effectivement, les transcrits enrichis dans les ribosomes contenant RPL10A et RPS25 ne sont pas les mêmes. Les transcrits enrichis dans les ribosomes RPL10A comprennent des gènes importants pour l'organisation de la matrice extracellulaire (ECM) et le processus métabolique des glycosphingolipides alors que les transcrits associés à la réponse au stress et à la mort cellulaire, tels que les ARNm de la protéine de liaison X-box 1 (Xbp1), de la protéine de choc thermique 1 (Hspb1) et de la polo-like kinase 3 (Plk3) sont moins présents dans les ribosomes RPL10A. Les ribosomes contenant RPS25 traduisent préférentiellement presque tous les ARNm des gènes de la voie du métabolisme de la vitamine B12. Les auteurs ont également observé que RPL10A traduit préférentiellement des ARNm contenant des IRES (CrPV, HCV, EMCV) (Shi et al., 2017). Dans une autre étude, la protéine RPL38 a été identifiée comme essentielle pour le développement embryonnaire de la souris (Kondrashov et al., 2011). RPL38 est nécessaire à la formation de complexes ribosome 80S-ARNm Hox et est également nécessaire pour la traduction contrôlée par les IRES des gènes Hox, qui sont des régulateurs clés de la morphologie du squelette

axial (Xue et al., 2015). Il se trouve que RPL38 a été identifiée comme étant sous-stœchiométrique dans les polysomes de CSE (Shi et al., 2017).

2.2.2. L'hétérogénéité par les modifications post-traductionnelles des protéines ribosomiques

Les RP sont également soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles différentes, leurs fonctions sont encore peu connues (Simsek and Barna, 2017). Il existe une variété importante de modifications des PR qui incluent des acétylations, des hydroxylations, des phosphorylations, des méthylations, des sumoylations, des ubiquitinylations ou encore des UFMylations.

Une des modifications les plus connues est la phosphorylation de RPS6, décrite pour la première fois il y a plus de 40 ans (Meyuhas, 2015). Une étude pionnière menée dans les années 70 par David Kabat a montré qu'une protéine de 33 kDa, appelée protéine F, qui réside dans la petite sous-unité du ribosome, subit une phosphorylation dans les réticulocytes de lapin (Kabat, 1970) . La phosphorylation de RPS6 est particulièrement importante pendant la régénération des hépatocytes. C'est la seule RP phosphorylée pendant la régénération du foie (Gressner and Wool, 1974). Cette protéine possède 5 résidus sérine qui peuvent être phosphorylés. Plusieurs voies de signalisation de la réponse au stress peuvent induire la phosphorylation de RPS6, notamment la voie mTOR. Il a été montré que l'état de phosphorylation de RPS6 n'affecte pas la traduction globale. En effet, une première étude a montré que la substitution des deux résidus sérine phosphorylables par des alanines dans la RPS6 de la levure n'a pas d'effet détectable sur la croissance de la levure. La phosphorylation de RPS6 et l'activité de la kinase S6 sont toutes deux dispensables à une synthèse protéique globale efficace. De plus, de nombreuses études ont montré que la perte de cette phosphorylation n'entrave pas la quantité de ribosomes engagés ni l'activité traductionnelle des cellules (Meyuhas, 2015). La phosphorylation de S6 est impliquée dans de nombreux processus tels que la taille des cellules ou l'homéostasie du glucose, S6K a également été impliqué comme un acteur important dans le développement du cancer. Par exemple, un rapport publié précédemment a montré que les pancréas d'environ 30 % des souris exprimant un mir-Akt1 constitutivement actif dans leurs cellules β subissaient une transformation hyperplasique conduisant à la formation d'insulinomes. Cependant, la déficience en S6K1 a totalement protégé les animaux de cette tumorigenèse. En présence d'Akt constitutif, les souris Rps6(P-/-) présentent une fidélité de traduction réduite, un niveau de p53 accru et une plus grande sensibilité aux dommages de l'ADN (Alliouachene et al., 2008). Bien que la phosphorylation de RPS6 ait été associée à divers contextes cellulaires physiologiques et pathologiques

(Meyuhas, 2015), la question de savoir si les ribosomes contenant RPS6-P ont une activité de traduction différente reste en suspens. Une seule étude a suggéré que la phosphorylation de RPS6 stimule la traduction d'une classe spécifique d'ARNm contenant une séquence 5′-TOP, en réponse à la signalisation mTOR (Meyuhas, 2000). Elle a été réfutée récemment par Bohlen *et al* qui, en évaluant les ARNm traduits par les ribosomes contenant RPS6-P, ont montré que RPS6 est progressivement déphosphorylée sur les ribosomes à mesure qu'ils traduisent, et que donc RPS6-P est impliqué dans la traduction des messagers avec des cadres de lectures courts. Ces auteurs ont aussi pu montrer que la traduction des éléments 5'TOP ne dépend pas de la phosphorylation de RPS6 (Bohlen et al., 2021).

La phosphorylation de RPL12 sur la sérine 38 (pS38) a été retrouvée associée à la mitose (Imami et al., 2018). En effet, la phosphorylation de RPL12/uL11 par CDK1 est associée à la traduction de pools d'ARNm spécifiques tels que les composants du kinétochore et le fuseau mitotique tandis que la traduction globale est inchangée.

Un autre exemple de modification est l'hydroxylation d'un résidu proline de RPS23 dans le centre de décodage du ribosome chez la levure, les mouches et les humains, qui est nécessaire pour une terminaison efficace de la traduction et la méthylation de RPL3 chez S. cerevisiae augmente la fidélité de la traduction (Al-Hadid et al., 2016; Imami et al., 2018; Katz et al., 2014; Loenarz et al., 2014; Singleton et al., 2014). Chez l'homme, RPS23 est hydroxylé dans le noyau par l'oxygénase OGFOD1 (2-Oxoglutarate And Iron Dependent Oxygenase Domain Containing 1) (Singleton et al., 2014). La déplétion de OGFOD1 inhibe la prolifération dans plusieurs lignées cellulaires humaines et peut induire la formation de granules de stress et l'arrêt de la traduction (Loenarz et al., 2014). Chez la Drosophile, l'orthologue de OGFOD1 (Sudestada1 ou Sud1) est capable tout comme chez l'humain d'hydroxyler le résidus proline 62 de la RPS23. Il a été montré que la perte de Sudestada1 entraine de forts défauts de croissance chez la Drosophile, tout comme la perte de OGFOD1 chez l'humain. Les défauts de croissance associés à la perte de Sud1 sont corrélés à un stress traductionnel, caractérisés par la phosphorylation de eIF2α, la formation de granules de stress, l'induction de la réponse UPR et la promotion de l'autophagie et de l'apoptose (Katz et al., 2014). Chez l'humain, OGFOD1 a été rapporté comme un composant majeur des granules de stress (Wehner et al., 2010). Ces résultats sur OGFOD1, ainsi que ceux sur les homologues humains et de levure, révèlent un rôle biochimiquement conservé, mais variable selon le contexte, pour Sud1/OGFOD1/Tpa1p dans la régulation de la croissance et des réponses au stress (Katz et al., 2014; Singleton et al., 2014; Wehner et al., 2010).De même, l'ubiquitination des RP a un impact sur l'activité ribosomale en réponse au stress. Durant le stress du RE induit par la tunicamycine chez la levure, les protéines ribosomiques RPS7, RPS10 et

RPS3 vont subir une ubiquitination. Cette modification conduit à la traduction de messagers impliqués dans la réponse au stress du RE (Matsuki et al., 2020).

2.2.3. L'hétérogénéité apportée par les RAP

Outre les protéines ribosomiques, de nombreuses autres protéines s'associant au ribosome peuvent être sources d'hétérogénéité, on les appelle les RAP (ribosome associated proteins). Elles sont comme leur nom l'indique des facteurs capables d'interagir avec la machinerie de traduction et pouvant conférer une spécificité de traduction accrue. En effet, au fil de l'évolution, le ribo-interactome a considérablement augmenté et cela va de pair avec la complexification et l'augmentation de la taille des ribosomes. Chez les eucaryotes supérieurs, des protubérances d'ARNr ont fait leur apparition, cela peut servir de plateforme pour des protéines. Par exemple, la protéine FRMP peut se lier directement au 80S. Elle est impliquée dans une pathologie du nom de syndrome de l'X fragile, qui est la forme la plus courante de retard mental héréditaire et il est causé par la perte de fonction de la protéine du retard mental de l'X fragile (FMRP, Fragile X mental retardation protein). FMRP est une protéine de liaison à l'ARN qui participe à la régulation de la traduction de plusieurs ARNm neuronaux. Cette dernière est capable, en se liant dans l'espace inter-sous-unitaire et en empêchant la liaison de l'ARNt, d'inhiber la traduction d'ARNm neuronaux (Chen et al., 2014). FMRP est relié au ribosome par l'intermédiaire de la protéine RPL5. Récemment, une étude visant à étudier le « ribo-interactome » a identifié une multitude de protéines aux rôles déjà établis dans divers processus biologiques, comme étant présente dans l'interactome ribosomique des cellules souches embryonnaires de souris (Simsek et al., 2017). Ces protéines ont été : des protéines du métabolisme aux enzymes modifiant l'ARN en passant par des protéines du cycle, mais aussi des facteurs d'initiation de la traduction, ainsi que les RBP qui ont des rôles connus dans la lecture des éléments *cis*-régulateurs des ARNm, le déroulement des structures des ARNm et/ou le contrôle de la stabilité des ARNm. Par exemple, le ribo-interactome contient l'ARN hélicase DDX1 (Dead-Box helicase protein 1) qui peut interagir avec la ligase d'ARNt de mammifère RTCB pour contrôler l'épissage cytoplasmique de l'ARNm Xbp1 (Jurkin et al., 2014). Le ribo-interactome des mammifères révèle des régulateurs de la traduction pour le moins inattendus et positionne le ribosome comme un centre dynamique d'interaction avec diverses protéines. Cela permettrait ainsi au ribosome de jouer un rôle régulateur dans la traduction de différentes fonctions cellulaires.

2.2.4. Rôle de la composition du ribosome dans la traduction IRES-dépendante

Dans de nombreuses études, il a été montré que l'hétérogénéité peut conférer aux ribosomes une spécificité de traduction. Ces ribosomes, alors appelés « ribosomes spécialisés » ont dans certains cas la capacité de traduire des sous-groupes de messagers avec des caractéristiques communes, comme la présence d'éléments IRES dans leur 5'UTR. Les protéines ribosomiques RPS25 et RPL10A par exemple, lorsqu'elles sont présentes au sein des ribosomes, sont capables de diriger la traduction de nombreux ARNm viraux et cellulaires possédant des IRES. RPS25 a été la première de la série à être identifiée comme un composant de la machinerie de traduction qui permet l'initiation de la traduction via les IRES alors qu'elle n'a que de très faibles effets sur la traduction globale et la fidélité de traduction. RSP25 affecte l'activité des IRES viraux et cellulaires, et ne constitue pas une protéine essentielle pour l'activité du ribosome. Elle est d'ailleurs retrouvée de façon sous-stochiometrique dans les mESC (Hertz et al., 2013; Landry et al., 2009; Shi et al., 2016, 2017). La protéine RPL10A est sous-stœchiométrique dans les cellules souches embryonnaires (Shi et al). Sans affecter la traduction globale, elle réduit considérablement la traduction de messagers à IRES. RPS19 et RPL11 qui sont associées à l'anémie du Diamond-Blackfan, régulent la traduction IRES-dépendante des ARNm Bag1 et Csde1 (Horos et al., 2012).

De plus, de nombreux RAP ont été définies comme étant des ITAF et participent à la régulation de la traduction IRES-dépendante (Godet et al., 2019). La protéine RACK1 qui est associée à la petite sous-unité du ribosome a été identifiée comme impliquée dans la traduction IRES des virus HCV et PV (LaFontaine et al., 2020; Majzoub et al., 2014). Elle est d'ailleurs maintenant considérée comme une protéine ribosomique à part entière.

2.3. Hétérogénéité des ARNr : rôle dans les processus rôle physiologiques et pathologiques

Étant au cœur de la fonction des ribosomes, les ARNr sont soumis à une énorme pression sélective. C'est pourquoi leur séquence et leurs structures secondaires et tertiaires sont extrêmement bien conservées. En revanche, les extrémités peuvent présenter quelques variations. Ces segments d'expansion se situent loin du cœur fonctionnel du ribosome, c'est pourquoi ils sont susceptibles

d'influencer subtilement la traduction. Des diversités de séquences au niveau des ARN matures ont été décrites. Cela implique soit l'expression régulée de gènes d'ADNr spécifiques, soit l'activation d'un clivage cryptique, soit des modifications chimiques différentielles. À de nombreux endroits, des voies de clivage alternatives peuvent survenir ; il existe des cas où des clivages qui se produisent normalement de manière concomitante sont découplés, conduisant à la production d'ARNr intermédiaire (production de 43S et 26S). Cela pourrait expliquer pourquoi, dans les cellules du cancer du sein humain, des niveaux élevés d'ARNr intermédiaires 43S s'accumulent et que cela s'accompagne d'une augmentation des méthylations des ARNr avec un impact sur la traduction IRES-dépendante de l'ARNm p53 avec une baisse de la fidélité de traduction (Belin et al., 2009). Chez l'homme et la levure, il existe deux formes d'ARNr 5.8S : un court et un plus long qui diffèrent en taille par une extension en 5' de 7 ou 8 nt générant des sous-populations hétérogènes de ribosomes (Lafontaine, 2015). Les ARNr humains contiennent de nombreuses variantes de séquences et leur nombre de copies varie d'un individu à un autre chez l'homme et la souris. L'expression d'allèles variant dans des tissus spécifiques peut donner naissance à des ribosomes hétérogènes qui contribuent à réguler l'expression des gènes. L'expression des allèles des ARNr qui sont présents dans les polysomes est régulée par les stimulus environnementaux. De plus il a été montré que ces ribosomes de composition alléliques variables en réponse au stress présentent une activité de traduction différente (Parks et al., 2019, 2018).

Ceci dit, les modifications des ARNr générées par les snoARN apparaissent comme la source majeure d'hétérogénéité des ribosomes et il est désormais clair que toutes les positions ne sont pas entièrement modifiées à tout moment. Pourtant, pendant très longtemps, le dogme a soutenu que les modifications des ARNr étaient toujours effectuées de la même manière, jouant ainsi un rôle crucial dans la stabilisation de la structure du ribosome, ce qui est essentiel pour son bon fonctionnement. Au contraire, des travaux récents indiquent que les ribosomes peuvent en fait afficher des compositions distinctes au niveau des modifications des ARNs (Erales et al., 2017, 2017; Krogh et al., 2016). Ces découvertes découlent des progrès dans les méthodes de détection des modifications chimiques des ARNr. Il existe désormais des preuves solides de l'existence de variations dans les modifications qui se produisent naturellement dans les organismes vivants, durant les processus physiologiques ou pathologiques. Ces changements peuvent entrainer une différence dans la spécificité de traduction du ribosome ce qui suggère que les modifications des ARNr peuvent jouer un rôle dans le contrôle de l'expression génique (Jaafar et al., 2021; Lafontaine, 2015; Sloan et al., 2016). Dans la partie qui va suivre, nous aborderons les deux types de modifications les plus représentés : les 2'-O-méthylations et les pseudouridylations, nous verrons pourquoi les chercheurs ont longtemps pensé que ces

modifications étaient toutes indispensables et comment aux fils des études et des découvertes les modifications des ARNr ont révélé leur capacité à réguler finement la fonction du ribosome et conduire à la formation de ribosomes spécialisés.

2.2.1. Les modifications des ARNr sont constitutives ?

Il a été démontré que l'ajout de 2'Ome se produit de façon co et post-transcriptionnelle et participe à la mise en forme précise de la structure de l'ARNr sur laquelle repose l'activité du ribosome (Wayne A Decatur and Fournier, 2002). Cette observation a poussé la communauté scientifique à considérer que l'ARNr 2'-Ome est nécessaire à la construction et au maintien de l'activité du ribosome. Ce dogme a été étayé par de nombreuses études qui utilisaient des méthodes de détection des modifications non quantitatives. Pour les 2'O-methylations par exemple, dans le modèle du Xenope ou des levures, les auteurs montrent avec ces méthodes que les ARNr sont méthylés à presque tous les sites des régions fonctionnellement importantes des ribosomes (Wayne A. Decatur and Fournier, 2002; Maden, 1980). De plus, la déplétion de la fibrillarine entraine une létalité chez la levure, le poisson zèbre et la souris, ce qui soutient l'hypothèse que la 2'-O-méthylation joue un rôle important très conservé (Newton et al., 2003; Schimmang et al., 1989). Ces données indiquaient clairement que les modifications étaient essentielles.

2.2.3. Les modifications des ARNr ne sont pas constitutives

Au cours des dernières années, la communauté scientifique a accumulé de nombreuses données qui remettent en question le dogme selon lequel toutes les modifications des ARNr seraient présentes de manière constitutive. Les chercheurs ont mis en évidence qu'une molécule d'ARN peut subsister même en l'absence de modifications chimiques à des positions précises. Un bon nombre de ces études portent sur les 2'O-méthylations, c'est pourquoi nous l'aborderons avec un intérêt tout particulier. Des études révèlent que certains sites de 2'-O-méthylation et de pseudouridylation peuvent être partiellement modifiés. Des modifications Ψ sous-stœchiométriques ont été trouvées par la suite dans l'ARNr humain et celui de *S. cerevisiae*, ce qui représente une source supplémentaire d'hétérogénéité de l'ARNr (Taoka et al., 2018, 2016). Chez la levure, sur les 112 sites de pseudouridylation connus, 18 sont modifiés sur moins de 85% des ribosomes (Taoka et al., 2016). De même, dans les cellules humaines, un tiers des sites partiellement méthylés (Krogh et al., 2016).

Beaucoup des sites méthylés chez l'homme se trouvent dans des régions fonctionnellement importantes du ribosome or ces mêmes régions, bien que très conservées, ne sont pas méthylées chez la bactérie. Cela indique que la méthylation de ces positions n'est pas essentielle pour la fonction du ribosome (Wayne A Decatur and Fournier, 2002). De la même façon que pour la structure du ribosome, la cartographie des positions 2'Ome s'est améliorée et précisée avec les progrès dans les méthodes de détection des modifications. Les approches de séquençage à haut débit et de spectrométrie de masse ont été appliquées à différentes lignées cellulaires pour cartographier et quantifier les 2'-O-méthylations dans les ARNr humains (D'Souza et al., 2018; Erales et al., 2017; Incarnato et al., 2017; Krogh et al., 2016; Sharma et al., 2017; Taoka et al., 2018; Zhu et al., 2017). Grâce à ces nouvelles méthodes, de nombreuses études ont rapportés que des variations de méthylation du 2′O-ribose de l'ARNr (2′Ome) se produisent de façon naturel dans de nombreux organismes. L'ARNr 2′Ome varie dans les lignées cellulaires humaines, mais aussi dans les organismes vivants (levure, plante, poisson zèbre, souris, homme) au cours du développement et des maladies. Ces variations de l'ARNr 2′Ome se produisent soit au sein d'une même lignée cellulaire, d'un même organe ou d'un même échantillon de patients (c'est-à-dire intra-variabilité), soit entre au moins deux conditions biologiques (c'est-à-dire inter-variabilité). Les variations des 2'-O-méthylations ont été rapportées chez la levure et dans les lignée de cellules humaines, dans une moindre mesure également dans les cellules de souris (Jaafar et al., 2021).

L'hétérogénéité des ARNr au sein des cellules humaines

La variabilité peut se produire au sein d'une même lignée de cellules, on appelle alors cela « l'intra-variabilité ». Les premières études montrant l'existence d'ARNr partiellement méthylés sont relativement récentes, puisque c'est en 2016 que grâce aux méthodes de séquençage, il a été démontré pour la première fois au sein d'une même lignée cellulaire humaine que tous les sites ne sont pas entièrement méthylés (Erales et al., 2017; Incarnato et al., 2017; Krogh et al., 2016). Les auteurs ont analysé les 2'-O-me de deux lignées cellulaires : les adénocarcinomes du col de l'utérus (HeLa) et les carcinomes colorectaux (HCT116). Ils ont observé grâce à la méthode de RiboMeth-seq qu'environ un tiers des 106 sites sont partiellement méthylés. Le RiboMeth-seq permet la comparaison de plusieurs échantillons en parallèle, ce qui a permis aux auteurs de comparer les méthylations position par position entre les deux lignées cellulaires. Les deux lignées ont révélé une méthylation similaire sur la plupart des sites. Cette étude constitue la première cartographie complète des sites 2′-O-Me dans l'ARNr humain en utilisant une approche de séquençage à haut débit (Krogh et al., 2016). Par

conséquent, l'existence de sites partiellement méthylés à des positions particulières implique un mélange de molécules entièrement méthylées et non méthylées dans la cellule au sein des ARNr humain. Cela implique que le pool de ribosomes est de composition hétérogène à l'intérieur ou entre les cellules et renforce la notion de ribosome spécialisé (Xue and Barna, 2012).

Par la suite, en 2018, les niveaux de modifications des ARNr ont aussi été analysés dans des lignées de lymphoblastes humains de rate TK6. Taoka et ses collègues ont analysé par une analyse par spectrométrie de masse 14 types de modifications sur 228 sites internes dans les TK6. Leurs résultats sont concordants avec les études antérieures, à quelques sites près qui varient (Carlile et al., 2014; Incarnato et al., 2017; Krogh et al., 2016). Comme pour les autres études, on retrouve des modifications de types 2'Ome et pseudouridylation dans les 3 ARNr 18S, 5.8S et 28S avec une distribution partielle sur certains sites.

Dans l'ensemble, ces études ont démontré que, comme dans la levure, la présence de 2'Ome et de pseudouridylations à toutes les positions l'ARNr n'est pas essentielle chez l'homme et que des sites sont modifiés de façon sous-stochiométrique au sein d'une même lignée. Cela signifie que les cellules supportent la production de ribosome qui ne sont pas entièrement méthylé ou pseudouridylé sur les ARNr.

L'hétérogénéité des ARNr dans le stress

De plus en plus d'éléments permettent de relier les variations de niveau de modifications des ARNr et le stress cellulaire. Par exemple, l'hypoxie induit de fortes variations dans le profil de 2'Ome de cellules provenant de tumeurs mammaires (Metge et al., 2020). Lors du stress hypoxique, la biogenèse des ribosomes est régulée à la hausse suite à une augmentation d'activité de l'ARN polI. De plus le profil du 2'-O-me varie fortement. Par ailleurs, le stress génotoxique induit par l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II utilisé dans le traitement de différents cancers, favorise lui aussi les modifications du 2'Ome (Burke et al., 2019). L'étoposide induit une augmentation des niveaux de SNORD68 et SNORD111B et ce qui fait augmenter le 2'Ome à 28S-Am2388 et 28S-Gm3923 dans les cellules HeLa. Le choc thermique altère quant à lui la pseudouridylation au site 50 dans le 5S chez la levure (Schwartz et al., 2014).

L'hétérogénéité des ARNr dans les contextes pathologiques

Depuis de nombreuses années maintenant, il devient de plus en plus clair que les variations des modifications des ARNr ont une incidence dans l'étiologie et dans la progression différentes pathologies.

La première preuve du lien entre la pseudouridylation de l'ARNr et la maladie humaine remonte à 1998, lorsque des mutations du gène de la dyskérine DKC1 (congenital dyskeratosis 1) codant pour la pseudouridine dyskérine synthase ont été identifiées chez des patients atteints de dyskératose congénitale liée à l'X (Heiss et al., 1998). La dyskératose congénitale par exemple est une maladie héréditaire caractérisée par des anomalies cutanéo-muqueuses, une fibrose pulmonaire et une prédisposition au cancer (Dokal, 2011). La lésion génétique la plus courante découverte dans les dyskératoses est dans le gène DKC1. La mutation DKC1 entraîne une réduction des pseudouridylations sur l'ARNr.

Des modifications des 2'-O-me a aussi été associées à la dyskératose congénitale. Elle peut être causée par une mutation de la protéine NPM1. La perte de NPM1 dans des cellules fibroblastiques embryonnaires provenant de souris Npm1-/- induit une baisse importante des 2'Omethylations (Nachmani et al., 2019). NPM1 est capable de se lier aux snoARN et également à la FBL afin de réguler l'action des complexes de méthylation. La perte de NPM1 (Nucleophosmin) conduit à une insuffisance médullaire et NPM1 est muté chez les patients atteints de dyskératose congénitale. De plus, il a été montré que chez les patients souffrant de leucémies myéloïdes aigues, une forme mutée de NPM1 cytoplasmique est présente. Chez ces patients, le profil de 2'-O-me est altéré aux mêmes positions que chez les patients atteints de dyskératose ont été retrouvées. Dans le syndrome de l'X fragile, la protéine de liaison à l'ARN FMRP est mutée. Il a été mis en évidence que la perte de cette protéine dans des cellules souches embryonnaires humaines induit une altération du profil de 2'Ome dans ces cellules à des sites spécifiques. FMRP interagit avec un petit pool de snoARN à boîte C/D dans le noyau, et régule la méthylation à des sites spécifiques indépendamment de la FBL. Cependant, à ce jour, les auteurs n'ont pas corrélé l'altération observée dans leur modèle avec une altération du profil de 2'-O-méthylation chez les patients atteints du syndrome (D'Souza et al., 2018)

Outre ces troubles héréditaires, les modifications des ARNr ont également été retrouvé dans de nombreux cancer. Des altérations de pseudourodylations ont été retrouvé dans un sous-ensemble. (Montanaro et al., 2008). Il a été montré qu'un faible niveau de dyskérine altère la traduction de l'ARNm p53 et abaisse en conséquence le niveau d'expression de ses cibles dans les cellules de cancer du sein humain et dans les cellules progénitrices épithéliales mammaires primaires (Montanaro et al., 2010). À cet égard, une expression très variable de la dyskérine a été observée dans divers types de

tumeurs humaines, notamment les carcinomes du sein, du poumon, de la prostate, du côlon, de la tête et du cou, et les carcinomes hépatocellulaires. En général, une faible expression de la dyskérine est associée à un comportement clinique favorable (Penzo and Montanaro, 2018). De plus, des variations de l'expression des snoARN H/ACA ont été observées dans de nombreux types de cancers (McMahon et al., 2015).

Enfin, il a été mis en évidence un lien étroit entre les modifications des ARNr et notamment les 2'Ome et de nombreux cancers. En effet, de nombreuses données suggèrent que les modifications de la méthylation de l'ARNr dans le ribosome humain jouent un rôle clé dans la régulation de la traduction, contribuant ainsi à la définition de phénotypes particuliers comme les caractéristiques des cellules tumorales (Erales et al., 2017; Genuth and Barna, 2018a; Marcel et al., 2013; Shi et al., 2017). Dans plusieurs modèles cancéreux, il a été signalé un lien entre les variations de 2'-O-methylation des ARNr et la modulation de la fidélité de traduction et de l'efficacité de traduction d'un sous-ensemble d'ARNm (D'Souza et al., 2018; Marcel et al., 2013). Les variations des niveaux d'ARNr 2'O-méthylés augmentent à certains sites spécifiques dans les cellules cancéreuses présentant une agressivité accrue (Belin et al., 2009). La technologie RiboMethSeq (RMS) a permis la première évaluation de la diversité complète de la 2'-O-methylation des ARNr dans des échantillons de cancers humains. Des variations de 2'-O-méthylations dans les ARNr de cellules de patients atteints de lymphomes diffus à grande cellule (DLBCL) ont également été démontrées (Krogh et al., 2020). Les lignées cellulaires DLBCL sont hypométhylées à des sites distincts dans l'ARNr. Une autre étude a montré l'étendue des variations du profil de 2'Ométhylation globale des ARNr dans des lignées de cancers du sein ((Marcel et al., 2020a)). Une étude antérieure avaient déjà démontré que dans des tumeurs de cellules épithéliales mammaires, l'inactivation de la protéine p53 est associée à un niveau accru de FBL et de ce fait de 2'-O-méthylations avec une traduction plus importante de certains messagers à IRES codant des gènes de contrôle comme cMYC, IGF1R ainsi que plusieurs facteurs de croissance angiogéniques (Marcel et al., 2013). En utilisant le RiboMethseq également, l'équipe de J.J. Diaz a établi le premier paysage de 2′-O-méthylation d'ARNr dans 195 tumeurs primaires du sein humain. L'analyse a porté sur les 106 sites de méthylation identifiés. Les données observées corroborent les données précédemment observées dans d'autres types cellulaires, à savoir que dans un seul échantillon humain un mélange de molécules d'ARNr méthylées de manière différentielle est présent, avec des sites toujours méthylés ou d'autres qui existent méthylés ou non. La comparaison entre les tumeurs et les tissus sains montre des variations du profil. De façon intéressante, cette étude a également permis de distinguer 4 groupes de tumeurs qui présentaient des caractéristiques biologiques/cliniques associées à un profil de méthylation

similaire. Ainsi, la signature 2'Ome des ARNr peut servir de marqueur afin de récapituler des caractéristiques des tumeurs.

Impact de l'hétérogénéité des ARN ribosomique sur la traduction IRES-dépendante

A ce jour, plusieurs études mettent en lumière le rôle des modifications des ARNr dans le contrôle de la traduction IRES-dépendante. En 2006, une étude a révélé que l'inactivation fonctionnelle de DKC1 modifie la traduction, quantitativement et qualitativement. En effet, dans des cellules dérivées de souris dépourvues de DKC1 ou de patients X-DC porteurs d'une mutation DKC1, la traduction des ARNm contenant des éléments IRES, y compris ceux codant pour le suppresseur de tumeur p27 et les facteurs anti-apoptotiques Bcl-xL et X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), est altérée (Yoon et al., 2006). Plusieurs autres travaux ont ensuite étayé l'idée que l'inactivation de DKC1, et donc les défauts de pseudouridylation de l'ARNr, sont cruciaux pour le contrôle de la traduction IRES-dépendante (Bellodi et al., 2010a, p. 27, 2010b; Rocchi et al., 2013). De plus, par le biais d'une purification de ribosomes dépourvus de dyskérine, l'équipe de Penzo et al a montré en 2015 que les altération de la traduction sont bien dues à la fonction ribosomique (Penzo et al., 2015). Ces observations, qui soulignent les effets de la réduction des pseudouridylations de l'ARNr sur le contrôle de la traduction, peuvent contribuer à expliquer à la fois le défaut de prolifération des tissus et la susceptibilité au cancer typique du X-DC.

La perte des 2'-O-méthylations induite par la déplétion de la FBL entraîne une baisse de l'activité des IRES des ARNm des facteurs de croissance IGF1R, FGF1 et de l'IRES d'EMCV et du CrPV (Erales et al., 2017). La diminution des 2'-O-me induite par la perte de NPM1 abroge également la traduction IRES-dépendante de différents transcrits tel que XIAP et p27 ((Nachmani et al., 2019)). Dans les cellules p53 mutées, une élévation du niveau de FBL corrèle avec une élévation du niveau de méthylation 2'OMe et active la traduction par les IRES de cMYC et IGF1R (Marcel et al., 2013). De plus des test de traduction in vitro ont permis de démontrer que la modulation du niveau de 2'-O-me affecte directement la traduction d'ARNm contenant un IRES (Erales et al., 2017).

L'ensemble de ces observations suggère que la fonction du ribosome peut être influencée par divers schémas de modification de sa composition, mais le mécanisme par lequel ces modifications affectent le fonctionnement du ribosome n'est pas encore clairement établi. Il sera donc intéressant de regarder si des sous-populations de ribosomes différemment modifiés remplissent des fonctions spécifiques dans la cellule dans divers contextes.

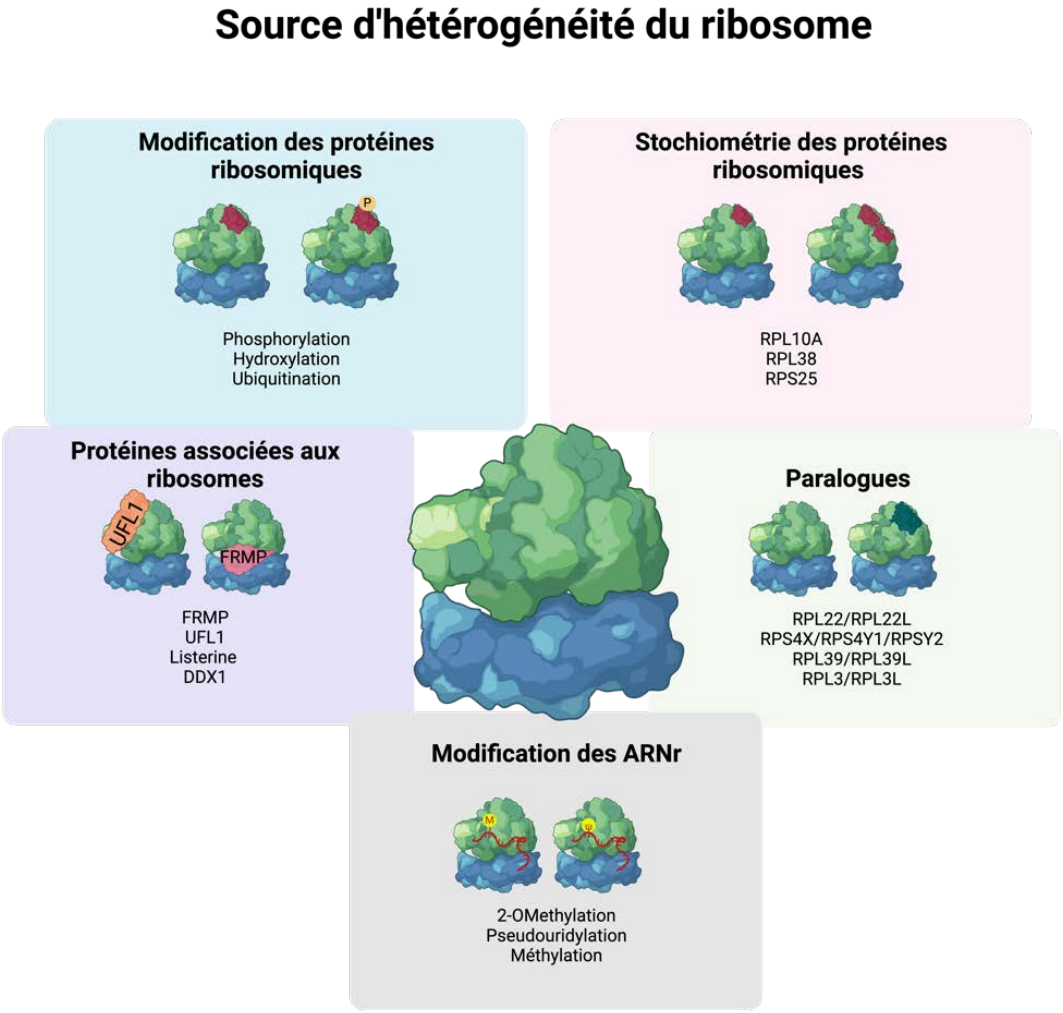


Figure 18 : **Hétérogénéité ribosomique**

Partie 4 : Les facteurs de croissance angiogéniques et lymphangiogéniques dans la réponse aux stress induits par les pathologies vasculaires

1. Les pathologies associées aux systèmes vasculaires sanguin et lymphatique

Le corps humain dispose de deux réseaux vasculaires distincts qui lui permettent d'assurer différentes fonctions essentielles à la vie : le système sanguin ainsi que le système lymphatique (Figure 19). Le système sanguin permet le transport de l'oxygène et des nutriments, l'élimination des déchets métaboliques produits par les cellules, le transport des hormones ainsi que le transport de cellules immunitaires. Le système lymphatique permet quant à lui le drainage des fluides interstitiels, la filtration et la surveillance immunitaire ainsi que l'absorption des lipides intestinaux. Les vaisseaux sanguins et lymphatiques croissent selon des processus biologiques appelés respectivement angiogenèse et lymphangiogenèse. Les vaisseaux sanguins et lymphatiques sont également au cœur de l'homéostasie de, leur malformation ou leur dysfonction entrainent de nombreuses pathologies. En fonction du contexte pathologique, ces vaisseaux peuvent être délétères ou salutaires (Karpanen and Alitalo, 2001). Une absence de perfusion par les vaisseaux sanguins provoque une ischémie dans les maladies cardiovasculaires tandis que dans le cas des tumeurs solides, la stimulation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse promeut la croissance et la dissémination des tumeurs solides (Cueni and Detmar, 2006). Une dysfonction des vaisseaux lymphatique conduit à la formation d'un lymphœdème. C'est pourquoi, le contrôle de la croissance des vaisseaux sanguins et lymphatiques est une cible thérapeutique privilégiée.

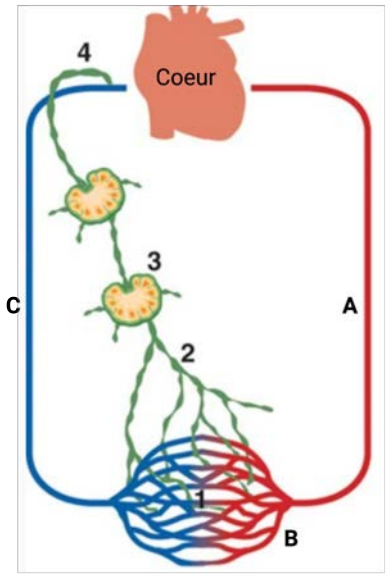


Figure 19 : Organisation schématique des systèmes vasculaires sanguins et lymphatiques Le réseau vasculaire lymphatique est organisé en capillaires (1) collecteurs (2), organes lymphoïdes secondaires (3) et tronc thoracique qui se jette dans la région sous-claviaire. Le réseau vasculaire sanguin est composé d'artères (A), de capillaires (B) et de veines (C). Les capillaires relient les veinules aux artérioles. (Adapté de K.Alitalo, 2015).

1.1. Les systèmes vasculaires et la formation de nouveaux vaisseaux

1.1.1. Vaisseaux sanguins et angiogenèse

La structure du réseau vasculaire est hiérarchisée et close, allant des artères de gros calibre (Aorte, artérioles) jusqu'aux capillaires sanguins. L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants, à la différence de la vasculogenèse qui est le processus par lequel se forme le réseau sanguin durant le développement (ces derniers vont émerger à partir de précurseurs cellulaires) (Swift and Weinstein, 2009). Chez l'adulte, la majorité des cellules endothéliales sont dans un état quiescente, l'angiogenèse ne s'observe que dans des états physiologiques, notamment chez la femme adulte dans les processus de reproduction (menstruation et grossesse) et dans la réparation tissulaire (Demir et al., 2010). L'altération des processus angiogéniques peut entrainer des anomalies de l'homéostasie vasculaire. L'angiogenèse apparaît au cours de la progression des tumeurs solides, en réponse à l'hypoxie, et elle est également stimulée dans les pathologies cardiovasculaires tel que l'ischémie cardiaque (Potente et al., 2011). L'angiogenèse fait intervenir plusieurs types de cellules endothéliales : Les « Tip Cell », les « stalk cell » et les « Phalanx-cell » (Blanco and Gerhardt, 2013; Potente et al., 2011). La première étape de l'angiogenèse est l'activation de la cellule endothéliale. Des signaux pro-angiogéniques (hypoxie, stress…) induisent l'activation et la sélection de la « tip-cell » ; une cellule aux propriétés migratoires et invasives

(dégradation de la matrice extracellulaire) en position leader qui va guider le bourgeon vasculaire. Si la tip-cell se caractérise par ses propriétés de migration, la stalk-cell va proliférer et permettre l'élongation du bourgeon vasculaire. La mise en place du flux sanguin permettra le retour à la quiescence des cellules endothéliales et l'émergence des Phalanx-cell.

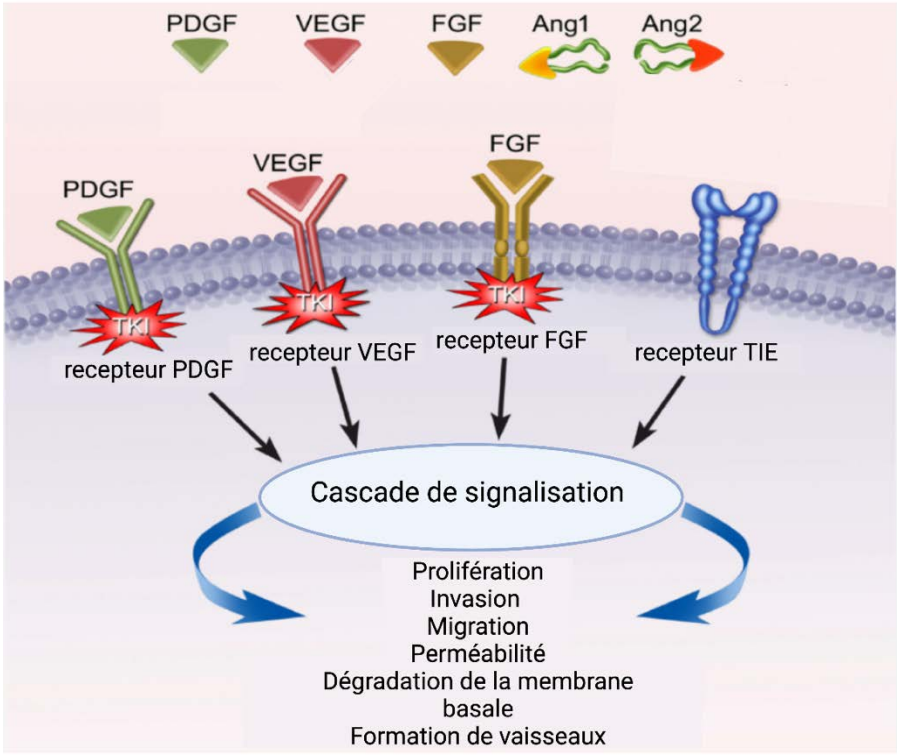


Figure 20 : **Voies angiogéniques.** Les différents ligands et leur récepteurs pouvant entraîner l'angiogenèse. Adapté de Davidsson, 2014.

Au niveau moléculaire, plusieurs facteurs pro-angiogéniques sont capable d'induire la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales (Figure 20). Les facteurs de la famille des VEGF (tels que le VEGFA) ainsi que des facteurs de la famille des FGF (tels que le FGF1 et le FGF2) sont impliqués dans la sélection de la tip-cell.

1.1.2. Vascularisation lymphatique et lymphangiogenèse

La fonction principale du système lymphatique est d'assurer le retour du liquide extravasé et des solutés de l'interstitium tissulaire vers la circulation sanguine afin de maintenir l'homéostasie des pressions interstitielles hydrostatiques et oncotiques et de reconstituer le volume de plasma sanguin. En effet, chez l'homme, la totalité du volume plasmatique quitte la circulation sanguine par ultrafiltration capillaire toutes les 9 heures environ. Ce liquide et les électrolytes associés sont renvoyés vers le système vasculaire sanguin essentiellement par recapture par les vaisseaux lymphatiques (Witte and Witte, 1987). Les vaisseaux lymphatiques de l'intestin assurent l'absorption et le transport des lipides alimentaires sous forme de chylomicrons. Enfin, le système lymphatique joue également un rôle important dans la défense immunitaire (Tewalt et al., 2012). En effet, les vaisseaux lymphatiques régulent activement la recapture des cellules immunitaires infiltrant les tissus et patrouillant dans les différents organes, incluant les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et macrophages) et les lymphocytes. Ceux-ci sont hébergés dans les vaisseaux lymphatiques pour un transport ultérieur vers les ganglions lymphatiques drainant afin d'initier les réponses immunitaires. Contrairement au système sanguin, le système lymphatique est unidirectionnel. Les vaisseaux lymphatiques sont présents chez tous les vertébrés et sont constitués de capillaires lymphatiques, de pré-collecteurs, de vaisseaux collecteurs et de nœuds lymphatiques (Aspelund et al., 2016). Les vaisseaux lymphatiques se retrouvent dans tous les tissus vascularisés à l'exception de la moelle osseuse, la rétine et le cartilage. Jusqu'à récemment on pensait le cerveau dépourvus de ce réseaux vasculaire mais récemment, une étude a mis en lumière sa présence dans les méninges (Louveau et al., 2015). La lymphangiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques. Au cours du développement, les vaisseaux lymphatiques apparaissent à la suite de la transdifférenciation des cellules endothéliales de la veine cardinale antérieur (Mäkinen et al., 2007). Chez l'adulte, la lymphangiogenèse se produit à partir du bourgeonnement de vaisseaux préexistants. À l'exception du canal de Schlemm dans les yeux, des vaisseaux lymphatiques méningés et des vaisseaux lymphatiques (lactés) de l'intestin, la majorité du réseau lymphatique est générée au cours du développement embryonnaire. Cependant, ces vaisseaux subissent des changements dynamiques chez l'adulte. En conditions physiologiques, la lymphangiogenèse survient au cours du développement du corps jaune ainsi que pendant le processus de cicatrisation (Alitalo et al., 2005; Otsuki et al., 1986). Les vaisseaux lymphatiques sont également associés à de nombreux processus pathologiques tels que la dissémination métastatique, l'inflammation ainsi que le lymphœdème. (Tammela and Alitalo, 2010).

Les fonctions des cellules endothéliales lymphatiques sont majoritairement régies par l'activation de la voie du récepteur à activité tyrosine kinase : le VEGFR3 (vascular endothelial growth factor receptor 3).

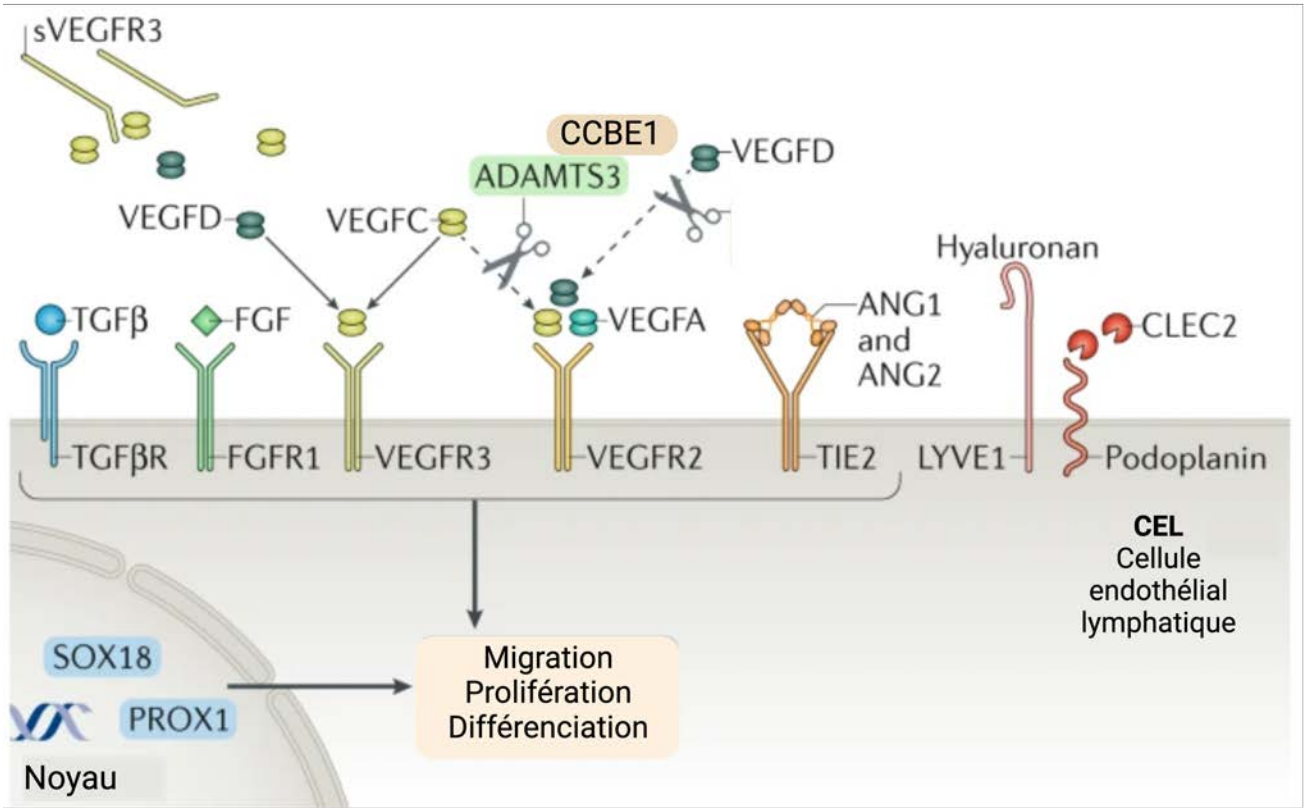


Figure 22 : Régulation moléculaire de la lymphangiogenèse. Les cellules endothéliales lymphatiques (CEL) expriment sélectivement le VEGFR3 (vascular endothelial growth factor 3), qui est activé par le VEGFC et le VEGFD, conduisant à une stimulation de la migration cellulaire, de la prolifération et du développement lymphatique. La spécificité et l'affinité des récepteurs du VEGFC et du VEGFD sont régulées par des protéases extracellulaires : une désintégrine, une métalloprotéinase à motifs thrombospondine 3 (ADAMTS3) ainsi que le Collagen and calcium-binding EGF domain-containing protein 1 (CCBE1) et des sérine protéases encore non caractérisées. Ces protéases clivent les proprotéines des VEGF pour générer des formes pleinement matures qui peuvent également activer VEGFR2, exprimé à la fois par les cellules endothéliales vasculaires sanguines et par les CEL. D'autres marqueurs des CEL comprennent la podoplanine (glycoprotéine membranaire) et LYVE1 (l'analogue de CD44 : le récepteur 1 de l'acide hyaluronique). La podoplanine se lie au récepteur 2 CLEC2 (de type lectine de type C dérivé des plaquettes) et empêche le sang de pénétrer dans le système lymphatique. LYVE1 régule le trafic des cellules immunitaires vers les vaisseaux lymphatiques. Les CEL expriment également de nombreux autres récepteurs, notamment le FGFR1 (récepteur 1 du facteur de croissance des fibroblastes) ; le récepteur tyrosine-protéine kinase TIE2, qui lie l'angiopoïétine (ANG) ; et le récepteur du TGFβ (facteur de croissance transformant β)(Adapté de Brakenhielm et al, 2019).

Au nniveau moléculaire, l'axe VEGFC/VEGFD/VEGFR3 est la voie qui prédomine. Le VEGFC est essentiel pour le bourgeonnement des cellules endothéliales lymphatiques (CEL) à partir des veines

embryonnaires qui sont engagées dans la lignée lymphatique. Les principaux moteurs de la migration, de la prolifération et de la différenciation des CEL sont les VEGFC et VEGFD, membres de la famille des VEGF, qui se lient et activent le récepteur 3 du VEGF (VEGFR3). Il est exprimé sélectivement par les CEL. Les formes matures de ces facteurs peuvent également activer VEGFR2 exprimé par les cellules endothéliales vasculaires sanguines, les CEL et quelques autres types de cellules. Parmi les facteurs de transcription spécifiques du vaisseau lymphatique, la protéine PROX1 (prospero homeobox 1) est devenue le principal facteur de transcription responsable de l'induction et du maintien de l'identité des CEL. Le KO de VEGFC est létal pour les souris pendant le développement embryonnaire entre E12.5 et E14.5, de même que celui pour VEGFR3 qui induit une létalité à E9.5. Enfin le KO de VEGFD conduit à la formation d'œdème. Les souris hétérozygotes mutantes VEGFC+/- présentent des défauts de fonction lymphatique et le développent d'un lymphœdème (Karkkainen et al., 2004). Il en va de de même lors de l'inhibition de la voie VEGFR3 (Mäkinen et al., 2001). L'activation de VEGFR3 induite par VEGFC conduit à la phosphorylation des sérine kinases AKT et ERK, ce qui favorise la prolifération, la migration et la survie des LEC. Il a été montré que l'activation VEGFA/VEGFR2 est impliquée dans la maturation des vaisseaux lymphatiques mais très peu dans leur bourgeonnement. Le VEGFA recrute aussi des macrophages producteurs de VEGFC/D sur les sites de son expression (Wirzenius et al., 2007). Les régulateurs de la lymphangiogenèse comprennent aussi les FGF, le HGF (hepatocyte growth factor), le PDGF (Platelet-derived growth factors), et les IGF (Insuline growth factor). Les facteurs FGF1 et FGF2 ont été identifiés comme pouvant promouvoir la migration et la survie des cellules endothéliales lymphatiques (J. Li et al., 2017; Shin et al., 2006; Zheng et al., 2014).

1.2. Pathologies associées aux dysfonctions vasculaires

Les systèmes vasculaires sanguin et lymphatique sont impliqués dans de grands processus physiologiques mais également dans de nombreuses pathologies. En effet ces vaisseaux jouent un rôle primordial dans la pathogenèse du cancer, l'induction d'angiogenèse et de la lymphangiogenèse est nécessaire à la progression tumorale et associée à un mauvais pronostic (Muz et al., 2015). Toutefois, au cours de l'ischémie cardiaque ces processus sont nécessaires à la revascularisation et la résolution de l'inflammation de la zone lésée (Js et al., 2013).

Enfin, il existe des dysfonctions du système vasculaire lymphatique qui entraîne l'apparition du lymphoedème, un œdème caractérisé par une forte accumulation de graisse et de liquide interstitiels dans un membre (Alitalo et al., 2005). Dans la partie qui va suivre, nous aborderons avec attention la

façon dont les processus d'angiogenèse et de lymphangiogenèse interviennent dans le cadre des cancers et de l'ischémie cardiaque.

1.2.1. Les cancers

Les cancers résultent d'une dérégulation de la prolifération cellulaire qui va entrainer une croissance incontrôlée des cellules conduisant à une dissémination de ces cellules à l'organisme. Dans la phase initiale de la progression maligne, une tumeur peut résider dans un état dormant dans une zone avasculaire où le taux de prolifération cellulaire est équilibré avec celui de l'apoptose cellulaire. Dans le tissu tumoral en prolifération et en expansion intensive, la demande en oxygène est dépassée par l'apport en oxygène, et la distance entre les cellules et le système vasculaire existant augmente, entravant la diffusion de l'oxygène et créant un milieu encore plus hypoxique. Cette hypoxie entraîne pour les cellules un besoin immédiat d'apport en nutriments et en oxygène et nécessite donc une augmentation de la vascularisation tumorale. De plus, cette hypoxie induit un microenvironnement tumoral hostile pour la cellule cancéreuse, qui va donc déclencher des mécanismes lui permettant d'induire la dissémination métastatique au travers une adaptation au stress tumorale.

Angiogenèse associée au cancer

Les cellules malignes ont besoin d'oxygène et de nutriments pour survivre et proliférer, elles doivent donc résider à proximité des vaisseaux sanguins afin de pouvoir accéder au système circulatoire sanguin (en effet, l'oxygène ne peut diffuser que sur de très courtes distances de l'ordre de 10-15 micromètres). Le déclenchement d'une angiogenèse est donc indispensable à la progression tumorale (Lugano et al., 2020). À ce jour, de nombreux inducteurs de l'angiogenèse tumorale ont été identifiés, notamment les membres de la famille VEGF, les angiopoïétines, le TGF-β, le PDGF, le TNF-α, les interleukines, les chimiokines et les membres de la famille des FGF. Une des réponses majeures de l'hypoxie est déclenchée par la surexpression des sous-unités HIF-1α et HIF-2α et de leurs cibles en aval, ce qui stimule la formation de vaisseaux sanguins, l'agressivité de la tumeur, les métastases et la résistance au traitement. En effet, les tumeurs contiennent des niveaux élevés du facteur de transcription HIF (décrit plus haut dans le manuscrit), ce qui corrèle avec une plus faible chance de survie pour les patients (Semenza, 2003). L'hypoxie tumorale va donc stimuler l'expression des facteurs pro-angiogénique à travers HIF : VEGFA, ANGPT2... HIF n'est pas le seul facteur à réguler l'angiogenèse tumorale, cette dernière répond aussi à la stimulation de la voie mTOR ainsi que de la voie UPR. La voie UPR, activée dans les tumeurs, peut également induire l'expression de facteurs pro-

angiogéniques (Izadpanah et al., 2023). En effet, ATF4, ATF6 ou XBP1, se lient au promoteur du VEGFA et induisent son expression. Les facteurs angiogéniques FGF2, FGF1, VEGFC sont également induits en réponse à l'hypoxie tumorale de manière indépendante de HIF (Conte et al., 2008b; Morfoisse et al., 2014b). Il est à noter que les vaisseaux sanguins qui se forment dans les tumeurs présentent des anomalies. Ces derniers présentent une forte perméabilité, une dilatation, ainsi qu'une organisation très anarchique accompagnées d'un flux aberrant. La perméabilité des vaisseaux induit une forte pression interstitielle ainsi qu'à la formation d'œdèmes et d'inflammation. La dissémination est fortement favorisée du fait de la perméabilité accrue des vaisseaux (Azzi et al., 2013). Cette angiogenèse « défectueuse » va aggraver le phénotype hypoxique et maintenir la réponse hypoxique au sein de la tumeur et limiter l'action des thérapeutiques anti-angiogéniques. Dans certains cas, des processus non-angiogéniques tels que la co-option ou le mimétisme vasculaire sont mis en place par la cellule tumorale afin de détourner la vascularisation pré-existante d'un tissus sain environnant. La co-option consiste en l'intégration de cellules tumorales à un vaisseau préexistant et à le détourner alors que le mimétisme vasculaire correspond à la transdifférenciation de cellules tumorales en cellules endothéliales afin de créer un réseau tubulaire semblable à des vaisseaux (Eelen et al., 2020).

Lymphangiogenèse associée au cancer

La lymphangiogenèse joue également un rôle important dans les tumeurs. Les vaisseaux lymphatiques sont caractérisés par une grande perméabilité, ce qui favorise la dissémination métastatique des cellules tumorales (Alitalo et al., 2005; Vaahtomeri et al., 2017). Les études montrent la corrélation entre l'expression des facteurs lymphangiogéniques et un plus faible taux de survie des patients (Stacker et al., 2004; Zeng et al., 2005). La présence de métastases dans les ganglions est un facteur pronostique dans de nombreux types de cancers (Morfoisse et al., 2015). A partir du ganglion sentinelle (le premier ayant subi l'invasion), les autres ganglions de la chaîne peuvent être envahis ainsi que d'autres organes irrigués par la chaîne lymphatique. Les études montrent une corrélation positive entre l'expression de VEGFC ou VEGFD et l'invasion des cellules tumorales (Alitalo et al., 2005; Morfoisse et al., 2014a; Mumprecht and Detmar, 2009). La lymphangiogenèse tumorale donne lieu à des vaisseaux de type anarchique et d'une extrême perméabilité, ce qui favorise l'invasion. Il a été démontré que l'hypoxie régule non seulement l'angiogenèse mais aussi la lymphangiogenèse en favorisant la surexpression du facteur lymphangiogénique (VEGF-C) et de facteurs de croissance communs à la vascularisation et à la lymphatique (VEGF-A, FGF2) (Morfoisse et al., 2015). De plus, les CEL sont elles-mêmes soumises à un environnement hypoxique favorisant la lymphangiogenèse.

1.2.2. L'ischémie cardiaque

L'ischémie myocardique est généralement une conséquence de l'athérosclérose coronarienne dans 99% des cas et survient lorsque le flux sanguin coronarien est réduit par une obstruction physique d'un vaisseau coronaire. C'est une des formes de cardiomyopathie les plus développées dans les pays occidentaux (Heusch, 2016; Ziaeian and Fonarow, 2016). L'infarctus du myocarde est une lésion irréversible résultant d'une ischémie myocardique grave et prolongée et survient généralement à la suite d'une rupture ou de l'érosion d'une plaque d'athérosclérose induisant un embole pouvant occlure une artère coronaire. (Heusch, 2016). L'insuffisance cardiaque, qui se développe souvent chez les patients qui survivent à un infarctus du myocarde, est une pathologie qui entraine une morbidité élevée. La médiane de survie reste faible quel que soit l'âge des patients, le taux de mortalité à cinq ans étant d'approximativement 50%. L'altération de la fonction contractile associée à l'insuffisance cardiaque peut être attribuée, en partie, au déclin de la perfusion et au développement d'un remodelage cardiaque entraînant une fibrose myocardique. Lors de l'ischémie cardiaque on peut observer différentes phases : 1) Phase ischémique : L'ischémie entraîne une hypoxie pour les cellules se trouvant en aval de l'artère occluse, ces cellules en manque d'oxygène vont rapidement entrer en apoptose et se nécroser. 2) Phase inflammatoire : par la suite une phase inflammatoire se met en place, celle-ci a pour but d'éliminer les cellules nécrotiques ainsi que les déchets métaboliques au niveau de la zone lésée. Durant cette phase, les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes se concentrent et migrent dans le tissu nécrosé pour éliminer les cellules mortes. 3) Phase de remodelage et de régénération, associée à la migration et à la différenciation des myofibroblastes, et au dépôt de protéines de la matrice extracellulaire, conduisant finalement à la formation d'un tissu cicatriciel pour remplacer les cellules nécrosées. Au cours de cette dernière phase, la formation de nouveaux vaisseaux et/ou le remodelage de la vascularisation préexistante ont lieu, principalement sous le contrôle du programme proangiogénique local, de l'équilibre immuno-inflammatoire et des cellules progénitrices vasculaires circulantes/locales. Ces processus ont pour but de rétablir un réseau vasculaire fonctionnel dans les zones ischémiques afin de restaurer l'apport sanguin et éviter la nécrose du tissu (Js et al., 2013).

De plus, une augmentation du transport lymphatique dans le cœur ischémique permet de limiter l'œdème résultant de l'hyperperméabilité vasculaire (induite par l'ischémie) en drainant les déchets métaboliques et les déchets cellulaire au niveau de la lésion. En effet, le système cardiaque lymphatique joue un rôle crucial dans la physiologie du cœur, il permet de drainer les fluides

interstitiels vers les ganglions médiastinaux et permet de conserver une homéostasie des fluides dans le cœur afin d'éviter la formation d'un œdème (Garmy-Susini et al., 2017). Au cours de l'ischémie cardiaque, les vaisseaux lymphatiques sont altérés, rendant ainsi plus difficile le drainage des fluides et favorisant le développement d'un œdème et de la dysfonction myocardique. L'ischémie cardiaque conduit à la disparition des collecteurs lymphatiques dans la zone cicatricielle en raison du remodelage de la structure des vaisseaux pré-collecteurs et de l'augmentation du réseau capillaire dans la zone sous-épicardique. Le drainage lymphatique joue donc un rôle majeur dans l'infarctus du myocarde et une nécessité de développer des vaisseaux lymphatiques pour drainer l'œdème cardiaque s'installe, favorisant la lymphangiogenèse (Tatin et al., 2017). Une réponse lymphangiogénique se met en place, principalement due à une expression cardiaque accrue de VEGFC et de VEGFD. Cependant, la lymphangiogenèse post-ischémique est défectueuse et ne suffit pas à restaurer totalement l'inflammation de la zone lésée. Dans la phase chronique après un infarctus du myocarde, la dysfonction du système lymphatique entraîne une détérioration de la capacité de transport lymphatique cardiaque et l'établissement d'un œdème myocardique chronique.

Durant l'ischémie du myocarde, les cellules contractiles du cœur ou cardiomyocytes sont soumises à une variété de stress cellulaires tels que l'hypoxie ou le stress du RE (Js et al., 2013; Murphy and Steenbergen, 2008; S. Wang et al., 2018). Ces stress induisent des régulations au niveau de l'expression génique au niveau transcriptionnel et traductionnel entraînant l'induction d'une angiogenèse et d'une lymphangiogenèse afin de réalimenter le tissu en oxygène et de résorber l'inflammation induite. Ces changements d'expression génique permettent d'éviter la mort du tissu et le remodelage du cœur lésé.

L'angiogenèse et la lymphangiogenèse en réponse à l'ischémie cardiaque

L'hypoxie est une caractéristique commune au cancer et au cœur ischémique. Comme nous l'avons vu dans le cadre du cancer, l'hypoxie entraîne une stabilisation du facteur HIF et avec lui une transcription accrue de tous ses gènes cibles. Parmi eux on trouve le VEGFA, mais aussi d'autres facteurs comme le PDGF-β, l'angiopoïétine 2 ainsi que le récepteur VEGR1. L'hypoxie induit également l'expression de facteurs qui ne sont pas des cibles de HIF tels que les facteurs VEGFC et D ainsi que les FGF1 et 2 au niveau traductionnel cette fois- ci (Hantelys et al., 2019). Dans cette étude, mon équipe a montré dans un modèle de cardiomyocytes que tous ces facteurs sont induits en réponse

à l'hypoxie précoce par un mécanisme de traduction IRES-dépendant. Il a également été montré que le FGF2 est induit via son IRES dans un modèle murin d'ischémie cutanée (Conte et al., 2008a).

2. Les facteurs de croissances (lymph)angiogéniques et leur régulation par la traduction IRES-dépendante en réponse au stress

L'implication des processus d'angiogenèse et de lymphangiogenèse dans les nombreuses pathologies abordées ci-dessous ont poussé les chercheurs à étudier la manière dont ces facteurs sont régulés en réponse au stress généré par ces pathologies. Notre attention va se porter sur les facteurs de la famille des VEGF et des FGF.

2.1. Les facteurs de la famille des FGF, IRES et ITAF associés

Les FGF sont des mitogènes à très large spectre qui régulent un éventail de fonctions cellulaires, notamment la migration, la prolifération, la différenciation et la survie (Xie et al., 2020). FGF-1 et FGF-2 sont les plus exprimés de cette famille ils se lient à l'héparine et partageant, outre leur homologie de séquences codantes, la particularité d'être des facteurs majeurs de l'angiogenèse. La signalisation FGF/FGFR participe au développement de presque tous les organes tels que les poumons, le cœur, le système urinaire, le cerveau, le squelette, les muscles et la peau/appendices, ainsi qu'à l'angiogenèse et à la lymphangiogenèse (Xie et al., 2020). On ne dénombre pas moins de 22 membres dans les protéines de la famille des FGF ainsi que quatre récepteurs à activité tyrosine kinase qui leur sont couplés (FGFR 1-4)(Ronca et al., 2015; Xie et al., 2020). Les FGFR sont composés d'une région extracellulaire constituée de trois domaines de type Immunoglobuline-like (D1, D2 et D3), d'une région transmembranaire hydrophobe (D1, D2 et D3), et d'un domaine C-terminal cytoplasmique portant l'activité tyrosine kinase. Le site de liaison du ligand des FGF est situé dans les domaines de type Ig D2--D3 et le linker qui les relie. La liaison des FGF aux FGFR déclenche des changements conformationnels des FGFR, entraînant une dimérisation et une activation des tyrosine kinases cytosoliques. Ils agissent en se liant aux FGFR et en les activant avec les protéoglycanes héparine/héparane sulfate (HSPG) en tant que cofacteurs. Ils peuvent agir de manière paracrine ou autocrine. Ils peuvent aussi avoir une action intracrine indépendante du FGFR (Van den bergue

L…Prats H Mol Endocrinol 2000, Martineau et al, MCB 2004). Les cellules endothéliales expriment différents FGF et FGFR. Le FGF1 et le FGF2 favorisent le processus d'angiogenèse, notamment dans le cancer mais également dans l'ischémie. Bien que majoritairement décrits en tant que facteurs pro-angiogéniques, le FGF1 et le FGF2 peuvent également promouvoir la lymphangiogenèse. Ils favorisent la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales lymphatiques en culture (Shin et al., 2006). Les FGF sont capables d'induire l'angiogenèse cardiaque (Stegmann, 1999). Le FGF2 mais aussi dans une moindre mesure les FGF1, 9 et 21 jouent un rôle important dans la réparation cardiaque après un infarctus du myocarde. Ils sont exprimés, entre autre, par les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques, et exercent un rôle paracrine dans le cœur (Khosravi et al., 2021). Les facteurs FGF1 et FGF2 sont induits principalement au niveau traductionnel par les cardiomyocytes en réponse à l'hypoxie dans le cadre de l'ischémie cardiaque (Hantelys et al., 2019). Les FGF, parmi lesquels les FGF1 et 2, jouent également un rôle important dans de multiples cancers, où ils stimulent l'angiogenèse (Korc and Friesel, 2009; Kwabi-Addo et al., 2004).

Dans la partie qui va suivre, nous nous concentrerons sur les IRES et les ITAF permettant la traduction des ARNm des facteurs de croissance FGF1 et FGF2.

2.1.1. FGF1

Le gène du FGF1 possède 4 promoteurs et peut donc générer 4 transcrits différents (A-D). La région 5'UTR est la seule qui varie, ce qui fait que malgré la variété de transcrits, on ne retrouve qu'une seule isoforme de 17kDa (Madiai et al., 1999). Chaque promoteur est couplé à son exon non traduit en 5 ', et génère un épissage alternatif donnant naissance à quatre ARNm avec des UTR distincts, contenant respectivement les exons 1A, 1B, 1C et 1D. Les transcrits A et B ont une expression tissu-spécifique alors que les transcrits C et D sont inductibles (Chotani and Chiu, 1997; Madiai et al., 1999; Myers et al., 1995, 1993). Les transcrits 1A et 1B sont spécifiques au maintien et à la survie des cellules, en particulier des cellules cardiaques et neuronales, tandis que les transcrits 1C et 1D ne sont exprimés que dans des conditions spécifiques, telles que le sérum, l'ester de phorbol ou la stimulation hormonale. Les 5'UTR des différents transcrits mesurent respectivement 432, 147, 149 et 92 nt. Au niveau traductionnel, notre équipe a montré que deux des quatre transcrits (A et C) possèdent un IRES dans leur 5'UTR (Martineau et al., 2004). L'activité des IRES n'est pas la même en culture ou in vivo. En effet, alors que les deux IRES sont fortement actifs *in vitro*, seul l'IRES A possède une forte activité in vivo durant la différenciation des myoblastes et la régénération musculaire. (Conte et al., 2009).

L'IRES A se situe en position 269 à 387 du 5'UTR. L'IRES A humain est très actif dans le muscle de la souris *in vivo*. L'IRES A minimal est compris entre le nucléotides (nt) 269 et 387, alors que la partie indispensable pour son fonctionnement est comprise entre les nt 269 et 303 (Martineau et al., 2004). Les régions qui encadrent l'IRES participent à rehausser son activité. Les leaders murins et humains des ARNm du FGF1 partagent une activité IRES similaire et la séquence de l'IRES est conservée à 70% entre l'homme et la souris. Le FGF1 est induit de manière IRES-dépendante dans de nombreux types de stress, notamment durant la différenciation des myoblastes et durant l'hypoxie précoce dans les cardiomyocytes (Ainaoui et al., 2015; Conte et al., 2009 ; Hantelys et al., 2019). Durant la différenciation des myoblastes, pendant que la traduction globale est inhibée, le FGF1 est induit à la fois de manière transcriptionnelle et traductionnelle ; le promoteur A du FGF1 est activé et l'IRES de ce transcrit également. L'activation de l'IRES dépend d'un élément *cis* se trouvant dans le promoteur A, ce qui indique un couplage transcription-traduction durant la myogenèse. Plus tard, notre équipe a montré que les protéines $p54^{nrb}$ et hnRNPM (composants du paraspeckle) sont des ITAF de l'IRES A du FGF1 et que leur fixation préalable au promoteur est requise pour induire l'activité de l'IRES (Ainaoui et al., 2015). Ces facteurs ont donc la capacité d'induire à la fois la transcription et de favoriser la traduction de l'ARNm FGF1 dans un contexte où la traduction cooiffe-dépendante est bloquée. La vasohibine a également été identifiée comme un ITAF de l'IRES du FGF1 dans des cardiomyocytes en hypoxie (Hantelys et al., 2019). Plus récemment, des données en cours de publication par mon équipe identifient une protéine ribosomique mitochondriale, la MRPS15, comme facteur régulateur de l'activité de l'IRES FGF1 en réponse au stress du RE dans les cardiomyocytes (David et al, en préparation). En effet, cette dernière se trouve plus associée au ribosome en réponse au stress et favorise la traduction de l'ARNm du facteur de croissance. Cette démonstration que des ribosomes de composition distincte peuvent spécifier la traduction de l'ARNm FGF1 conforte l'hypothèse des ribosomes spécialisés précédemment abordée.

2.1.2. FGF2

Le FGF2 existe sous 5 isoformes produites à partir de cinq codons d'initiation alternatifs (Arnaud et al., 1999; Florkiewicz and Sommer, 1989; Prats et al., 1989). Plusieurs transcrits de FGF2 ont été retrouvés, issus de 7 sites alternatifs de polyadénylation. L'expression de ces différents transcrits varie grandement de par la présence d'un élément déstabilisateur ainsi qu'un activateur de traduction, présent on non dans leur 3'UTR, selon le site de polyadénylation utilisé. L'activateur traductionnel améliore non seulement la traduction globale de l'ARNm FGF2, mais régule également sélectivement

la synthèse des isoformes du FGF2 (Touriol et al., 2000, 1999). Le FGF2 représente un produit protéolytique de la forme primaire de 18 kDa, il est appelé FGF2 LMW (Low Molecular Weight). Des formes plus grandes de FGF2 (22, 22,5,24 kDa et 34KDa) ont également été identifiées et appelées FGF2 HMW (Hight Molecular Weight), résultant de sites alternatifs d'initiation de la traduction CUG (Prats et al, 1989). Le leader de l'ARNm du FGF2 est long, mesurant 485 nt chez l'homme. L'analyse de cette séquence a révélé 4 codons d'initiation CUG potentiels (positions 86, 320, 347 et 362 nt de l'extrémité 5') dans le cadre du cadre de lecture ouvert (ORF) initié par AUG (positionné à 485 nt de l'extrémité 5'. Il a été démontré que ces codons d'initiation CUG donnent naissance aux isoformes HMW. La région 5'UTR (en fait alternativement traduite) de l'ARNm FGF2 est très structurée et présente des éléments de régulation *cis* lui permettant une régulation de sa traduction à travers le mécanisme d'utilisation de codons alternatifs (Prats et al, MCB 1992). En effet, la traduction du FGF2 LMW est initiée au niveau d'un AUG selon un mécanisme cap-dépendant et les trois autres formes utilisent la traduction IRES-dépendante pour initier la traduction à trois des CUG alternatifs (Vagner et al., 1995, Arnaud et al, MCB 1999). La dernière isoforme découverte de 34 KDa est produite à partir d'un CUG mais selon un mécanisme coiffe-dépendant. Les formes synthétisées à partir des codons CUG sont nucléaires tandis que la petite isoforme synthétisées à partir du codon AUG est cytosolique car dépourvue de séquence de localisation nucléaire (Bugler et al., 1991). L'IRES du FGF2 se situe en amont du premier CUG en position 154 à 319 à partir du 5'. L'expression des différentes isoformes du FGF2 diffère d'une part au niveau de leur localisation et d'autre part dans les fonctions qu'elles exercent (Bugler et al MCB 1991). Notre équipe a montré à l'aide de systèmes rapporteurs que l'IRES du FGF2 est actif dans de nombreuses cellules mais in vivo, l'expression chez l'embryon est plus élevée dans le cerveau et le cœur (Creancier et al, MCB 2000). Chez l'adulte en revanche, il semble que l'activité de l'IRES du FGF2 soit très élevée particulièrement dans le cerveau. Le FGF-2 joue un rôle clé dans le développement, le remodelage et les états pathologiques de presque tous les organes. L'une des activités les mieux caractérisées du FGF-2 est sa capacité à réguler la croissance et la fonction des cellules vasculaires telles que les cellules endothéliales et musculaires lisses (Nugent and Iozzo, 2000). La plus grande attention a été consacrée au plus petit variant de FGF2 de 18 kDa, libéré par les cellules et agissant par activation des tyrosine kinases des récepteurs du FGF à la surface des cellules. Les autres isoformes de FGF2 sont retenues dans le noyau et agissent de manière intracrine indépendamment des récepteurs FGF (FGFR). Le FGF2 est induit en réponse à l'ischémie et son IRES est activé (Conte et al., 2008a) ; de même, il est induit grâce à son IRES dans les cardiomyocytes soumis à l'hypoxie (Hantelys et al., 2019). Enfin, il a été mis en évidence que la protéine HNRNPA1 (composant du paraspeckle) régule l'activité de l'IRES du FGF2 (Bonnal et al., 2005).

2.2. Les facteurs de la famille des VEGF, IRES et ITAF associés

La famille des VEGF possède cinq membres chez les mammifères, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD et PlGF (Placental growth factor), qui jouent un rôle central dans la régulation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse (Karaman et al., 2018). Ces facteurs se lient avec une affinité différentielle aux récepteurs VEGFR1-2 et 3. Ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase qui se dimérisent au contact de leurs ligands. Cependant, les trois VEGFR (VEGFR-1, -2 et -3) ne sont pas répartis de manière égale sur les cellules endothéliales. Dans l'organisme adulte, l'expression de VEGFR-3 est largement limitée aux CEL, tandis que l'expression de VEGFR-1 est très faible sur les CEL et le VEGFR-2 peut être trouvé à la fois sur les CEL et cellules endothéliales vasculaires sanguines (BEC). Les VEGFR sont activés par dimérisation, obtenue grâce à la nature dimère des ligands du VEGF. Les deux épitopes de liaison au récepteur de chaque ligand du VEGF sont des épitopes composites et sont absents dans les espèces monomères du VEGF. Chaque VEGF peut être grossièrement classé comme étant angiogénique (VEGF-A, PlGF et VEGF-B) ou lymphangiogénique (VEGF-C et VEGF-D). Les VEGF angiogéniques se fixent sur le VEGFR1 et les VEGF lymphangiogéniques sur le VEGFR3, alors que le VEGFR2 peut être lié par les deux types de VEGF. Les VEGF, dont le VEGFA est le membre prototype, sont formés à partir de polypeptides antiparallèles capables de former un homodimère avec un nœud de cystine lié de manière covalente par deux liaisons disulfure (Karaman et al., 2018). Les récepteurs quant à eux, s'homodimérisent ou s'hétérodimérisent en présence de leur ligand, ce qui induit la phosphorylation de leur domaine kinase. La signalisation VEGFA dans les cellules endothéliales vasculaires sanguines est principalement gouvernée par l'activation de VEGFR2 (Simons et al., 2016). Dans ce contexte, VEGFA induit la prolifération, la migration et la survie endothéliales via l'activation de VEGFR2 et de ses voies de transduction de signal en aval. VEGFR3 est également exprimé dans les cellules endothéliales angiogéniques, où il est important pour la détermination de la tip-cell. VEGFC et VEGFD stimulent l'activation de VEGFR3, qui joue un rôle indispensable dans la lymphangiogenèse. Le VEGFA, en plus d'induire l'angiogenèse, peut également stimuler l'expansion des vaisseaux lymphatiques. Ces facteurs sont induits dans le cadre de différentes pathologies tel que le cancer afin de promouvoir l'angiogenèse et la lymphangiogenèse tumorale. Outre les cellules endothéliales, les VEGF et les récepteurs du VEGF sont exprimés dans des cellules non endothéliales, notamment certaines cellules tumorales. Le VEGFA sécrété par les cellules tumorales stimule la prolifération et la survie des cellules endothéliales, conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, ce qui favorise l'expansion de la tumeur

(Ferrara and Adamis, 2016). Les VEGF interviennent également dans les pathologies cardiovasculaires telles que l'ischémie cardiaque où les facteurs VEGF sont induits dans le but 1) de restaurer l'apport sanguin et 2) de résorber l'inflammation et limiter l'œdème (Garmy-Susini et al., 2017; Js et al., 2013). Enfin, la voie VEGF a également été associée au lymphœdème (Alitalo et al., 2005). Ces facteurs sont régulés au niveau transcriptionnel et traductionnel. Alors que VEGFA et PlGF sont majoritairement induits par HIF, le VEGFC et le VEGFD sont majoritairement régulés au niveau traductionnel par la présence d'un IRES dans leur 5'UTR (Morfoisse et al., 2016, 2014b; Hantelys eyt al, 2019).

2.2.1. VEGFA

Le VEGF-A, le facteur majeur de l'angiogenèse, se lie à deux récepteurs de la tyrosine kinase (TK), VEGFR-1 et VEGFR-2 et régule la prolifération, la migration et la perméabilité vasculaire des cellules endothéliales. Chez l'homme, le VEGFA possède une multitude de transcrits ainsi que d'isoformes qui sont générées par un épissage alternatif (dont quatre isoformes principales VEGFA $_{121}$, VEGFA $_{165}$, VEGFA $_{189}$ et VEGFA $_{206}$) et qui ont des affinités différentes pour les co-récepteurs de la neuropiline et les protéoglycanes HS à la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire sont produites ((Arcondéguy et al., 2013)). Le VEGFA peut également subir un clivage protéolytique. Au vu de son rôle d'une extrême importance en physiologie, l'expression du VEGFA est régulée à plusieurs niveaux : sur le plan transcriptionnel le VEGFA possède un élément de réponse au facteur HIF dans son promoteur, ce qui va induire sa transcription en réponse à l'hypoxie (Morfoisse et al., 2015). De ce fait il est exprimé dans différentes pathologies impliquant un stress hypoxique tel que les cancers ou l'ischémie. VEGFA est également régulé au niveau traductionnel, en effet il possède un 5'UTR très long et structuré qui contient deux IRES (A et B). l'IRES A : entre 745 et 846 nt de l'extrémité 5', l'IRES B : nt 91 à 483 (Huez et al., 1998). Un promoteur alternatif, ainsi que plusieurs codons CUG sont localisés entre les deux IRES de l'ARNm du VEGFA. Les codons CUG peuvent initier la traduction et donnent naissance à une isoforme de grande taille, le L-VEGF (Huez et al, 2001). L'IRES A (le plus en aval) contrôle la traduction à partir de l'AUG et l'IRES B aux codons CUG. Les IRES du VEGFA sont induits durant l'ischémie dans un modèle murin d'ischémie du membre inférieur et l'IRES B est également actif dans les cardiomyocytes soumis à une hypoxie précoce (Bornes et al., 2007; Hantelys et al., 2019). En ce qui concerne sa régulation, à ce jour deux ITAF ont été identifiés permettant de réguler l'activité de l'IRES du VEGFA : le facteur d'initiation de la traduction 4EBP1 et EIF4G1 (Godet et al., 2019).

2.2.2. VEGFC

Alors que les isoformes de VEGFA sont principalement formées par épissage alternatif, les différentes formes de VEGFC et VEGFD sont générées par maturation protéolytique. Le VEGFC est synthétisé sous forme de propeptide inactif de 58 kDa dans lequel le domaine d'homologie central du VEGF (VHD) est flanqué de propeptides N- et C-terminaux. Des proprotéines convertases telles que la furine, clivent entre le domaine d'homologie du VEGF et le domaine d'homologie en C-terminal, ce qui donne le pro-VEGF-C de 31 kDa. Le pro-VEGF-C est capable de se lier au VEGFR-3, mais ne l'active pas. Le second clivage protéolytique est réalisé par ADAMTS3 qui élimine les deux domaines terminaux, ce qui donne un VEGF-C mature et actif de 21 kDa capable de lier et d'activer son récepteur VEGFR3 mais également VEGFR2 (Jeltsch et al., 2014). L'élimination protéolytique des propeptides augmente l'affinité du VEGFC pour VEGFR3. Notre équipe a mis en évidence la présence d'un IRES dans le 5'UTR de l'ARNm du VEGFC (Morfoisse et al., 2014b). Cet IRES est activé dans les tumeurs hypoxiques de façon indépendante de HIF augmente la dissémination métastatique. Récemment, il a été mis en évidence qu'en hypoxie, les ribosomes qui se lient à l'IRES du VEGFC présentent un pattern spécifique de 2'O-méthylation des ARNr (Metge et al., 2020). Cela implique qu'en hypoxie, un pool spécifique de ribosomes est recruté par l'IRES du VEGF-C. De plus, dans cette même étude, l'interactome protéique du ribosome lié à l'IRES a été réalisé et la protéine ribosomique RPL6 a été retrouvée enrichie dans les ribosomes se liant à l'IRES en hypoxie. Cela renforce l'hypothèse que des ribosomes spécialisés dédiés à la traduction IRES-dépendante de l'ARNm du VEGFC en hypoxie.

2.2.3. VEGFD

VEGFD de même que VEGFC subit un clivage protéolytique. Les enzymes responsables ne sont pas encore connues. VEGFD se lie à l'homodimère VEGFR3 et à l'hétérodimère VEGFR3/VEGFR2 (Achen et al., 1998). Notre équipe a montré que l'ARNm du VEGFD possède un IRES dans sa séquence 5'UTR, qui est actif en réponse au stress thermique et également en réponse à l'hypoxie (Hantelys et al., 2019; Morfoisse et al., 2016). La nucléoline a été identifiée comme ITAF étant capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme afin de promouvoir l'activité de l'IRES du VEGFD en condition de choc thermique.

2.4. Thérapeutique basée sur la modulation des processus angiogéniques et lymphangiogéniques

Le contrôle des concentrations en facteurs de croissance dans les tissus ainsi que la durée de leur expression et de leur distribution sont importants pour une induction thérapeutique sûre de vaisseaux sanguins et lymphatiques stables et fonctionnels. Une récente étude réalisée par mon équipe a mis en évidence le rôle bénéfique combiné de plusieurs facteurs sur la récupération après un infarctus du myocarde, l'utilisation d'un lentivecteur tricistronique exprimant FGF2, apeline et Serca2 permet d'induire une angiogenèse et une cardioprotection dans un modèle d'ischémie chronique de souris (Renaud-Gabardos et al., 2018).

La plupart des études expérimentales sur la lymphangiogenèse thérapeutique se sont concentrées sur la délivrance du gène VEGFC ou de la protéine VEGFC qui stimule à la fois la lymphangiogenèse et l'angiogenèse dans sa forme mature (Goichberg, 2016). De manière prometteuse, il a été démontré que la thérapie génique *VEGFC*, administrée par des vecteurs adénoviraux ou AAV, réduit l'œdème et l'inflammation dans plusieurs modèles expérimentaux (Norrmén et al., 2011). Notre équipe a montré que l'utilisation de l'apeline pouvait normaliser les vaisseaux lymphatique après un infarctus du myocarde (Tatin et al., 2017).

La modulation thérapeutique de la lymphangiogenèse chez l'homme fait actuellement l'objet de plusieurs essais cliniques : alors que l'inhibition de la lymphangiogenèse tumorale s'avère prometteuse dans la prévention des maladies métastatiques, la stimulation de la lymphangiogenèse pourrait réduire l'œdème et limiter l'inflammation chronique (Norrmén et al., 2011). Les thérapies par facteurs de croissance utilisant le VEGF-C ou le VEGF-D ont donné des résultats prometteurs dans les modèles de lymphœdème.

Notre équipe a récemment mis en évidence les effets bénéfiques d'une thérapie combinée basée sur l'utilisation de vecteurs non intégratifs (LentiFlash®) contenant les ARNm codants pour l'apeline et le VEGFC dans le traitement du lymphoedème secondaire (Lamaa et al., 2023).

Les nombreuses pathologies associées aux dysfonctions des systèmes vasculaires sanguin et lymphatique sont des enjeux majeurs de santé publique. Les thérapies visant à cibler les processus angiogéniques et lymphangiogéniques sont des approches prometteuses cependant elles sont également associées à certains problèmes et préoccupations. La stimulation de ces voies peut favoriser la croissance des tumeurs, les tumeurs peuvent devenir résistantes aux thérapies au fil du temps, ces

thérapies peuvent provoquer de l'hypertension artérielle. C'est pourquoi il faut être prudent avec l'utilisation de ces thérapeutiques. Une compréhension fine de la façon dont les facteurs de croissance sont régulés en réponse au stress pourrait fournir des cibles pour une plus fine modulation de l'expression de ces facteurs.

Problématique et objectifs de la thèse

Au cours de cette introduction, nous avons exploré de nombreux aspects de la régulation des gènes en réponse au stress. Nous avons mis un accent particulier sur le rôle de la traduction IRES-dépendante dans des conditions de stress. Nous avons vu que la plupart des facteurs de croissance sont régulés au niveau traductionnel par un mécanisme IRES-dépendant en réponse à divers stimuli de stress et que ces régulations contribuent à l'apparition de phénotypes pathologiques ou au contraire à la restauration l'homéostasie.

Dans le cadre de l'ischémie du myocarde que nous avons abordée, nous avons pu voir que l'induction de certains de ces facteurs tels que les FGF et le VEGF contribuent à la restauration de l'apport sanguin ainsi qu'à la diminution de l'inflammation suite aux lésions induites par l'occlusion. En revanche, dans les pathologies cancéreuses, l'induction de ces facteurs favorise la progression tumorale et la dissémination métastatique. Nous avons constaté que ces facteurs sont induits au niveau traductionnel via leur site d'entrée interne des ribosomes en condition hypoxique, dans des cellules cardiaques et cancéreuses.

Notre objectif durant cette thèse a été de comprendre quels sont les facteurs qui régulent l'activité de ces IRES. La vasohibine a été identifiée comme ITAF, mais son impact modéré sur l'activité des IRES montre qu'elle n'est certainement pas le seul ITAF impliqué. De façon très intéressante, nous avons pu nous rendre compte que de nombreux ITAF identifiés à ce jour faisaient partie intégrante de corps nucléaires induits en réponse au stress hypoxique dans les cardiomyocytes : les paraspeckles. Ces corps nucléaires sont structurés autour d'un long ARN non codant du nom de NEAT1 et sont impliqués dans divers processus pathologiques tels que les cancers ou encore l'ischémie. NEAT1 est régulé à la hausse dans de nombreux types de cancer et n'est pas gage d'un bon pronostic pour les patients, tandis qu'il favorise la survie et la prolifération des cellules cardiaques dans un contexte ischémique. De façon encore plus intéressante, deux composants du paraspeckle, $p54^{nrb}$ et hnRNPM, ont été précédemment décrits comme régulant l'IRES du facteurs FGF1.

Le premier objectif de ma thèse, qui fera l'objet du chapitre 1, a donc été de comprendre le rôle de ces corps nucléaires et de son ARN structurant, NEAT1, dans la régulation de la traduction IRES-dépendante en réponse au stress hypoxique. Nous avons réalisé cette étude dans des cellules cardiaques afin de comprendre comment pouvait s'opérer la régulation dans un contexte ischémique

ainsi que dans des cellules de cancer mammaire, pour étudier les régulations de ces facteurs dans un contexte tumoral.

Dans un autre volet de mes travaux, nous nous sommes intéressés au nouveau concept de régulation qui a fait ses preuves depuis maintenant quelques années, celui du contrôle de la traduction par le ribosome lui-même, en réponse à au stress du réticulum endoplasmique et au stress génotoxique généré par la doxorubicine, utilisé en première en chimiothérapie anticancéreuse. Les traitements anticancéreux peuvent quant à eux engendrer une dysfonction lymphatique. Mon équipe a montré que la fonction lymphatique est altérée par plusieurs traitements anticancéreux, le tamoxifène, le paclitaxel et la doxorubicine. Le tamoxifène abolit l'effet protecteur des œstrogènes et le paclitaxel induit l'autophagie des cellules endothéliales lymphatiques (Zamora et al., 2019). Cependant, le mécanisme d'action de la doxorubicine demeure peu connu. Le stress génotoxique induit par les chimiothérapies anticancéreuses et notamment par la doxorubicine a un impact important sur l'expression génique. La doxorubicine est connue pour bloquer la biogenèse des ribosomes et engendrer une ubiquitination importante des protéines ribosomiques. Le stress du réticulum endoplasmique survient en dans différents contexte pathologiques tel que l'ischémie ou les tumeurs. Notre équipe et d'autres ont montré que le stress du réticulum endoplasmique pouvait réguler la traduction IRES-dépendante et notamment des facteurs de croissances. Ces observations nous ont poussés à nous intéresser au rôle de l'hétérogénétité ribosomique dans la régulation traductionnelle des facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques en réponse à ces deux stress : le stress du RE et le stress génotoxique. Nous avons choisi de faire cette étude dans les cellules endothéliales lymphatiques qui, bien qu'au cœur du processus de lymphangiogenèse, ne font l'objet que de peu d'études sur les régulations géniques auxquelles elles sont soumises, notamment lors du stress induit par l'environnement tumoral et les agents de chimiothérapie.

Le second objectif de ma thèse sera donc d'étudier la composition des ribosomes en réponse au stress du RE et au stress génotoxique par la doxorubucine dans la cellule endothéliale lymphatique humaine.

Le chapitre 2 de ma thèse portera donc sur l'étude de la composition protéique du ribosome en cours de traduction et des protéines qui lui sont associées lors du stress, avec l'identification de protéines candidates pouvant contrôler la traduction IRES-dépendante.

Le chapitre 3 portera sur une étude par RiboMeth-seq des variations de 2'O-méthylation des ARNr dans les ribosomes en cours de traduction en réponse à ces deux mêmes stress.

Résultats

Chapitre 1 : L'ARN non codant Neat1 et les composants du paraspeckle sont des régulateurs de la traduction durant l'hypoxie

En réponse à l'hypoxie, les facteurs de croissance angiogéniques et lymphangiogeniques majeures qui vont permettre la revascularisation du tissu sont induits par un mécanisme de traduction IRES-dépendante. Dans cette étude, nous avons recherché des facteurs qui régulent la traduction IRES-dépendante de ces facteurs de croissance en réponse à l'hypoxie dans un modèle de cardiomyocytes murin. Nous avons identifié l'ARN non codant Neat1 induit en réponse à l'hypoxie précoce de façon concomitante avec l'activation de la traduction IRES-dépendante dans les cardiomyocytes. Par des approches de déplétion, nous avons pu montrer que Neat1 jouait un rôle sur l'activation de tous les IRES des facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques. De plus par des approches de smiFISH, nous avons pu montrer que l'ARN Neat1 et l'IRES du FGF1 était colocalisé dans les cellules, préférentiellement en hypoxie. Une analyse de PCR à grande échelle nous a permis de mettre en évidence le rôle de Neat1 sur la traduction de nombreux messagers possédant des IRES. Enfin nous avons également identifié P54nrb et PSPC1 qui intéragissent avec l'ARN Neat1 au sein d'un corps nucléaire induit en réponse au stress : le paraspeckle comme étant des ITAF des facteurs de croissance. Le paraspeckle apparaît ici comme une plateforme d'assemblage pour recruter les ARNm contenant des IRES et éventuellement héberger l'IREsome. Nous montrons pour la première fois un puissant régulateur de la traduction des IRES cellulaire induit en réponse au stress.

eLife

RESEARCH ARTICLE

Long non-coding RNA *Neat1* and paraspeckle components are translational regulators in hypoxia

Anne-Claire Godet[1†], Emilie Roussel[1†], Florian David[1], Fransky Hantelys[1], Florent Morfoisse[1], Joffrey Alves[1], Françoise Pujol[1], Isabelle Ader[2], Edouard Bertrand[3], Odile Burlet-Schiltz[4], Carine Froment[4], Anthony K Henras[5], Patrice Vitali[5], Eric Lacazette[1], Florence Tatin[1], Barbara Garmy-Susini[1], Anne-Catherine Prats[1]*

[1]UMR 1297-I2MC, Inserm, Université de Toulouse, Toulouse, France; [2]UMR 1301-RESTORE, Inserm, CNRS 5070, Etablissement Français du Sang-Occitanie (EFS), National Veterinary School of Toulouse (ENVT), Université de Toulouse, Toulouse, France; [3]UMR5535 CNRS-IGMM, Université de Montpellier, Montpellier, France; [4]Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France; [5]Molecular, Cellular and Developmental Biology Unit (MCD), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, Toulouse, France

SUMMARY Internal ribosome entry sites (IRESs) drive translation initiation during stress. In response to hypoxia, (lymph)angiogenic factors responsible for tissue revascularization in ischemic diseases are induced by the IRES-dependent mechanism. Here, we searched for IRES *trans*-acting factors (ITAFs) active in early hypoxia in mouse cardiomyocytes. Using knock-down and proteomics approaches, we show a link between a stressed-induced nuclear body, the paraspeckle, and IRES-dependent translation. Furthermore, smiFISH experiments demonstrate the recruitment of IRES-containing mRNA into paraspeckle during hypoxia. Our data reveal that the long non-coding RNA *Neat1*, an essential paraspeckle component, is a key translational regulator, active on IRESs of (lymph)angiogenic and cardioprotective factor mRNAs. In addition, paraspeckle proteins p54^{nrb} and PSPC1 as well as nucleolin and RPS2, two p54^{nrb}-interacting proteins identified by mass spectrometry, are ITAFs for IRES subgroups. Paraspeckle thus appears as a platform to recruit IRES-containing mRNAs and possibly host IRESome assembly. Polysome PCR array shows that *Neat1* isoforms regulate IRES-dependent translation and, more widely, translation of mRNAs involved in stress response.

Editor's evaluation

The paper reports that the long non-coding RNA *Neat1* (nuclear paraspeckle assembly transcript 1) is required for IRES Internal Ribosome Entry Site)-mediated mRNA translation activity. *Neat1* is required for the activity of many cellular IRESs during the stress response in angiogenesis and/or cardio-protection. The authors conclude that nuclear paraspeckles serve as areas where cellular IRESes acquire ITAFs (IRES trans-activating factors. The findings of this paper have practical implications beyond a single subfield and the methods, data, and analyses broadly support the claims with only minor weaknesses.

***For correspondence:** anne-catherine.prats@inserm.fr

†These authors contributed equally to this work

Competing interest: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 32

Preprinted: 10 February 2021
Received: 06 April 2021
Accepted: 18 December 2022
Published: 22 December 2022

Reviewing Editor: Nahum Sonenberg, McGill University, Canada

© Copyright Godet, Roussel *et al*. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Introduction

Cell stress triggers major changes in the control of gene expression at the transcriptional and post-transcriptional levels. One of the main responses to stress is the blockade of global translation allowing cells to save energy. This process results from inactivating the canonical cap-dependent mechanism of translation initiation (**Holcik and Sonenberg, 2005**). However, translation of specific mRNAs is maintained or even increased during stress via alternative mechanisms of translation initiation. One of these mechanisms involves internal ribosome entry sites (IRES), structural elements mostly present in the 5′ untranslated regions of specific mRNAs, which drive the internal recruitment of ribosomes onto mRNA and promote cap-independent translation initiation (**Godet et al., 2019**).

Hypoxia, or the lack of oxygen, is a major stress in pathologies such as cancer and cardiovascular diseases (**Pouysségur et al., 2006**). In particular, in ischemic heart failure disease, coronary artery branch occlusion exposes cardiac cells to hypoxic conditions. The cell response to hypoxia induces angiogenesis and lymphangiogenesis to reperfuse the stressed tissue with new vessels and allow cell survival (**Morfoisse et al., 2014**; **Pouysségur et al., 2006**; **Tatin et al., 2017**). The well-known response to hypoxia is the transcriptional induction of specific genes under the control of the hypoxia-induced factors 1 and 2 (HIF1, HIF2) (**Hu et al., 2003**; **Koh et al., 2011**). However, we have recently reported that most mRNAs coding (lymph)angiogenic growth factors are induced at the translatome level in hypoxic cardiomyocytes (**Hantelys et al., 2019**). Expression of these factors allows the recovery of functional blood and lymphatic vasculature in ischemic diseases, including myocardial infarction (**Tatin et al., 2017**; **Ylä-Herttuala and Baker, 2017**). The mRNAs of the major (lymph)angiogenic growth factors belonging to the fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) families all contain IRESs that are activated in early hypoxia (**Morfoisse et al., 2014**; **Hantelys et al., 2019**).

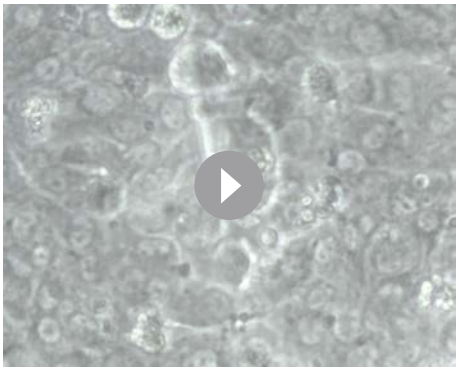
IRES-dependent translation is regulated by IRES trans-acting factors (ITAFs) that are in most cases RNA-binding proteins acting as positive or negative regulators. A given ITAF can regulate several IRESs, while a given IRES is often regulated by several ITAFs (**Godet et al., 2019**), depending on the cell type or physiology. This has led to the concept of IRESome, a multi-partner ribonucleic complex allowing ribosome recruitment onto the mRNA via the IRES.

ITAFs often exhibit several functions in addition to their ability to control translation. Many of them play a role in alternative splicing, transcription, ribosome biogenesis or RNA stability (**Godet et al., 2019**). Clearly, a large part of ITAFs are nuclear proteins able to shuttle between nucleus and cytoplasm. Previous data have also shown that a nuclear event is important for cellular IRES activity, leading to the hypothesis of IRESome formation in the nucleus (**Ainaoui et al., 2015**; **Semler and Waterman, 2008**; **Stoneley et al., 2000**).

Interestingly, several ITAFs are components of a nuclear body, the paraspeckle, formed in response to stress (**Choudhry et al., 2015**; **Fox et al., 2002**). These ITAFs include several hnRNPs, as well as major paraspeckle proteins such as P54^{nrb} nuclear RNA binding (P54^{nrb}/NONO) and splicing factor proline and glutamine-rich (SFPQ/PSF). P54^{nrb} and SFPQ belong to the family of *Drosophila melanogaster* behavior and human splicing (DBHS) proteins whose third member is the paraspeckle protein C1 (PSPC1). P54^{nrb} and SFPQ are essential for paraspeckle formation while PSPC1 is not. These three DBHS proteins are known to interact with each other and function in heteroduplexes (**Fox et al., 2005**; **Lee et al., 2015**; **Passon et al., 2012**). In addition, P54^{nrb} and SFPQ interact with the long non-coding RNA (lncRNA) *Neat1* (nuclear enriched abundant transcript 1), that constitutes the skeleton of the paraspeckle (**Clemson et al., 2009**; **Sunwoo et al., 2009**). This lncRNA, a paraspeckle essential component, is present as two isoforms *Neat1_1* and *Neat1_2* whose sizes in mouse are 3.2 and 20.8 kilobases, respectively (**Sunwoo et al., 2009**). Its transcription is induced during hypoxia by HIF2 and promotes paraspeckle formation (**Choudhry et al., 2015**). *Neat1* is overexpressed in many cancers (**Yang et al., 2017**). Recently, its induction by hypoxia has been shown in cardiomyocytes where it plays a role in cell survival (**Kenneweg et al., 2019**).

According to previous reports, paraspeckle is able to control gene expression via the retention of edited mRNAs and transcription factors (**Hirose et al., 2014**; **Imamura et al., 2014**; **Prasanth et al., 2005**). In 2017, Shen et al. have also shown that the paraspeckle might inhibit translation by sequestering p54^{nrb} and SFPQ which are ITAFs of the *MYC* IRES (**Shen et al., 2017**).

In this study, we were interested in finding new ITAFs responsible for activating (lymph)angiogenic factor mRNA IRESs in HL-1 cardiomyocytes, during early hypoxia. We have previously shown that



Video 1. Beating HL-1 cardiomyocytes (Enlargement 40X). Mouse atrial HL-1 cardiomyocytes exhibit a beating phenotype when cultured in Claycomb medium at high density (***Claycomb et al., 1998***). This phenotype was required to obtain all the data described in the present study.
https://elifesciences.org/articles/69162/figures#video1

the two paraspeckle proteins p54^{nrb} and hnRNPM are ITAFs, activators of the FGF1 IRES during myoblast differentiation (***Ainaoui et al., 2015***). This incited us to investigate the potential role of the paraspeckle and of *Neat1* in the control of IRES-dependent translation in hypoxic cardiomyocytes. We show here that Neat1 expression and paraspeckle formation correlate with the activation of the *FGF1* IRES during hypoxia, in cardiomyocytes and breast cancer cells. The knock-down of p54^{nrb}, PSPC1 or *Neat1* generates a decrease in *FGF1* IRES activity and in endogenous FGF1 expression. Furthermore, our data revealed that IRES-containing mRNA is colocalized with Neat1 in paraspeckle during hypoxia. By quantitative mass spectrometry analysis of the p54^{nrb} interactome, we identified two additional ITAFs able to control the *FGF1* IRES activity: nucleolin and ribosomal protein RPS2. Analysis of IRESs in the knock-down experiments showed that p54^{nrb} and PSPC1 are activators of several but not all IRESs of (lymph)angiogenic and cardioprotective factor mRNAs whereas *Neat1* appears as a strong activator of all the cellular IRESs tested. These data suggest that the paraspeckle, via *Neat1* and several protein components would be the site of IRESome assembly in the nucleus. In addition, a polysome PCR array reveals that *Neat1* affects the translation of most IRES-containing mRNAs and of several mRNA families involved in hypoxic response, angiogenesis and cardioprotection.

Results

FGF1 IRES activation during hypoxia correlates with paraspeckle formation and with Neat1 induction in different cell types

In order to analyze the regulation of IRES activity during hypoxia, HL-1 cardiomyocytes were transduced with the 'Lucky Luke' bicistronic lentivector validated in our previous reports, containing the *renilla* luciferase (LucR) and firefly luciferase (LucF) genes separated by the *FGF1* IRES (***Video 1***, ***Figure 1A***). In this construct, the first cistron LucR is expressed in a cap-dependent manner and the second cistron LucF is under the control of the IRES. The ratio LucF/LucR reflects the IRES activity.

LucR and LucF activities were measured in HL-1 cells subjected to hypoxia for 4 hr, 8 hr, or 24 hr (***Figure 1—figure supplement 1***, ***Supplementary file 1***). These conditions were exactly the same as that used in our previous report providing evidence of IRES activation by hypoxia (***Hantelys et al., 2019***). We previously showed in the same report that eIF2α is phosphorylated after 4 hr of hypoxia, while no change in 4E-BP1 phosphorylation is observed. The polysome/monosome ratio indicated that global protein synthesis decreases in these conditions (***Hantelys et al., 2019***). Those data allowed us to conclude that IRES activities are not negatively affected by eIF2α phosphorylation.

Here, we showed that both luciferase activities increase after 4 hr of hypoxia and decreased at 24 hr. However, LucF increased more than LucR (2.5 times versus 1.5 times, respectively). Thus the ratio LucF/LucR revealed a significant activation of the *FGF1* IRES in early hypoxia, correlated to induction of endogenous FGF1 as previously shown (***Hantelys et al., 2019***; ***Figure 1B and C***, ***Figure 1—figure supplement 1***). *Neat1* and *Neat1_2* expression in cells was measured by reverse transcription and droplet digital PCR (RT ddPCR), showing an increase of *Neat1* and *Neat1_2* at 4 hr with a peak of expression of Neat1 at 8 hr of hypoxia, while the peak of expression of *Neat1_2* was observed after 4 hr of hypoxia (***Figure 1D***). The same data were also obtained by classical RT-qPCR (data not shown), in agreement with our previous report showing *Neat1* induction by hypoxia in HL-1 cells (***Hantelys et al., 2019***).

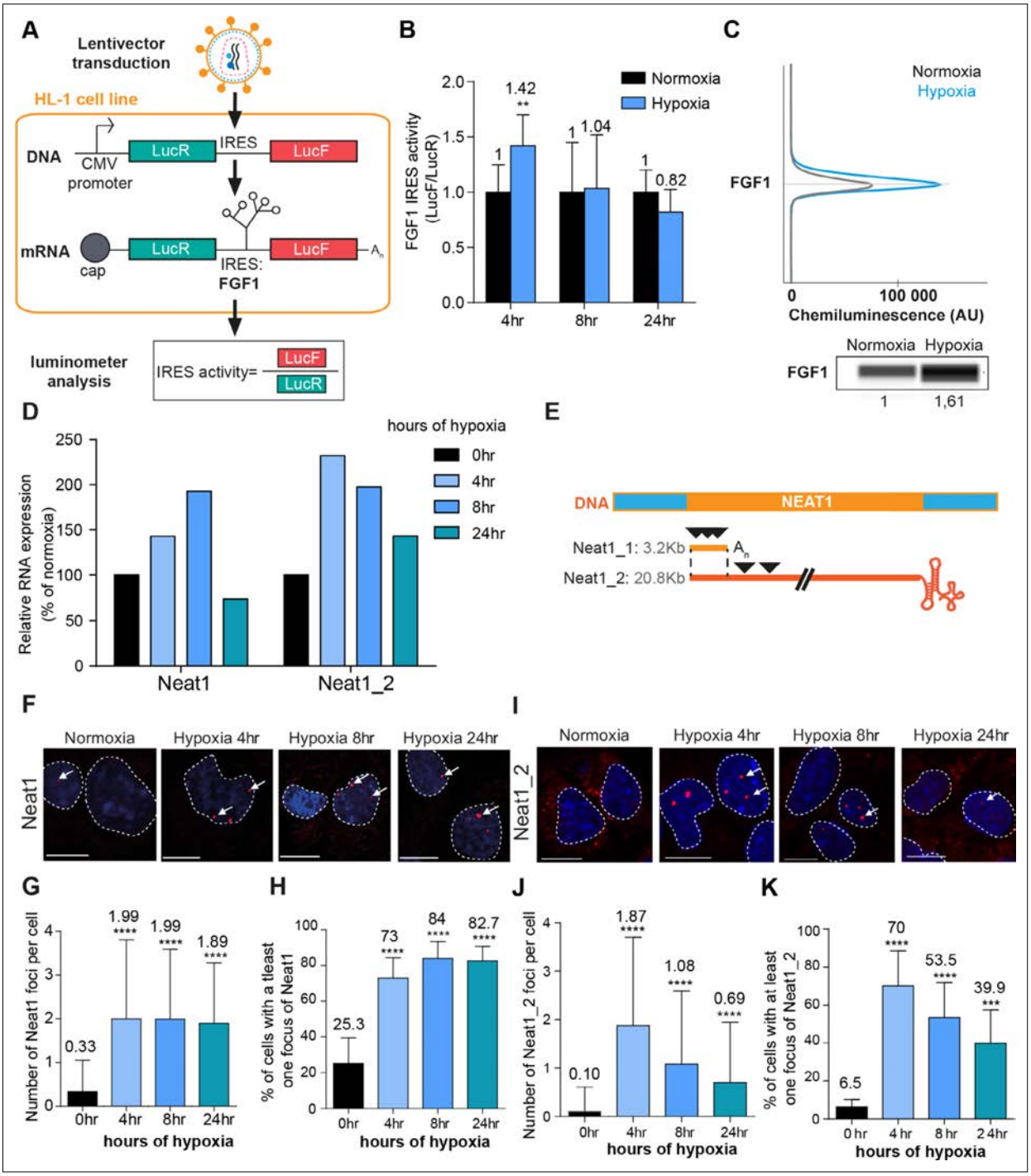


Figure 1. *FGF1* IRES activation during hypoxia correlates with *Neat1* induction and paraspeckle formation. (**A**) Schema depicting the Lucky Luke bicistronic construct and HL-1 cells transduced by a lentivector carrying the transgene. The LucF/LucR ratio indicates the IRES activity. (**B**) Activity of the human *FGF1* IRES in HL-1 cardiomyocytes at 4 hr, 8 hr, or 24 hr of hypoxia normalized to normoxia. The corresponding luciferase values are presented in ***Figure 1—figure supplement 1***, ***Supplementary file 1***. (**C**) Detection of endogenous mouse FGF1 by capillary Simple Western in normoxic and hypoxic (2 hr) cardiomyocytes. The curve corresponds to the chemiluminescence signal detected with FGF1 antibody. A numerical blot is represented. Below the blot is shown the quantification of FGF1 normalized to total proteins and to control gapmer. Total proteins are detected by a dedicated

Figure 1 continued on next page

Figure 1 continued

channel in capillary Simple Western. The full raw unedited gel is provided in ***Figure 1—figure supplement 1*** (***Figure 1—figure supplement 1—source data 1***). (**D**) HL-1 cells were subjected to normoxia (0 hr) or to hypoxia during 4 hr, 8 hr, and 24 hr. *Neat1* and *Neat1_2* expression was analyzed by droplet digital PCR (Primer sequences in ***Supplementary file 2***). RNA expression is normalized to the normoxia time point. (**E**) Schema depicting the *Neat1* mouse gene and the *Neat1_1* and *Neat1_2* RNA isoform carrying a poly(A) tail or a triple helix, respectively. Black arrowheads represent FISH probes against *Neat1* and *Neat1_2* (sequences in ***Supplementary file 2***). (**F–K**) *Neat1* (**F**) or *Neat1_2* (**I**) FISH labeling in HL-1 cardiomyocytes in normoxia or at 4 hr, 8 hr, and 24 hr of 1% O_2. DAPI staining is represented in blue and *Neat1* or *Neat1_2* cy3 labeling in red. Nuclei are delimited by dotted lines. Scale bar = 10 µm. Larger fields are presented in ***Figure 1—figure supplement 2***. (**G and J**) Quantification of *Neat1* (**G**) or *Neat1_2* (**J**) foci per cell by automated counting (ImageJ). (**H and K**) Percentage of cell harboring at least one focus of *Neat1* (**H**) or *Neat1_2* (**K**); Histograms correspond to means ± standard deviation, with Mann-Whitney (n=12) (**B**) or one-way ANOVA (**G-H**, n=269–453) and (**J-K**, n=342–499); **p<0.01, ***<0.001, ****p<0.0001.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 1:

Figure supplement 1. Bicistronic vector LucR and LucF expression and endogenous FGF1 protein expression in hypoxic HL-1 cells.

Figure supplement 1—source data 1.

Figure supplement 2. Detection of *Neat1* and *Neat1_2* in hypoxic HL-1 by FISH.

Figure supplement 3. *FGF1* IRES is activated by hypoxia in correlation with *Neat1* induction in 67NR cells and inactivated after *Neat1* knock-down.

In parallel, paraspeckle formation was studied by fluorescent in situ hybridization (FISH) targeting the non-coding RNA *Neat1*, considered as the main marker of paraspeckles. The fluorescent probes targeted either the common part of the two isoforms *Neat1_1* and *Neat 1_2*, or only the large isoform *Neat1_2* (***Figure 1E***). After 4 hr of hypoxia, the number of foci increased and reached 2 foci per cell on average, while the number of cells containing at least one focus shifted from 20% to 70% (***Figure 1F–K***, ***Figure 1—figure supplement 2***). This was observed with both *Neat1* and *Neat1_2* probes. The values observed at 4 hr did not change after 8 hr and 24 hr of hypoxia with the *Neat1* probe (***Figure 1F–H***). In contrast, the number of foci containing *Neat1_2* decreased after longer times of hypoxia: at 8 hr and 24 hr, the number of foci per cell reached 1 and 0.5 while only 50% and 40% of the cells contained at least one focus, respectively (***Figure 1I–K***). Surprisingly, *Neat1_2* was detected in the cytoplasm in normoxia and after 24 hr of hypoxia (***Figure 1I***, ***Figure 1—figure supplement 2***).

These data revealed that *FGF1* IRES activation correlates with increased *Neat1* expression and paraspeckle formation after 4 hr of hypoxia in HL-1 cardiomyocytes. To determine whether such a correlation also occurs in other cell types, similar experiments were performed in a mouse breast tumor cell line 67NR (***Figure 1—figure supplement 3***). In these cells, known to be more resistant to hypoxia, *Neat1* increased only after 24 hr of hypoxia. In particular, we observed a strong and significant induction of *Neat1_2* (***Figure 1—figure supplement 3B***). As regards the IRES activity (LucF/LucR ratio), it also increased after 24 hr of hypoxia (***Figure 1—figure supplement 3C***).

These data indicate that the correlation between *Neat1_2* isoform induction and IRES activation under hypoxia exists in different cell types.

LncRNA *Neat1* knock-down drastically affects the *FGF1* IRES activity and endogenous FGF1 expression

To determine whether *Neat1* could have a role in the regulation of *FGF1* IRES activity, we depleted HL-1 for this non-coding RNA using locked nucleic acid (LNA) gapmers, antisense modified oligonucleotides described for their efficiency in knocking-down nuclear RNAs. HL-1 cells transduced with the bicistronic vector were transfected with a pool of gapmers targeting *Neat1* and with a control gapmer (***Supplementary file 2***). The knock-down efficiency was measured by smiFISH (single molecule inexpensive FISH) and ddPCR and showed a decrease in the number of paraspeckles, correlated to the decrease of *Neat1* RNA, which shifted from 5 to 2 foci per cell (***Figure 2A–B***, ***Figure 2—figure supplement 1A***; ***Tsanov et al., 2016***). In these experiments performed in normoxia, the number of paraspeckles was high (almost 5 foci per cell), suggesting that cells were already stressed by the gapmer treatment, before being submitted to hypoxia. Alternatively, it could also be explained by the high sensitivity of the smiFISH method used here, whereas paraspeckles were detected by FISH in ***Figure 1***. To evaluate the IRES activity, the ratio LucF/LucR was measured in normoxia or after 4 hr of hypoxia, revealing that the IRES activity decreased by two times upon Neat1 depletion (***Figure 2C***, ***Supplementary file 3***). This effect was also observed on endogenous FGF1 protein expression,

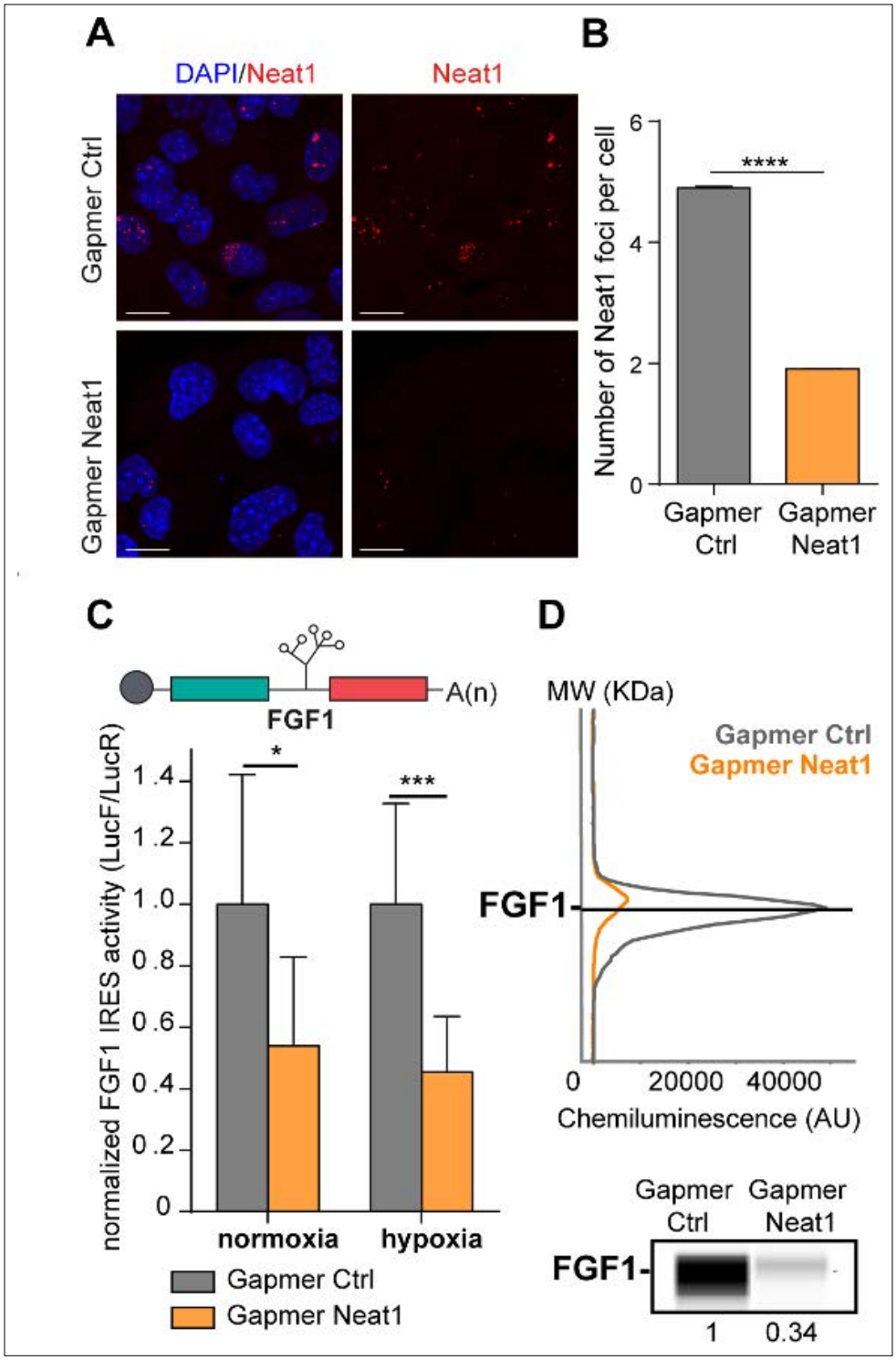


Figure 2. LncRNA *Neat1* knock-down drastically affects the *FGF1* IRES activity and endogenous FGF1 expression. (**A**) SmiFISH imaging of *Neat1* knock-down by a pool of LNA gapmers targeting both isoforms (Sequences in ***Supplementary file 2C***). Cells were treated during 48 hr with the gapmers. Scale bar = 10 µm. (**B**) *Neat1* foci counting per cell for the control gapmer and *Neat1* LNA gapmer pool, using unpaired two-tailed student t-test

Figure 2 continued on next page

Figure 2 continued

with n=249 for control and 187 for Neat1 LNA gapmer. (**C**) *FGF1* IRES activities in HL-1 cells transduced with Lucky Luke bicistronic reporter and treated with gapmer *Neat1* or control during normoxia or hypoxia (1% O_2). Histograms correspond to means ± standard deviation of the mean. Non-parametric Mann-Whitney test was performed with n=9. *p<0.05, ***<0.001, ****p<0.0001. The mean has been calculated with nine cell culture biological replicates, each of them being already the mean of three technical replicates (27 technical replicates in total). Detailed values of biological replicates are presented in ***Supplementary file 3***. (**D**) Detection of endogenous mouse FGF1 by capillary Simple Western. The curve corresponds to the chemiluminescence signal detected with FGF1 antibody. A numerical blot is represented. Below the blot is shown the quantification of FGF1 normalized to total proteins and to control gapmer. The source data of the capillary Simple Western are provided in ***Figure 2—figure supplement 2***. Total proteins are detected by a dedicated channel in capillary Simple Western.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 2:

Figure supplement 1. Knock-down of *Neat1* and *Neat1_2* in HL-1 cardiomyocytes.

Figure supplement 2. Effect of *Neat1* knock-down on endogenous FGF1 protein expression.

Figure supplement 2—source data 1.

Figure supplement 3. Effect of *Neat 1_2* knock-down on *FGF1* IRES activity.

Figure supplement 4. Effect of *Neat1_2* knock-down on eIF2α phosphorylation.

Figure supplement 4—source data 1.

Figure supplement 5. FGF1 half-life after *Neat1_2* gapmer treatment.

Figure supplement 5—source data 1.

Figure supplement 6. p21 half-life after *Neat1_2* gapmer treatment.

Figure supplement 6—source data 1.

measured by capillary Simple Western, which decreased by three times (***Figure 2D***, ***Figure 2—figure supplement 2***).

Neat1_2 knock-down was then performed to evaluate the contribution of the long Neat1 isoform. Also, the *FGF1* IRES activity decreased following *Neat1_2* depletion, however less importantly than with the knock-down of the two isoforms (***Figure 2—figure supplement 3***), suggesting an involvement of both *Neat1* isoforms. Capillary Western experiments indicated a slight increase of eIF2α phosphorylation upon *Neat1_2* depletion (***Figure 2—figure supplement 4***). It was not sufficient to block global translation, as shown by the renilla luciferase activity (***Supplementary file 3***, page 2). Furthermore, we have shown in a previous report that the FGF1 IRES activity increases in hypoxia in conditions of strong eIF2α phosphorylation. FGF1 half-life was superior to 24 hr and was not affected by *Neat1* knock-down (***Figure 2—figure supplements 5–6***). All these arguments indicate that the significant decrease of FGF1 IRES activity and of endogenous FGF1 expression observed in ***Figure 2*** does not result from eIF2α phosphorylation or decrease in FGF1 half-life, and probably results from Neat1 depletion. This suggested that *Neat1* might regulate *FGF1* mRNA translation, directly or indirectly.

The IRES-containing mRNA is colocalized with *Neat1* during hypoxia

The effect of *Neat1* on *FGF1* IRES activity suggested an interaction (direct or indirect) between these two RNAs. SmiFISH experiments were performed with two sets of 48 primary probes targeting *Neat1* or the bicistronic mRNA, respectively. As a control, we also used a bicistronic construct with a hairpin instead of the IRES. The two secondary probes were coupled to different fluorophores to detect *Neat1* and the bicistronic mRNA separately and look for a putative colocalization (***Figure 3***). Data clearly show that the IRES containing bicistronic mRNA is colocalized with *Neat1* and that this colocalization significantly increases during hypoxia, which is not the case for the hairpin control (***Figure 3C and D***). These data suggested that the IRES-containing mRNA is recruited into paraspeckles during hypoxia.

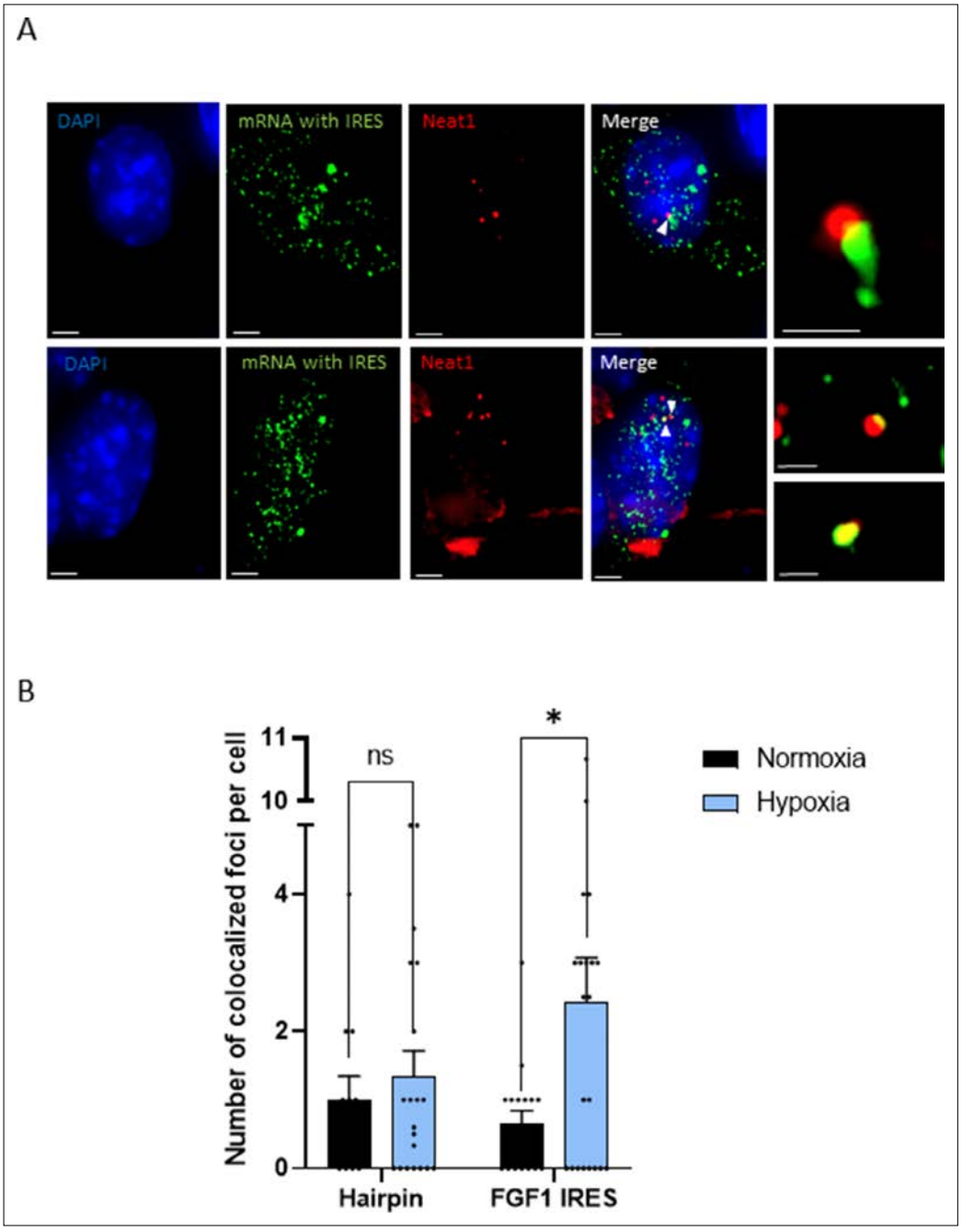


Figure 3. IRES-containing mRNA is colocalized with *Neat1* in hypoxic HL-1 cells. Cells were transduced with lentivectors carrying bicistronic Lucky Luke constructs with the *FGF1* IRES or a hairpin (control), subjected or not to 4 hr hypoxia. SmiFISH experiments were performed. (**A**) SmiFISH images showing the bicistronic mRNA carrying the *FGF1* IRES (green) colocalized with *Neat1* RNA (red) in hypoxia condition. Two representative cells are presented. Scale bars are 3 µm for higher panels, 4 µm for lower panesl and 1 µm for zoomed images of colocalized spots. (**B**) Quantification of colocalized spots per cell (n=30). Unpaired two-tailed Student T-test was performed.

Paraspeckle proteins P54^{nrb} and PSCP1, but not SFPQ, are ITAFs of the *FGF1* IRES

The correlation between paraspeckle formation and *FGF1* IRES activation, together with the probable recruitment of IRES-containing mRNA into paraspeckles during hypoxia, incited us to study the role of other paraspeckle components in the control of IRES activity. Three major paraspeckle proteins were chosen, the DBHS proteins, SFPQ, p54^{nrb} and PSPC1 (***Figure 4A***). SFPQ and p54^{nrb} have been previously described for their ITAF function (***Ainaoui et al., 2015***; ***Cobbold et al., 2008***; ***Lampe et al., 2018***; ***Sharathchandra et al., 2012***; ***Shen et al., 2017***). In particular, p54^{nrb} regulates the FGF1 *IRES* activity during myoblast differentiation (***Ainaoui et al., 2015***).

HL-1 cells transduced by the 'Lucky Luke' bicistronic construct were transfected with siRNA smartpools targeting each of the three proteins. The knock-down efficiency was checked by capillary Simple Western, classical Western, or RT qPCR (***Figure 4—figure supplement 1***).

SFPQ knock-down did not affect the IRES activity (***Figure 4B***, ***Supplementary file 4***). In contrast, we observed a decrease in IRES activity with p54^{nrb} and PSPC1 knock-down, both in normoxia and in hypoxia (***Figure 4C–DSupplementary file 4***, ***Supplementary file 5***), despite a knock-down efficiency below 50%. p54^{nrb} and PSPC1 knock-down also inhibited the expression of endogenous FGF1 protein (***Figure 3E–F***, ***Figure 4—figure supplement 2***). FGF1 half-life was not altered by siRNA treatment, indicating a translational control (***Figure 4—figure supplements 3–4***). These data confirmed the ITAF role of p54^{nrb} in HL-1 cardiomyocyte, and indicated that PSPC1 is also an ITAF of the *FGF1* IRES. The ability of three paraspeckle components, *Neat1*, p54^{nrb} and PSPC1, to regulate the *FGF1* IRES activity, together with the colocalization of the bicistronic mRNA with Neat1 observed in ***Figure 3***, led us to the hypothesis that the paraspeckle might be involved in the control of IRES-dependent translation.

P54^{nrb} interactome in normoxic and hypoxic cardiomyocytes

The moderate effect of p54^{nrb} or PSPC1 depletion on *FGF1* IRES activity, possibly due to the poor efficiency of knock-down (>50%), also suggested that other proteins may be involved. Previous data from the literature support the hypothesis that the IRESome is a multi-partner complex. In order to identify other members of this complex, we analysed the p54^{nrb} interactome in HL-1 cell nucleus and cytoplasm using a label-free quantitative mass spectrometry approach. For this purpose, cells were transduced by a lentivector expressing an HA-tagged p54^{nrb} (***Figure 5A***). After cell fractionation (***Figure 5B*** and ***Figure 5—figure supplement 1A and B***), protein complexes from normoxic and hypoxic cells were immunoprecipitated with anti-HA antibody. Immunoprecipitated interacting proteins (three to four biological replicates for each group) were isolated by SDS-PAGE, in-gel digested with trypsin and analyzed by nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS), leading to the identification and quantification of 2013 proteins (***Supplementary file 7***). To evaluate p54^{nrb} interaction changes, pairwise comparisons based on MS intensity values were performed for each quantified protein between the four groups, cytoplasmic and nuclear complexes from cells subjected to normoxia or hypoxia (***Figure 5C***). Enriched proteins were selected based on their significant protein abundance variations between the two compared group (fold-change (FC) >2 and<0.5, and Student t test p<0.05) (see STAR Method for details) (***Figure 5D–E*** and ***Figure 5—figure supplement 1***). Globally, the HA-tag capture revealed an enrichment of hnRNP proteins in nucleus and of ribosomal proteins in the cytoplasm (***Figure 5—figure supplement 1C and D***). In nucleus P54^{nrb} interacted with itself (endogenous mouse Nono), PSPC1 and SFPQ, as well as with other paraspeckle components: in total P54^{nrb} interaction was identified with 22 proteins among 40 paraspeckle components listed in previous reports (***Table 1***; ***Naganuma et al., 2012***; ***Yamamoto et al., 2021***). Six of these paraspeckle components exhibit an ITAF function (FUS, hnRNPA1, hnRNPK, hnRNPM, hnRNPR, and SFPQ ***Figure 5—figure supplement 1***, ***Table 1***). Two additional ITAFs interact with p54: hnRNPC and hnRNPI (***Godet et al., 2019***).

As regards cytoplasmic proteins, we identified RPS25, a ribosomal protein previously described as an ITAF for many IRESs (***Figure 5—figure supplement 1A***; ***Hertz et al., 2013***). Interestingly, p54^{nrb} also interacted with RPS5, RPS18 and RPS19, and other RPs, mainly from the small ribosomal subunit.

Only few proteins were significantly enriched when comparing hypoxic versus normoxic extracts. In hypoxic nucleus, the significantly enriched proteins are hnRNPM, nucleolin (both previously described as ITAFs) (***Hertz et al., 2013***; ***Shi et al., 2016***; ***Shi et al., 2017***) and the ribosomal protein RPS2/uS5 (***Figure 5D***), while the helicase DDX17, the enolase ENO3 and the heat shock protein HSPA2 are

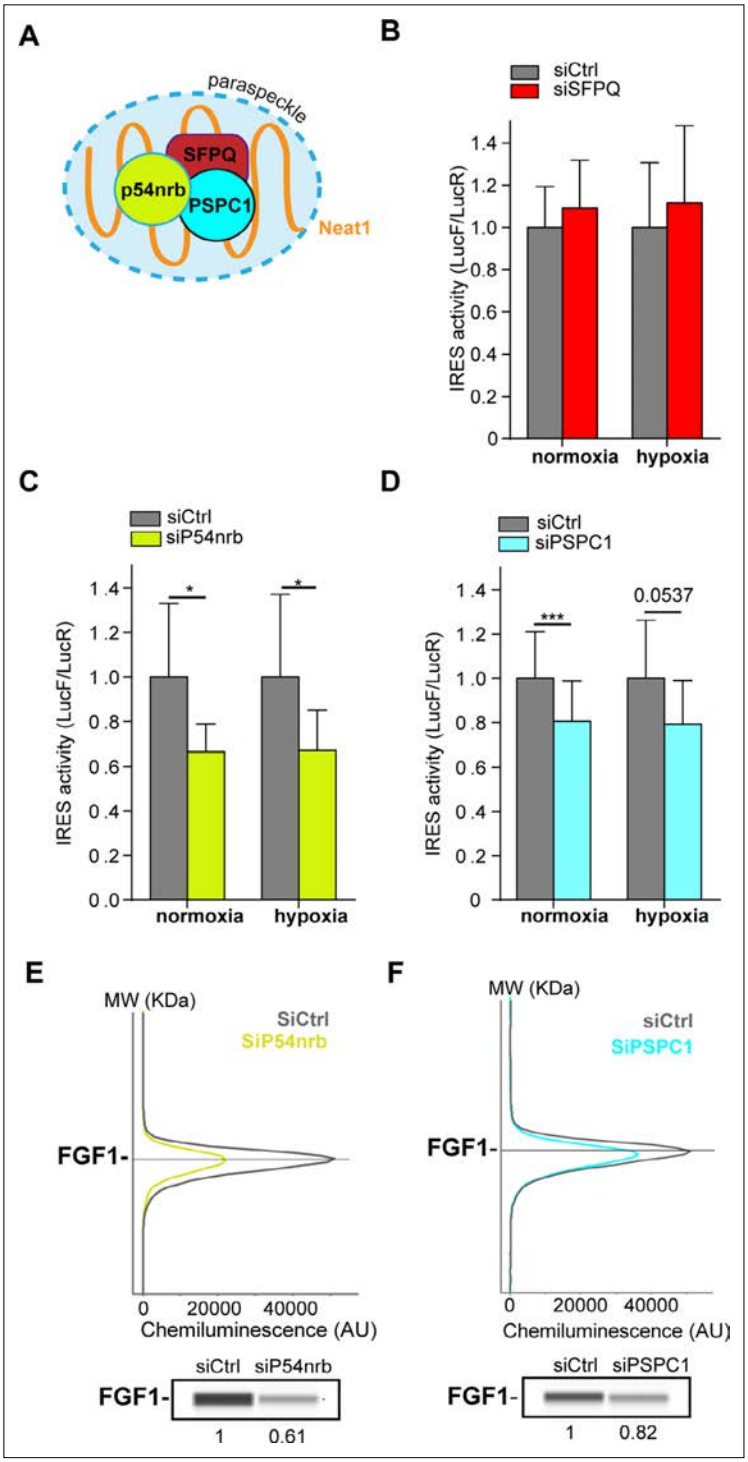


Figure 4. Paraspeckle proteins p54^{nrb} and PSCP1, but not SFPQ, are ITAFs of the *FGF1* IRES. (**A**) Schema of paraspeckle and DBHS proteins. (**B–D**) *FGF1* IRES activity upon knock-down of SFPQ (**B**), P54^{nrb} (**C**) or PSPC1 (**D**) in HL-1 cell (***Figure 4—figure supplement 1—source data 1***) transduced with Lucky Luke bicistronic reporter during normoxia or hypoxia was measured as in ***Figure 2***. Cells were harvested 72 hr after siRNA treatment. The IRES activity values have been normalized to the control siRNA. Histograms correspond to means ± standard

Figure 4 continued on next page

Figure 4 continued

deviation of the mean, with a non-parametric Mann-Whitney test with n=9; *p<0.05, ***<0.001. The mean has been calculated with nine cell culture biological replicates, each of them being already the mean of three technical replicates (27 technical replicates in total). Detailed values of biological replicates are presented in ***Supplementary file 3***, ***Supplementary file 4***, ***Supplementary file 5***. (**E and F**) Capillary Simple Western detection of endogenous FGF1 protein with P54^{nrb} (**E**) or PSPC1 (**F**) knock-down. Source data of capillary Simple Western are presented in ***Figure 4—figure supplement 2*** (***Figure 4—figure supplement 2—source data 1***).

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 4:

Figure supplement 1. Knock-down of p54^{nrb}, PCPC1 and SFPQ in HL-1 cardiomyocytes.

Figure supplement 1—source data 1.

Figure supplement 2. FGF1 protein expression in response to p54^{nrb} or PSPC1 knock-down.

Figure supplement 2—source data 1.

Figure supplement 3. FGF1 half-life in response to p54^{nrb} or PSPC1 knock-down.

Figure supplement 3—source data 1.

Figure supplement 4. p21 half-life in response to p54^{nrb} or PSPC1 knock-down.

Figure supplement 4—source data 1.

enriched in hypoxic cytoplasm (***Figure 5E***). Interaction of nucleolin with p54^{nrb} was also validated by co-immunoprecipitation (***Figure 5—figure supplement 2***).

These data showed that p54^{nrb} interacts in normoxia and hypoxia with several ITAFs known as paraspeckle components, suggesting that the paraspeckle might be involved in the formation of the IRESome. Its interaction with numerous RPs also suggests that it interacts with the small ribosomal subunit in the cytoplasm.

p54^{nrb}-interacting proteins, nucleolin and RPS2, control the *FGF1* IRES activity

The three candidates identified in nuclear extracts of hypoxic cardiomyocytes, hnRNPM, nucleolin and RPS2 represent potential candidates as ITAFs of the *FGF1* IRES in hypoxia. Among them, hnRNPM has been previously described as an ITAF during myoblast differentiation while nucleolin is an ITAF of several IRESs including *p53* and *VEGFD* IRESs but has never been described for *FGF1* IRES (***Ainaoui et al., 2015***; ***Chen et al., 2012***; ***Godet et al., 2019***; ***Morfoisse et al., 2016***; ***Peddigari et al., 2013***; ***Takagi et al., 2005***).

HL-1 cardiomyocytes transduced by the Lucky Luke lentivector with the *FGF1* IRES were transfected as above with siRNA smartpools targeting RPS2, hnRNPM or nucleolin (***Figure 6***). The knock-down was effective, but only 50–60%, for the three mRNAs (***Figure 6A–D***). This moderate knock-down was probably due to a weak transfection efficiency of HL-1 cells with the siRNAs. Nevertheless, we observed a decrease in IRES activity upon depletion of RPS2 and nucleolin, significant in normoxia but with the same trend in hypoxia while no effect was observed upon hnRNPM depletion (***Figure 6E***, ***Supplementary file 4***). Nucleolin depletion inhibited endogenous FGF1 protein expression (***Figure 6F***, ***Figure 6—figure supplement 1***). These data suggest that nucleolin and RPS2 are new ITAFs of the *FGF1* IRES. Their nuclear localization and interaction with p54^{nrb} indicate that they could be components of the paraspeckle. RPS2 has never been described as an ITAF before the present study.

Neat1 is the key activator of (lymph)angiogenic and cardioprotective factor mRNA IRESs

We have shown above that three main paraspeckle components, *Neat1*, p54^{nrb} and PSPC1, control the FGF1 IRES activity in HL-1 cardiomyocytes. To determine if the role of paraspeckle in translational control may be generalized to other IRESs, we used Lucky Luke lentivectors containing a set of other IRESs from *FGF2, VEGFA, VEGFC, VEGFD, or MYC* genes and from EMCV virus, between the two luciferase genes (***Figure 7***). The *VEGFA* mRNA contains two IRESs called here *VEGFAa* and *VEGFAb IRESs* (***Huez et al., 1998***).

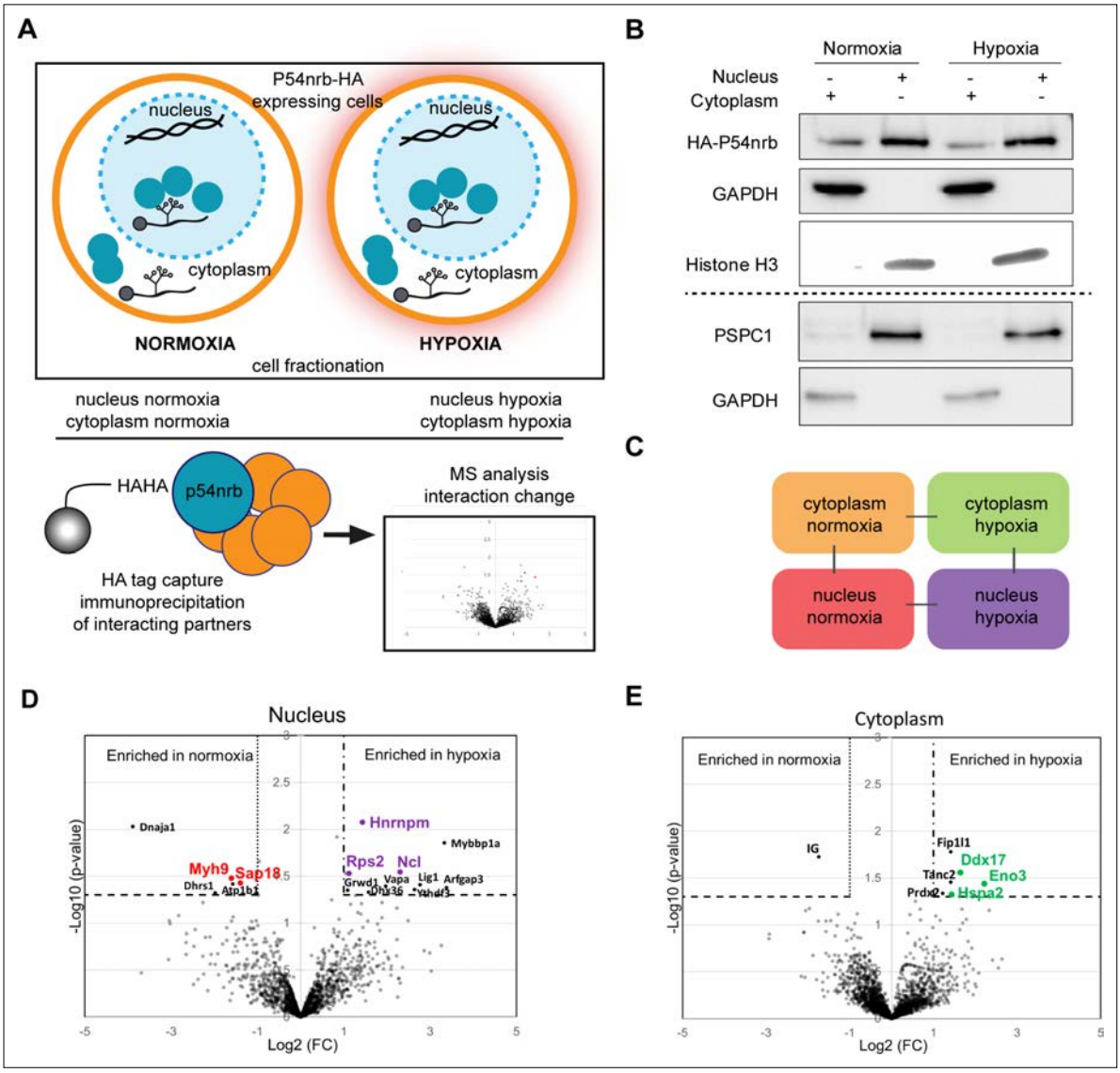


Figure 5. P54^{nrb} interactome in normoxic and hypoxic cardiomyocytes. (**A**) Experimental workflow: p54^{nrb}-HA transduced HL-1 cells were subjected to normoxia or hypoxia, then nucleus and cytoplasm fractionation was performed and extracts were immunoprecipitated using anti-HA antibody. Enriched interacting proteins were identified by using a label-free quantitative mass spectrometry approach. (**B**) Western blot of fractionation experiment of HL-1 cells in normoxia and hypoxia. Histone H3 was used as a nuclear control and GAPDH as a cytoplasm control. The dotted line delineates two different blots of the same fractionation experiment. (**C**) Schema of the four pairwise comparisons submitted to statistical analysis. (**D and E**) Volcano plots showing proteins enriched (bold black) and significantly enriched (after elimination of false-positive hits from quantitation of low-intensity signals) in the nucleus for hypoxia (purple) versus normoxia (red) (**D**) or in the cytoplasm for hypoxia (green) versus normoxia (**E**). An unpaired bilateral student t-test with equal variance was used. Enrichment significance thresholds are represented by an absolute log2-transformed fold-change (FC) greater than 1 and a -log10-transformed (p-value) greater than 1.3. Details are provided in ***Supplementary file 7***.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 5:

Figure supplement 1. Western blot of fractionation experiment of HL-1 cells and label-free quantitative analysis of HA-P54^{nrb}-bound proteins identified by mass spectrometry in different conditions.

Figure supplement 2. p54^{nrb} is co-immunoprecipitated by anti-nucleolin antibody.

Figure supplement 2—source data 1.

Table 1. The p54 interactome includes 22 among 40 proteins described as paraspeckle components.
The paraspeckle components listed in the reports by ***Naganuma et al., 2012*** and by ***Yamamoto et al., 2021*** is presented here with their ITAF function and their presence in the p54^{nrb} interactome. Their belonging to class I, II, or III of the paraspeckle proteins is indicated. Class I proteins are essential for paraspeckle formation.

Name	Alternative name	Class	ITAF	Presence in p54^{nrb} MS-IP
ASXL1	MDS/BOPS	I	No	No
CELF6		n/d	No	No
CIRBP		IIIB	No	Yes
CPSF6		IIIA	No	Yes
CPSF7		II	No	Yes
DAZAP1		IB	No	Yes
DLX3		n/d	No	No
EWSR1			No	Yes
FAM113A		II	No	No
FAM98A		II	No	Yes
FIGN		II	No	No
FUS		IB	Yes	Yes
FUSPI1	SRSF10	II	No	Yes
hnRNPA1		II	Yes	Yes
hnRNPA1L2		n/d	No	No
hnRNPF		n/d	No	Yes
hnRNPH1		n/d	No	Yes
hnRNPH3		IB	No	No
hnRNPK		IA	Yes	Yes
hnRNPM		n/d	Yes	Yes
hnRNPR		II	Yes	No
hnRNPUL1		II	No	Yes
MEX3C		n/d	No	No
NUDT21		IIIA	No	Yes
p54^{nrb}	NONO	IA	Yes	Yes
PSPC1		IIIB	No	Yes
RBM12		II	No	No
RBM14		IA	No	No
RBM3		IIIB	No	Yes
RBM4B		IIIB	No	No
RBM7		IIIB	No	No
RBMX		IIIB	No	Yes
RUNX3		IIIB	No	No
SFPQ	PSF	IA	Yes	Yes
SS18L1		n/d	No	No
SWI/SNF		IB	No	No

Table 1 continued on next page

Table 1 continued

Name	Alternative name	Class	ITAF	Presence in p54^{nrb} MS-IP
TAF15			No	No
TDP-43		II	No	No
UBAP2L		IIIA	No	Yes
ZNF335	TARDBP	IIIB	No	Yes

HL-1 cells were transduced by the different lentivectors and transfected either by the siRNA smartpools to deplete p54^{nrb} and PSPC1, or by the gapmer pool to deplete *Neat1*. The data revealed that p54^{nrb} or PSPC1 depletion affected several IRESs but not all (***Figure 7A–BSupplementary file 5***, ***Supplementary file 6***), whereas *Neat1* depletion clearly affected all cellular IRESs but not the viral EMCV IRES (***Figure 7C***, ***Supplementary file 3***).

These data allowed us to group the IRESs in different 'regulons' in normoxia and in hypoxia (***Figure 7D***). According to our data, P54^{nrb} is an activator of the *FGF1* and *VEGFC* IRESs in normoxia, and of the *FGF1* and *VEGFAa* IRESs in hypoxia. PSPC1 is an activator of the *FGF1*, *FGF2*, *VEGFAa*, *VEGFC*, and *IGF1R* IRESs in normoxia and of the *FGF1* and *FGF2* IRESs in hypoxia. *Neat1* is an activator of the *FGF1, FGF2, VEGFAb, VEGFC, VEGFD, IGF1R*, and *MYC* IRESs but not of the *VEGFAa* IRES in normoxia while it activates all the cellular IRESs in hypoxia. The EMCV IRES does not belong to any of these groups as it is not regulated by these three ITAFs, suggesting that this viral IRES is not regulated by the paraspeckle.

In conclusion, these data suggest that IRESome composition varies for each IRES and with the normoxic or hypoxic conditions. The long non-coding RNA *Neat1* appears as the key ITAF for the activation of all the cellular IRESs, suggesting a crucial role of the paraspeckle in IRESome formation and in the control of IRES-dependent translation, at least for cellular IRESs.

Neat1 isoforms impact the recruitment into polysomes of mRNAs involved in the stress response

The role of *Neat1* on translatome was then studied using a Fluidigm Deltagene PCR array targeting 96 genes coding IRES-containing mRNAs, ITAFs or proteins involved in angiogenesis and cardioprotection (***Supplementary file 2E***). HL-1 cells were treated with gapmers targeting the two *Neat1* isoforms or only *Neat1_2* before analyzing the recruitment of mRNAs into polysomes compared to the control gapmer. Recruitment into polysomes decreased for 49% of IRES-containing mRNAs following *Neat1* invalidation, and increased for the other 51%. In contrast this decrease concerned 95% of these mRNAs after *Neat1_2* knock-down (***Figure 8A and B***, ***Supplementary file 8***). In contrast, the global level of translation was not affected (***Figure 8—figure supplement 1***). As eIF2α phosphorylation was slightly increased in these conditions (***Figure 2—figure supplement 4***), we cannot completely rule out that it could affect the expression of certain mRNAs, despite the absence of inhibition of global translation. However, the insensitivity of many IRESs to eIF2α phosphorylation shown previously suggests that the present data result from an effect of *Neat1*, particularly on translation of IRES-containing mRNAs, while the two isoforms may have distinct effects (***Hantelys et al., 2019***). Interestingly, a similar effect was observed for the other genes tested in the PCR array: *Neat1* or *Neat1_2* knock-down inhibited translation of ITAF-coding genes by 71% or 87%, respectively (***Figure 8C and D***, ***Supplementary file 8***). This inhibition concerned 57% or 89% of the remaining genes involved in angiogenesis and cardioprotection for *Neat1* or *Neat1_2* knock-down, respectively (***Figure 8—figure supplement 2***). In total, 92% of the genes of the PCR array were less recruited into polysomes after *Neat1_2* knock-down, versus only 56% after *Neat1* knock-down. These data strongly suggest that *Neat1_2* might be a translational activator of families of genes involved in the response to hypoxic stress in cardiomyocytes.

Discussion

The present data demonstrate a link between the paraspeckle and the control of IRES-dependent translation during hypoxia in mouse cardiomyocytes. We show that three major paraspeckle components regulate IRES-dependent translation: p54^{nrb}, PSPC1, and *Neat1*, as well as by two proteins

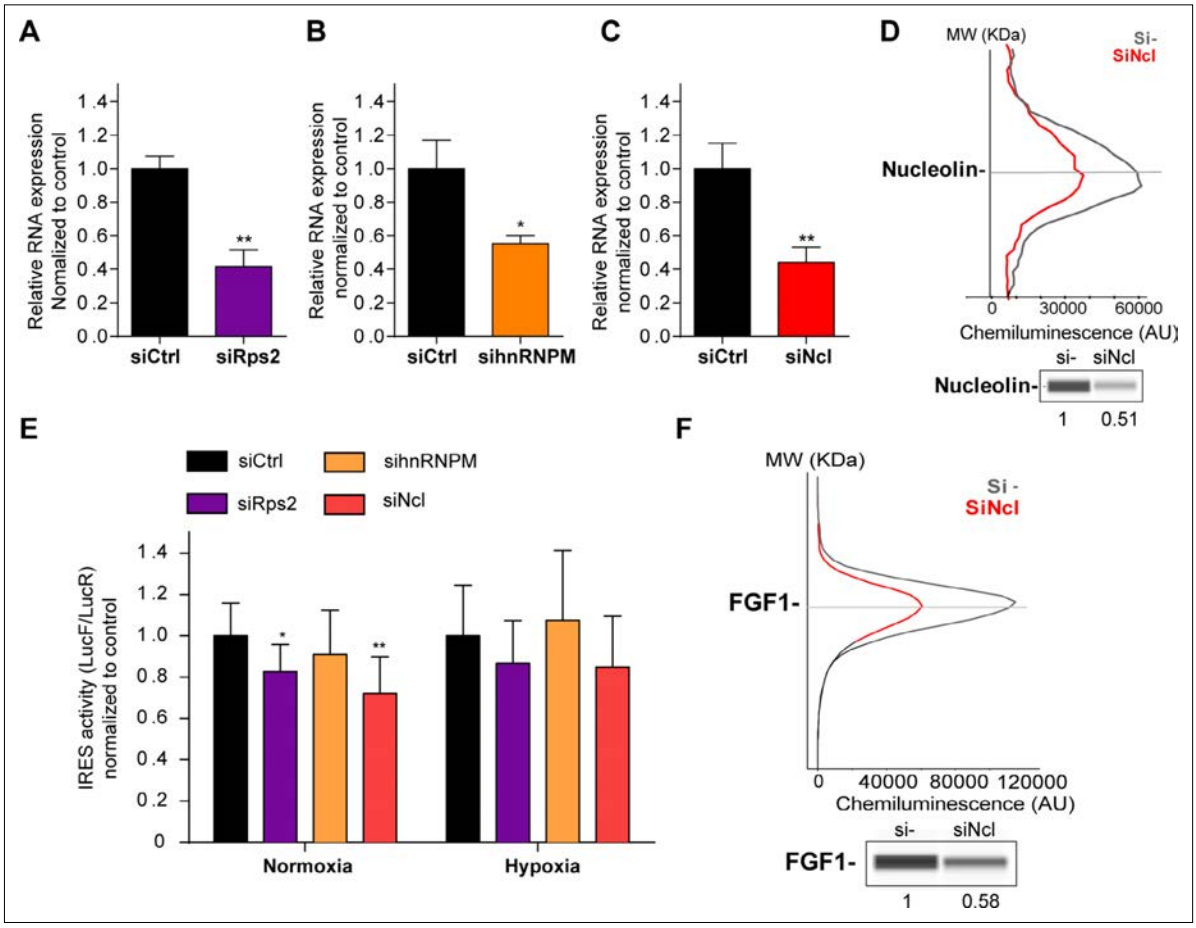


Figure 6. p54^{nrb}-interacting proteins, nucleolin and RPS2, control the *FGF1* IRES activity. (**A–C**) Quantification of RPS2 (**A**), hnRNPM (**B**) and nucleolin (**C**) RNA expression in HL-1 cells transfected with siRNAs against *Rps2*, hnRNPM or nucleolin mRNA, respectively. RNA expression was measured by RT-qPCR and normalized to control siRNA. One representative experiment is shown with n=3 biological replicates. Student two-tailed t-test was performed with n=3 or Mann-Whitney test with n=9; *p<0.05, **p<0.01, ***<0.001, ****p<0.0001. (**D**) Capillary Simple Western of nucleolin following nucleolin knock-down. The full raw unedited gel is provided in ***Figure 6—figure supplement 1A*** (***Figure 6—figure supplement 1—source data 1***). (**E**) *FGF1* IRES activity with knock-down by siRNA interference of candidate ITAF nucleolin in HL-1 in normoxia or hypoxia 1% O_2 was performed as in ***Figure 2***. The IRES activity values have been normalized to the control siRNA. Histograms correspond to means ± standard deviation of the mean, with a non-parametric Mann-Whitney test *p<0.05, **p<0.01. The mean has been calculated with nine cell culture biological replicates, each of them being already the mean of three technical replicates (27 technical replicates in total but the M-W test was performed with n=9). Detailed values of biological replicates are presented in ***Supplementary file 6***. (**F**) Capillary Simple Western of endogenous FGF1 following nucleolin knock-down. Histograms correspond to means ± standard deviation. The source data or capillary Simple Western are provided in ***Figure 1—figure supplement 1B*** (***Figure 6—figure supplement 1—source data 1***).

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 6:

Figure supplement 1. Endogenous FGF1 protein expression is down-regulated following nucleolin knock-down.

Figure supplement 1—source data 1.

present in the p54^{nrb} nuclear interactome, nucleolin and RPS2. *Neat1* appears as the key to this paraspeckle-related activation of translation in response to hypoxia. This lncRNA is an activator of all cellular IRESs tested, but not of the viral EMCV IRES. More broadly, *Neat1* isoforms impact the recruitment into polysomes of most IRES-containing mRNAs and several families of mRNAs involved in the response to hypoxia. The colocalization of IRES-containing mRNA with *Neat1* RNA in paraspeckles increased in hypoxia conditions, suggesting that the paraspeckle may be a recruitment platform for

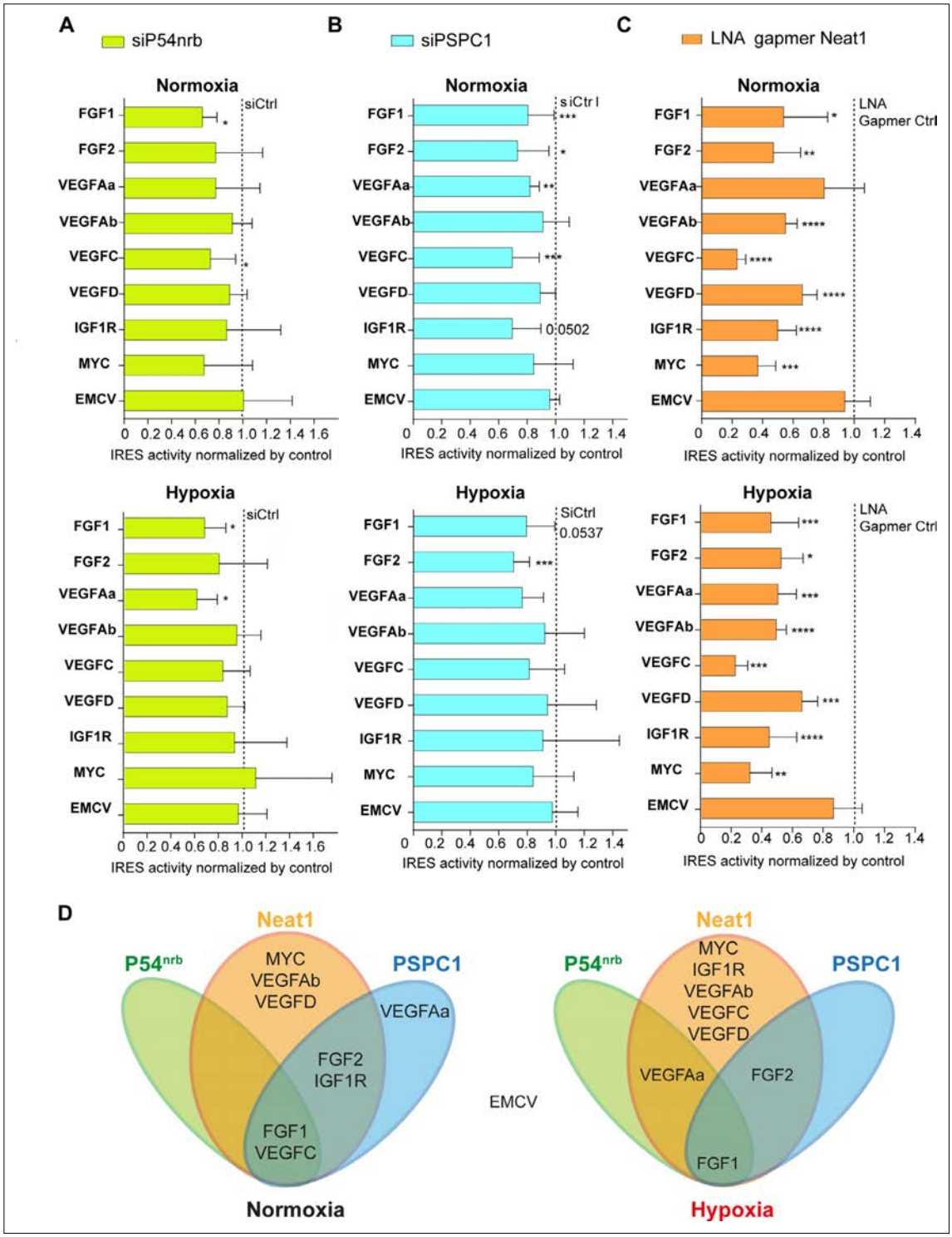


Figure 7. *Neat1* is the key activator of (lymph)angiogenic and cardioprotective factor mRNA IRESs. (**A–C**) HL-1 subjected to normoxia or 1% O_2 hypoxia were transduced by Lucky Luke bicistronic lentivectors with *FGF1, FGF2, VEGFAa, VEGFAb, VEGFC, VEGFD, IGF1R, MYC,* or EMCV IRES, then the knock-down of p54^{nrb}(A) PCPC1 (**B**) and *Neat1* (**C**) was performed as in ***Figure 2*** and ***Figure 4***. IRES activities were measured and normalized to activities in normoxia. IRES activity in normoxia is represented by a dotted line at 1. Histograms correspond to means ± standard deviation, and Mann-Whitney

Figure 7 continued on next page

Figure 7 continued

test with n=9 or n=12 for *FGF1* IRES; *p<0.05, **p<0.01, ***<0.001, ****p<0.0001. For each IRES the mean has been calculated with nine cell culture biological replicates, each of them being already the mean of three technical replicates (27 technical replicates in total). Detailed values of biological replicates are presented in ***Supplementary file 3***, ***Supplementary file 5***, ***Supplementary file 6***. (**D**) Schema depicting groups of IRESs regulated by *Neat1*, PSPC1, or P54^{nrb} in normoxia or hypoxia.

IRES-containing mRNAs during stress and that the IRESome could be assembled in the paraspeckle before mRNA export from the nucleus (***Figure 9***).

It may be noted that the inhibition of IRES activities resulting from ITAF depletion is quite moderate for the different proteins while stronger for the lncRNA *Neat1*. This cannot be explained only by differences in knock-down efficiency. We hypothesize is that several proteins are present in the IRESome complex and that there may be a certain redundancy between them. Thus, the depletion of a single ITAF would not be sufficient to abolish the IRES activity completely. Also, to explain why paraspeckle ITAFs such as p54^{nrb} and PSPC1 do not inhibit all the IRESs, we propose that the paraspeckle IRESome protein composition varies depending on the IRES and the hypoxic or normoxic condition, while *Neat1* remains the main actor of the process. Several observations suggest that *Neat1_2* may be the main isoform involved. However, the knock-down of *Neat1-2* isoform with a specific gapmer does not affect IRES activity as much as the knock-down of both Neat1 isoforms (***Figure 2—figure supplement 2***). We were not successful in knocking down the isoform Neat1_1, as its sequence is entirely contained in *Neat1_2*. Thus at this stage we conclude that the two isoforms are probably involved. The fluidigm PCR array suggests that they may affect translation differently (***Figure 8***).

We searched for an ITAF able to regulate a set of IRESs during hypoxia and found the lncRNA *Neat1* as a wide activator of IRES-dependent translation. However, our data show that *Neat1* also regulates IRES activities both in normoxia and hypoxia. One explanation may be that *Neat1* is already expressed in normoxia in HL-1 cells, which are transformed cells despite their cardiomyocyte beating phenotype (***Claycomb et al., 1998***). Although *Neat1* expression and paraspeckle number increase in response to hypoxia, a significant percentage of cells already contain paraspeckles in normoxia, which may explain why IRESs are already active in normoxia. It has been reported that *Neat1_2* is not expressed in all tissues in vivo, whereas it is found in all transformed or immortalized cell lines (data not shown) (***Nakagawa et al., 2011***). In concordance with this observation, previous reports show that cellular IRESs are active in all cultured cell lines while inactive or tissue-specific in mice (***Créancier et al., 2000***; ***Créancier et al., 2001***). The presence of paraspeckles in normoxia may also reflect the stress due to the transfection procedure, which could interfere with the effect of the hypoxic stress performed in our study. A different approach to obtain *Neat1* silencing, such as CRISPR/Cas9 mediated knock-down or knock-out could provide an interesting solution to this issue.

Our data contrast with the study of Shen et al. who showed that *Neat1* depletion allows redistributing p54^{nrb} and SFPQ/PSF onto the *MYC* mRNA, in correlation with an increase in MYC protein (***Shen et al., 2017***). Several reasons may explain this lack of concordance. Firstly, different cell lines were used: HL-1 cardiomyocytes and 67NR breast tumor cells in the present study, HeLa and MCF7 tumor cells in the report by Shen et al. The regulation of IRES-dependent translation varies depending on cell lines. Secondly, they worked with human cell lines while our report is focused on mouse cells. In human, *MYC* expression is different from mouse as the *MYC* gene contains an additional upstream promoter, P0, which generates a longer transcript with a second IRES (***Nanbru et al., 2001***). Thirdly, they have not directly analyzed the *MYC* IRES activity but only the binding of p54^{nrb} and SFPQ to the *MYC* endogenous mRNA. Moreover an increase in myc protein expression does not necessarily correspond to increased IRES activity as the *MYC* mRNA is also translated by the cap-dependent mechanism (***Nanbru et al., 1997***). Taken together, the two studies are different rather than discordant.

A surprising result has been finding a ribosomal protein, RPS2, in the nuclear p54^{nrb} interactome. This suggests an extra-ribosomal role of this protein. Its interaction with p54^{nrb} favors the hypothesis that RPS2 would impact the IRES activity as an IRESome component in the paraspeckle. The presence of nucleolin in the complex also suggests a link of paraspeckle with nucleolus and ribosome biogenesis. Supporting this, PSPC1 was first identified in the nucleolus proteome (***Fox et al., 2002***). The nuclear binding of specific ribosomal proteins to IRESs might be a mechanism for forming specialized ribosomes.

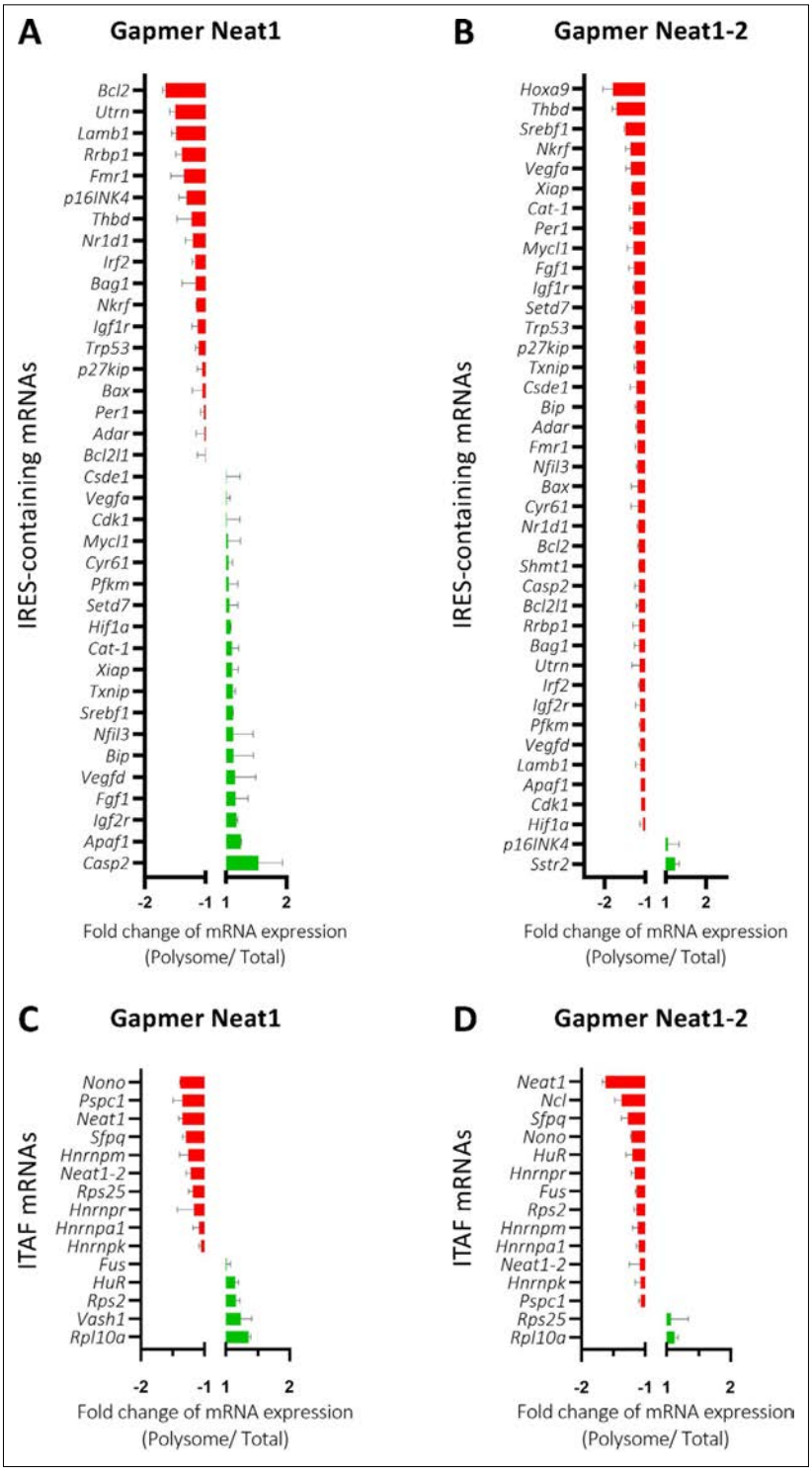


Figure 8. *Neat1_2* knock-down down-regulates translation of most IRES-containing RNAs as well as mRNAs coding ITAFs. HL-1 cardiomyocytes were transfected with gapmer *Neat1*, *Neat1_2*, or control. Polysomes were purified on sucrose gradient as described in Star Methods. The polysome profile is presented in ***Figure 8—figure supplement 1***. RNAs were purified from cytoplasmic extracts and from pooled polysomal fractions and analyzed

Figure 8 continued on next page

Figure 8 continued

on a Fluidigm deltagene PCR array from two biologicals replicates (cell culture dishes and cDNAs), each of them measured in three technical replicates (PCR reactions) (***Supplementary file 8***). IRES-containing mRNAs (**A–B**) and ITAF mRNA levels in polysomes (**C–D**) polysomal RNA/ total RNA were analyzed. Relative quantification (RQ) of mRNA level was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method with normalization to GAPDH mRNA and to HL-1 tranfected by gapmer control, and is shown as fold change of repression (red) or induction (blue).

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 8:

Figure supplement 1. Polysome profiles of HL-1 cardiomyocytes treated by gapmer *Neat1* or *Neat1_2*, compared to gapmer control.

Figure supplement 2. Effect of *Neat1* and *Neat1_2* knock-down on translation of mRNAs coding angiogenic and cardioprotective factors.

Neat1 is not the first lncRNA to exhibit an ITAF function. The lncRNA TP53-regulated modulator of p27 (*TRMP*) has been recently described as an ITAF of the *Cdkn1b/p27^{kip}* IRES (***Yang et al., 2018***). TRMP inhibits the *p27^{kip}* IRES activity by competing with the IRES for pyrimidine tract binding protein (PTB) binding and prevents IRES activation mediated by PTB. Also, the lncRNA *ARAP-as1* directly interacts with SFPQ, which results in release of PTB and activation of *MYC* IRES (***Zhang et al., 2020***). We have not yet deciphered the mechanism of action of *Neat1*. We propose that the paraspeckle would be a recruitment platform for IRES-containing mRNAs. *Neat1*, by interacting with p54^{nrb} and other paraspeckle proteins/ITAFs, would thus allow IRESome formation in the paraspeckle (***Figure 9***). Is the role of *Neat1* exclusively nuclear in the paraspeckle, or is it exported to the cytoplasm with the IRESome complex? Several observations argue for the presence of *Neat1* in the cytoplasm: our FISH experiments clearly identify the *Neat1-2* isoform in the cytoplasm (***Figure 1—figure supplement 2***), while a recent report shows that *Neat1-1* isoform is released from nucleus to cytoplasm where it suppresses the Wnt signaling in leukemia stem cells and acts as a tumor suppressor in acute myeloid leukemia (***Yan et al., 2021***). *Neat1-2* isoform has been detected in the cytoplasm of hematopoietic cells by other authors. Interestingly, they identified a histone modifier, ASXL1, interacting with p54^{nrb}/NONO and involved in paraspeckle formation. Mutation of ASXL1 generates *Neat1_2* export to the cytoplasm (***Yamamoto et al., 2021***). Furthermore, the role of cytoplasmic *Neat1* in translation is suggested by our previous data showing that *Neat1* is present in HL-1 cell polysomes and that this association with polysomes is increased in early hypoxia (***Hantelys et al., 2019***). The involvement of *Neat1* in translation control via a cytoplasmic location is also supported by the presence of the triple helix in the 3'UTR of *Neat1_2*, whose role in translation activation has been demonstrated (***Wilusz et al., 2012***).

The model of IRESome formation mediated by *Neat1* in the paraspeckle, and the absence of any impact of *Neat1* on the picornaviral EMCV IRES activity, are both consistent with previous reports suggesting that the site of mRNA synthesis is crucial for IRES structure and function (***Semler and Waterman, 2008***). For picornaviruses whose mRNAs are synthesized in the cytoplasm, IRES elements would be able to form an IRESome RNP in the cytoplasm. In contrast, cellular mRNAs (as well as DNA viruses and retroviruses mRNAs) transcribed in the nucleus need a nuclear event (***Ainaoui et al., 2015***; ***Stoneley et al., 2000***). The present data provide a mechanism for this nuclear history and reveal a new function of the paraspeckle, a nuclear body, in IRESome formation (***Figure 9***).

A role of *Neat1* in ischemic heart has been recently reported showing that *Neat1* down-regulation would protect cardiomyocytes from apoptosis by regulating the processing of pri-miR-22 (***Gidlöf et al., 2020***). Surprisingly, these authors show that hypoxia down-regulates *Neat1* expression in cardiomyocytes. This contradicts our data showing that *Neat1* is induced by hypoxia. Our data are however in agreement with the rest of the literature showing that Neat1 is induced by hypoxia in tumors, its transcription being activated by HIF-2 (***Choudhry et al., 2015***). Another study also showed that *Neat1* overexpression protects cardiomyocytes against apoptosis by sponging miR125a-5p, resulting in upregulation of the apoptosis repressor gene B-cell lymphoma-2-like 12 (BCL2L12) (***Yan et al., 2019***). These contradictory reports highlight the complex impact of *Neat1* on miRNA-mediated gene regulation.

In the present study, we have uncovered a novel role of *Neat1* in the translational control of several families of genes involved in stress response, angiogenesis and cardioprotection, while it does not affect global translation. The increased protein synthesis from mRNAs coding ITAFs favors a wide

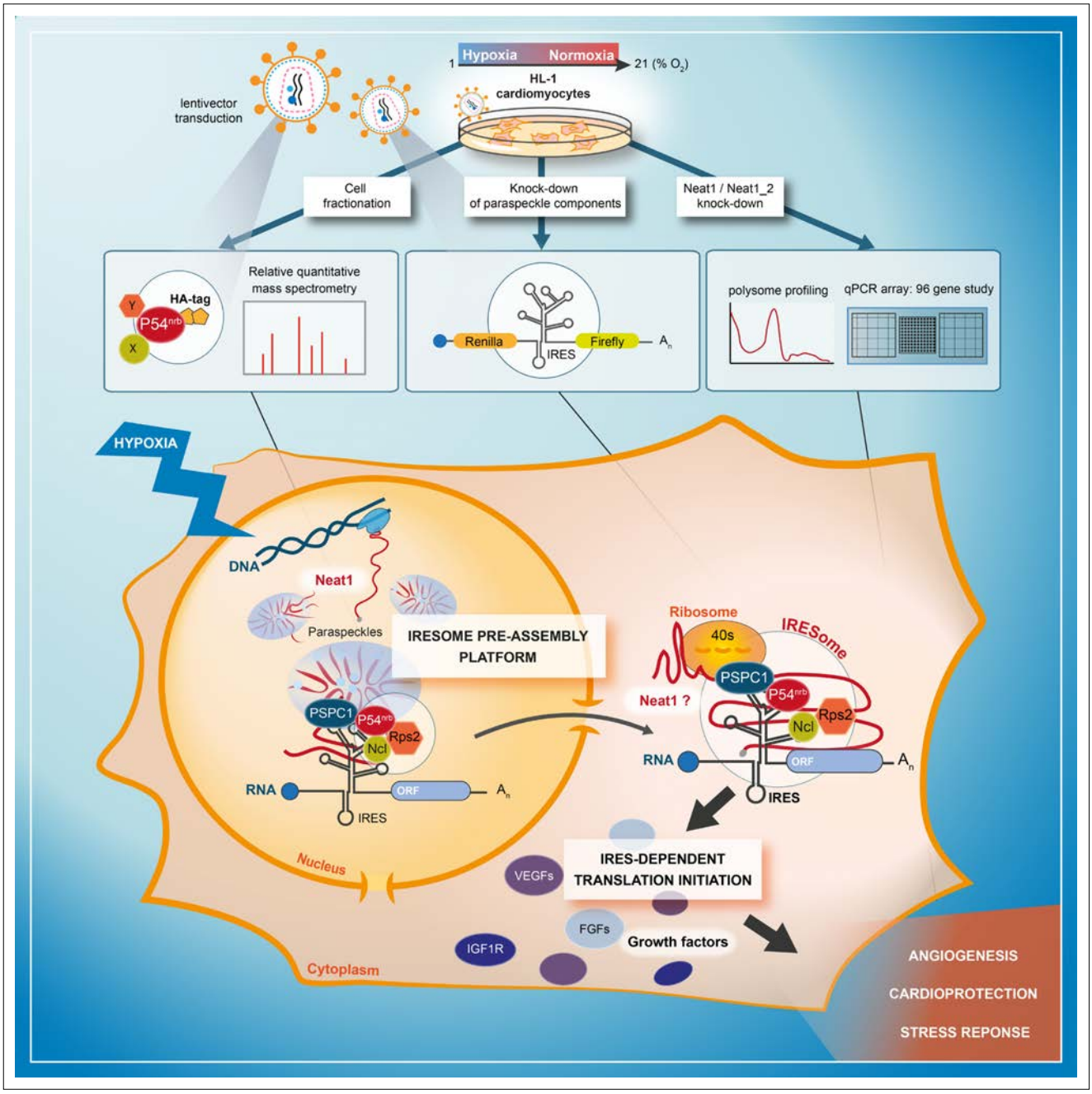


Figure 9. Model of IRESome formation in the paraspeckle. According to the present data, we propose that the paraspeckle may be a recruitment platform for IRES-containing mRNAs in hypoxic cardiomyocytes. *Neat1* and proteins present in the paraspeckle (among them major paraspeckle components such as $p54^{nrb}$ and PSPC1) would assemble the IRESome, then mRNA would be exported from the nucleus and translated in the cytosol. Identification of Neat1 in the cytoplasm suggests that it might be part of the IRESome and have a direct role in translation. However this latter hypothesis remains to be elucidated.

role of *Neat1* and of the paraspeckle in activating IRES-dependent translation. Many of the genes involved in angiogenesis or cardioprotection tested here have not been described as containing an IRES in their mRNAs. We can make the hypothesis that these mRNA families either contain IRESs that have not been identified yet, or are translated by another cap-independent mechanism such as m6A-induced ribosome engagement sites (MIRES) (***Prats et al., 2020***).

Neat1, as a stress-induced lncRNA, plays a role in many pathologies including cancer and ischemic diseases, thus its central role in the translational control of expression of genes involved in tissue revascularization and cell survival makes it a potential therapeutic target of great interest.

Materials and methods

Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Antibody	Anti-P54nrb (rabbit polyclonal)	Santacruz	Sc-67016	Dilution 1:200 (capillary Western) Dilution 1:400 (classical Western)
Antibody	Anti-PSPC1 (rabbit polyclonal)	bethyl laboratory	A303-205A	Dilution 1:100 (capillary Western) Dilution 1:1000 (classical Western)
Antibody	Anti-SFPQ (mouse monoclonal)	Abcam	Ab11825	Dilution 1:100
Antibody	Anti-FGF1 (rabbit polyclonal)	Abcam	Ab207321	Dilution 1:25
Antibody	Anti-nucleolin (rabbit polyclonal)	Novus biological	NB600-241	Dilution 1:50
Antibody	Anti-Histone H3 (rabbit polyclonal)	Cell Signaling	4499	Dilution 1 : 10000
Antibody	Anti-GAPDH (mouse monoclonal)	SantaCruz	Sc-32233	Dilution 1:1000
Antibody	Mouse total IgG (mouse polyclonal)	Sigma	I5381	2 mg/mL
Antibody	Anti-eIF2α (rabbit polyclonal)	Cell Signaling Technology	9721	Dilution 1:50
Antibody	Anti-phospho-eIF2α (mouse monoclonal)	Cell Signaling Technology	2103	Dilution 1:50
Antibody	Anti-p21 (mouse monoclonal)	Santacruz	Sc-6246	Dilution 1:50
Antibody	Anti-HA (mouse monoclonal)	Sigma	H9558/H3663	2.4 mg/mL (72 µg)
Antibody	Anti-rabbit-peroxidase conjugate (donkey polyclonal)	Jackson ImmunoResearch	711-035-152	Dilution 1:10000
Antibody	Anti-mouse-peroxidase conjugate (rabbit polyclonal)	Jackson ImmunoResearch	715-035-150	Dilution 1:10000
Antibody	Rabbit detection module	Protein Simple	DM-001	10 µl
Antibody	Mouse detection module	Protein Simple	DM-002	10 µl
Strain, strain background (*Escherichia coli*)	Top10	InVitrogen	C404003	

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Strain, strain background (*Escherichia coli*)	Strataclone	Agilent technologies	200185	
Chemical compound, drug	TRI-Reagent	MRC Inc	TR118	
Chemical compound, drug	Isopropanol	Sigma-Aldrich	33539	
Chemical compound, drug	Ethanol	Sigma-Aldrich	32221	
Chemical compound, drug	Digitonin	Sigma-Aldrich	D141	
Chemical compound, drug	NP40 (IGEPAL 630)	Sigma-Aldrich	I8896	
Chemical compound, drug	EDTA	Euromedex	EU0084-A	
Chemical compound, drug	Proteinase inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich	P2714	
Chemical compound, drug	RNAse inhibitor	AppliedBiosystem	N8080119	
Chemical compound, drug	Formamide	Invitrogen	15515026	
Chemical compound, drug	Paraformaldehyde 16%	Electron Microscopy Science		
Chemical compound, drug	SSC saline-sodium citrate buffer	Euromedex	EU0300-C	
Chemical compound, drug	RIPA	BioBasic	RB4476	
Peptide, recombinant protein	HA peptides	Sigma-Aldrich	I2149	
Commercial assay or kit	Premix Ex Taq II	Takara	RR820B	
Commercial assay or kit	EZ view red protein G beads	Sigma	E3403	
Commercial assay or kit	DG32 cartridge	Bio-Rad	#1864108	
Commercial assay or kit	QX200 ddPCR EvaGreen Supermix	Bio-Rad	1864034	
Commercial assay or kit	High capacity cDNA Reverse transcription kit	Thermofisher	4368814	
Commercial assay or kit	NucleoBond Xtra Maxi kits	Macherey-Nagel	740414.10	
Commercial assay or kit	EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit	BioBasic	BS413	
Commercial assay or kit	StrataClone Blunt PCR Cloning Kit	Agilent	240207	
Commercial assay or kit	Dual-Luciferase Reporter Assay system	Promega	E1980	
Commercial assay or kit	Jess or Wes Separation Module	ProteinSimple	SM-SW004	

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Commercial assay or kit	Fluorescent 5 x Master Mix 1	ProteinSimple	PS-FL01-8	
Cell line (*Homo-sapiens*)	293 FT	Invitrogen	R700-07	
Cell line (*Homo-sapiens*)	HT1080	ATCC	CCL-121	
Cell line (*Mus musculus*)	HL-1	(**Claycomb et al., 1998**) / Sigma-Aldrich	SCC065	Beating cardiomyocytes (**Video 1**)
Sequence-based reagent	NEAT1	This paper	PCR primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	FGF1	This paper	PCR primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	NEAT1_2	This paper	PCR primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	HPRT	This paper	PCR primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	RPL11	This paper	PCR primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	18 S	**Hantelys et al., 2019**	PCR primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	SFPQ	This paper	PCR primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	P54nrb	This paper	PCR primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	PSPC1	This paper	PCR primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	NUCLEOLIN	This paper	PCR primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	RPS2	This paper	PCR primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	HNRNPM	**Hantelys et al., 2019**	PCR primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	Fluidigm deltagene probes	This paper	PCR primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	*Neat1* and *Neat1_2* FISH probes	This paper	Hybridization probes	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	SmiFISH secondary probes (FLAP X-Cy3 and FLAP-Y-Cy5)	This paper	Hybridization probes	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	SmiFISH Neat1 primary probes	This paper	Hybridization probes	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	SmiFISH bicistronic Lucky Luke mRNA primary probes	This paper	Hybridization probes	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	HA-p54^{nrb}	This paper	Cloning primers	**Supplementary file 2**
Sequence-based reagent	miR-Neat1-G2	This paper	Cloning primers	**Supplementary file 2**

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Sequence-based reagent	miR-Neat1_2-G6	This paper	Cloning primers	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	miR-Neat1_2-G7	This paper	Cloning primers	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	P54nrb mouse	Dharmacon E-048587-01-0005	siRNA smartpool	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	PSPC1 mouse	Dharmacon E-049216-00-0005	siRNA smartpool	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	SFPQ mouse	Dharmacon E-044760-00-0005	siRNA smartpool	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	Nucleolin mouse	Dharmacon E-059054-00-0005	siRNA smartpool	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	Rps2 mouse	Dharmacon E-049205-00-0005	siRNA smartpool	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	hnRNPM mouse	Dharmacon E-044465-00-0005	siRNA smartpool	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	siRNA non-targeting control	Dharmacon D-001910-10-20	siRNA	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	NEAT1 A	LG00218175	LNA gapmer	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	NEAT1 B	LG00218176	LNA gapmer	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	NEAT1 C	LG00218177	LNA gapmer	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	NEAT1 D	LG00218178	LNA gapmer	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	NEAT1_2	LG00234548	LNA gapmer	***Supplementary file 2***
Sequence-based reagent	NEGATIVE CONTROL	LG00000002	LNA gapmer	***Supplementary file 2***
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRHL+	Sequence available on Dryad, (2)	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.nvx0k6dq7
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRF1AL+	Sequence available on Dryad, (17; 26)	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.nvx0k6dq7
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRFL+	Sequence available on Dryad, (25)	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.nvx0k6dq7
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRVAaL+	Sequence available on Dryad, (16)	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.nvx0k6dq7
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRVAbL+	Sequence available on Dryad, (16)	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.nvx0k6dq7
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRhVCL+	Sequence available on Dryad, (2)	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.nvx0k6dq7
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRhVDL+	Sequence available on Dryad, (13)	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.nvx0k6dq7
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRMP2L+	Sequence available on Dryad, (42)	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.nvx0k6dq7
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CREL+	Sequence available on Dryad, (25)	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.nvx0k6dq7

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRIGL+	This paper	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.m0cfxpp75
Recombinant DNA reagent	pCMV-dR8.91	Addgene	Plasmid for lentivector production	
Recombinant DNA reagent	pCMV-VSV-G	Addgene	Plasmid for lentivector production	
Recombinant DNA reagent	pTRIP-Neat1-miR-G2	This paper	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.m0cfxpp75
Recombinant DNA reagent	pTRIP-Neat1_2-miR-G6	This paper	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.m0cfxpp75
Recombinant DNA reagent	pTRIP-Neat1_2-miR-G7	This paper	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.m0cfxpp75
Recombinant DNA reagent	pTRIP-HA2-P54nrb	This paper	SIN lentivector plasmid	doi:10.5061/dryad.m0cfxpp75
Software, algorithm	Prism 6	Graphpad	Software to perform statistics	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/
Software, algorithm	Excel 2007	Microsoft office	Software to perfom graphs and tables	
Software, algorithm	FIJI	FIJI	Software for image analysis	https://fiji.sc/
Software, algorithm	ImageJ	ImageJ/NIH	Software for image analysis	https://imagej.nih.gov/ij/download.html
Software, algorithm	Zen black/Blue edition	Zeiss	Microscope software	https://www.zeiss.fr/microscopie/produits/microscope-software/zen-lite.html
Software, algorithm	QuantStudio	AppliedBiosystems	Quantification software	https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/global/forms/life-science/quantstudio-3-5-software.html
Software, algorithm	QuantaSoft 1.7.4	Bio-Rad	Western blot quantification software	https://www.bio-rad.com/fr-fr/sku/1864011-quantasoft-software-regulatory-edition?ID=1864011
Software, algorithm	Microwin 2000	Berthold	Microplaque testing software	https://fr.freedownloadmanager.org/Windows-PC/MikroWin-2000.html
Software, algorithm	LSM780 Zeiss confocal microscope	Zeiss	Microscope software	N/A
Software, algorithm	Compass for SW	Protein Simple	Capillary Western software	N/A

Lead contact and materials availability

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Anne-Catherine Prats (anne-catherine.prats@inserm.fr).

Experimental model and subject details

Cell lines

Female human embryonic kidney cells HEK-293FT (Invitrogen R700-07) and male human fibrosarcoma HT1080 cells (ATCC CCL-121) were cultured in DMEM-GlutaMAX +Pyruvate (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), and MEM essential and non-essential amino acids (Sigma-Aldrich). They were characterized by the supplier, then by their capacity to be transfected efficiently to produce and titrate lentivectors. Female mouse atrial HL-1 cardiomyocytes (Sigma-Aldrich SCC065) were extensively characterized by the supplier and by ourselves, by their beating phenotype (***Video 1***). They were cultured in Claycomb medium containing 10% FBS, Penicillin/Streptomycin (100 U/mL-100µg/mL), 0.1 mM norepinephrine, and 2 mM L-Glutamine. Cell culture flasks were precoated with a solution of 0.5% fibronectin and 0.02% gelatin for 1 hr overnight

at 37 °C (Sigma-Aldrich). To keep HL-1 phenotype, cell culture was maintained as previously described (***Claycomb et al., 1998***). All cells were cultured in a humidified chamber at 37 °C and 5% CO_2. When subjected to hypoxia, cells were incubated at 37 °C under 1% O_2. All cell types were tested negative for mycoplasma contamination every three months with the MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza).

Bacterial strains

- Top 10 *Escherichia coli* (InVitrogen, thermofisher scientific C404003)
- Strataclone *Escherichia coli* (Agilent technologies, 200185)

These cells were stored at –80 °C and grown in LB medium at 37 °C. Top10 cells were used for plasmid amplification of pTRIP lentivector. Strataclone cells were used for recombination and amplification of PCR product into pSC-B-amp/kan plasmid.

Method details

Cell transfection

siRNA treatment on transduced cells was performed 72 hr after transduction (and after one cell passage) in 24-well plates for reporter activity assay or 12 well plates for gene expression experiments. HL-1 were transfected by siRNAs as follows: one day after being plated, cells were transfected with 10 nM of small interference RNAs from Dharmacon Acell SMARTpool targeting $P54^{nrb}$, PSPC1, SFPQ, hnRNPM, Nucleolin, RPS2, or non-targeting siRNA control (siControl), using INTERFERin (Polyplus Transfection) according to the manufacturer's recommendations, in DMEM-GlutaMAX +Pyruvate media without penicillin-streptomycin. The media was changed 24 hr after transfection and the cells were incubated 72 hr for the time of transfection at 37 °C with siRNA. For *Neat1* knock-down, HL-1 cells were transduced with a pool of 4 gapmers (Qiagen) at 40 nM (10 nM each) and incubated 48 hr after transfection, proceeded essentially as described above (siRNA and gapmer sequences are provided in ***Supplementary file 2***).

Cell transduction

For lentivector transduction, HL-1 cardiomyocytes were plated into a T25 flask and transduced overnight in 2.5 mL of transduction medium (OptiMEM-GlutaMAX, Life Technologies SAS) containing 5 µg/mL protamine sulfate in the presence of lentivectors (MOI 2). HL-1 cells were transduced with an 80–90% efficiency in the mean.

Lentivector construction

Bicistronic lentivectors coding for the renilla luciferase (LucR) and the stabilized firefly luciferase Luc+ (called LucF in the text) were constructed from the dual luciferase lentivectors described previously, which contained Luc2CP (***Morfoisse et al., 2014***; ***Morfoisse et al., 2016***). The LucR gene used here is a modified version of LucR where all the predicted splice donor sites have been mutated. The cDNA sequences of the human *FGF1, –2, VEGFA, -C, -D, MYC* and EMCV IRESs were introduced between the first (LucR) and the second cistron (LucF) (***Giraud et al., 2001***; ***Nanbru et al., 1997***; ***Prats et al., 2013***; ***Vagner et al., 1995***). IRES sequence sizes are: 430 nt (*FGF1*), 480 nt (*FGF2*), 302 nt (*VEGFAa*), 485 nt (*VEGFAb*), 419 nt (*VEGFC*), 507 nt (*VEGFD*), 363 nt (*c-MYC*), 640 nt (EMCV), 973 nt (rat *IGF1R*) (***Huez et al., 1998***; ***Martineau et al., 2004***; ***Morfoisse et al., 2014***; ***Morfoisse et al., 2016***; ***Nanbru et al., 1997***; ***Vagner et al., 1995***). The two IRESs of the *VEGFA* mRNA have been used and are called *VEGFA*a and *VEGFA*b, respectively (***Huez et al., 1998***). The hairpin negative control contains a 63 nt long palindromic sequence cloned between LucR and LucF genes (***Hantelys et al., 2019***). This control has been successfully validated in previous studies (***Créancier et al., 2000***; ***Morfoisse et al., 2014***). The expression cassettes were inserted into the SIN lentivector pTRIP-DU3-CMV-MCS vector described previously (***Prats et al., 2013***). All cassettes are under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter. The lentivectors coding artificial miRNAs miR-Neat1 and miR-*Neat1_2* were constructed by inserting double-stranded oligonucleotides targeting *Neat1* or *Neat1_2*, according to a protocol adapted from the BLOCK-iT technology of Life Technologies (sequences provided in ***Supplementary file 2***). The lentivector coding $HA\text{-}p54^{nrb}$ was obtained by amplifying the p54 cDNA by PCR with a forward primer containing the sequence of two HA motifs. The resulting fragment was

cloned into the pTRIP vector. Plasmid construction and amplification were performed in the bacteria strain TOP10 (Thermofisher Scientific, Illkirch Graffenstaden, France). Vector sequences are available on Dryad (doi:10.5061/dryad.nvx0k6dq7 or doi:10.5061/dryad.m0cfxpp75).

Lentivector production

Lentivector particles were produced using the $CaCl_2$ method based by tri-transfection with the plasmids pCMV-dR8.91 and pCMV-VSVG, $CaCl_2$ and Hepes Buffered Saline (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), into HEK-293FT cells. Viral supernatants were harvested 48 hr after transfection, passed through 0.45 µm PVDF filters (Dominique Dutscher SAS, Brumath, France), and stored in aliquots at –80 °C until use. Viral production titers were assessed on HT1080 cells with serial dilutions of a lentivector expressing GFP and scored for green fluorescent protein (GFP) expression by flow cytometry analysis on a BD FACSVerse (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

Reporter activity assay

For reporter lentivectors, luciferase activities were performed in vitro and in vivo were performed using Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France). Briefly, proteins from HL-1 cells were extracted with Passive Lysis Buffer (Promega France). Bioluminescence was quantified with a luminometer (Centro LB960, Berthold, Thoiry, France) from 9 to 12 biological replicates and with three technical replicates for each sample in the analysis plate.

FISH

HL-1 cells were cultured in 12-well plates on fibronectin-gelatin coated 15 mm coverglass 1.5 thickness (Menzel-Gläser). FISH probes were produced and purchased from Sigma-Aldrich, and delivered HPLC purified at 50 nmol. The 3/2 probes used per target (*Neat1* and *Neat1_2* isoform respectively) are between 38 and 40 mer long and are conjugated to one Cy3 through 5' amino acid modifications (see ***Supplementary file 2*** for sequences).

FISH was performed as previously described (http://www.singerlab.org/protocols). Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (electron microscopy science), rinsed twice, and permeabilized overnight in 70% ETOH. Then cells were pre-hybridized in a 15% formamide/2 X SSC buffer at room temperature. The hybridization reaction was performed overnight at 37 °C with a Mix of 2XSSC, 0.5 mg/mL yeast tRNA, 15% formamide, 10% dextran sulfate, and 10 ng of mixed probes. Then the coverslip was rinsed two times 10 min in 2 X SSC and 1XSSC for 10 min, before mounting on Moviol mounting medium supplemented with DAPI. Three-dimensional image stacks were captured on LSM780 Zeiss confocal microscope, camera lens x63 with Z acquisition of 0.45 µM, and Zen software (Zeiss).

SmiFISH

A set of target-specific primary probes was produced and purchased from Integrated DNA Technologies (IDT). Each probe carried an additional 28 nt-long sequence 'FLAP' which is not represented in either mouse or human genomes. The primary probes against bicistronic mRNA were complementary to the fluorescent secondary probe FLAP-X, and the primary probes Neat1 were complementary to the fluorescent secondary probe FLAP-Y. The two secondary probes FLAP-X and FLAP-Y were also from IDT, conjugated to fluorophores Cy3 and Cy5, respectively. All probe sequences are presented in ***Supplementary file 2***. SmiFISH was performed as previously described (***Tsanov et al., 2016***). Cells were grown to 80% confluence in six-well plates and subjected or not to 4 hr of hypoxia. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min (electron microscopy science) at room temperature, rinsed twice and permeabilized overnight in 70% ETOH. Cy3 and Cy5-labeled fluorescent FLAPs were pre-annealed to primary probes prior to in situ hybridization. Then cells were pre-hybridized with probes (40 pmol) in a 15% formamide/1 X SSC buffer at 37 °C. The hybridization reaction was performed overnight at 37 °C with Mix 1 (2XSSC, 25 µg/µL yeast tRNA, 100% formamide, FLAP-structured duplex (FLAP-Y duplex +FLAP X duplex) and H2O)+Mix 2 (20 mg/mL RNAse free BSA, 200 mM VRC, 40% dextran sulfate and H2O). Then the coverslip was rinsed five times in 1 X SSC 15% formamide mix at 37 °C and twice in PBS before mounting on Dako mounting medium supplemented with DAPI. Three-dimensional image stacks were captured on Zeiss Axiomager Z3 Apotome confocal microscope,

camera lens x63 with Z acquisition of 0.45 µM, and Zen software (Zeiss). For ***Figure 2***, images were analyzed with a script for ImageJ. For each segmented nucleus, spots were segmented by detecting local maxima after applying a laplacien filter. For ***Figure 3***, images were analyzed with IMARIS. For each image, spots were detected using the 'spot' function and the colocalization with the 'co-localize spots' function.

Western blot

Cells were harvested on ice, washed with cold PBS, and collected on RIPA buffer Biobasic supplemented with protease inhibitor (Sigma). Protein concentration was measured using BCA Protein Assay Kit (Interchim), and equal amounts of proteins were subjected to SDS-PAGE (TGX Stin Free Fast-Cast Acrylamid, 12%, Bio-Rad, 161–0185) and transferred onto nitrocellulose membrane (Transblot Turbo, Bio-Rad, 1704271). Membranes were washed in Tris-buffered saline supplemented with 0.05% Tween-20 and then saturated in Tris-buffered saline supplemented with 0.05% Tween-20 with 5% BSA, incubated overnight with primary antibodies in Tris-buffered saline supplemented with 0.05% Tween-20 with 5% BSA, washed and revealed with Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, 170–5060). Western blotting was conducted using standard methods with the following antibodies: Rabbit anti-PSPC1 (bethyl laboratory, A303-205A) diluted 1:1000, Rabbit anti-P54^{nrb} (Santacruz, sc67016) diluted 1/400, Rabbit Histone H3 (Cell Signaling, 4499) diluted 1/10000, mouse GAPDH (SantaCruz, SC32233) diluted 1/1000, secondary donkey anti-rabbit IgG antibody, Peroxidase Conjugated, (Jackson ImmunoResearch, 711-035-152) diluted 1:10000, secondary rabbit anti-mouse IgG antibody, Peroxidase Conjugated, (Jackson ImmunoResearch, 715-035-150) diluted 1:10000.

Capillary Western

Diluted protein lysate was mixed with fluorescent master mix and heated at 95 °C for 5 min. Three µL of protein mix (1 mg/mL maximal concentration) containing Protein Normalization Reagent, blocking reagent, wash buffer, target primary antibody (rabbit anti-eIF2α [Cell Signaling Technology 9721]) diluted 1:50, mouse anti-phospho-eIF2α [Cell Signaling Technology 2103] diluted 1:50, mouse anti-p21 antibody [Santacruz, sc-6246] diluted 1:50, rabbit anti-P54^{nrb} diluted 1:200 [Santacruz, sc-67016], rabbit anti-PSPC1 diluted 1:100 [bethyl laboratory, A303-205A], mouse anti-SFPQ diluted 1:100 [Abcam, Ab11825]; rabbit anti-FGF1 diluted 1:25 [Abcam Ab207321], rabbit anti-Nucleolin diluted 1:50 [Novus biological, NB600-241], secondary-HRP (ready to use rabbit or mouse 'detection module', DM-001 or αDM-002), and chemiluminescent substrate were dispensed into designated wells in a manufacturer-provided microplate. The plate was loaded into the instrument (Jess, Protein Simple) and proteins were drawn into individual capillaries on a 25 capillary cassette (12–230 kDa) (SM-SW004). Normalization reagent allow detecting total protein in the capillary through the binding of amine group by a biomolecule and to get rid of housekeeping protein that can arbor an inconsistent and unreliable expression. Graph plotted in Figures represent chemiluminescence value before normalization.

Measurement of protein half-life

To measure protein half-life, HL-1 cardiomyocytes were treated with cycloheximide (InSolution CalBioChem) diluted in PBS to a final concentration of 10 µg/mL in six-well plates. Time-course points were taken by stopping cell cultures after 0 hr, 30 min, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 8 hr, 16 hr, or 24 hr of incubation and subsequent capillary Western analysis of cell extracts.

RNA purification and cDNA synthesis

Total RNA extraction from HL-1 cells was performed using TRI Reagent according to the manufacturer's instructions (Molecular Research Center Inc, USA). RNA quality and quantification were assessed by a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). 750 ng RNA was used to synthesize cDNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, France). Appropriate no-reverse transcription and no-template controls were included in the qPCR assay plate to monitor potential reagent or genomic DNA contaminations, respectively. The resulting cDNA was diluted 10 times in nuclease-free water. All reactions for the PCR array were run in biological triplicates.

qPCR

7.5 ng cDNA were mixed with 2X TB green Premix Ex Taq II (Takara, RR820B), 10 µM forward and reverse primers, according to manufacturer instruction. qPCR reactions were performed on Viia7 (Applied Biosystems) and the oligonucleotide primers used are detailed in ***Supplementary file 2***. The reference genes were *Hprt*, *18* S and/or *Rpl11*.

ddPCR

ddPCR reaction for *Neat1* knock-down control were performed with the Bio-Rad system. The ddPCR reaction mixture (22 µl) contained 2 x QX200 ddPCR EvaGreen Supermix (no dUTP) (Bio-Rad), 2 µM of a mix of forward and reverse primers (***Supplementary file 2***), and 2/4/6 µL of cDNA depending on the target. The reaction mixture was transferred for droplet generation by AutoDG System (Bio-Rad) in individual wells of disposable DG32 Automated Droplet Generator Cartridges that were already placed in the cartridge holder. The droplet was generated by AutoDG System, between 15000–20000 droplets/well. The prepared droplet emulsions were further loaded in ddPCR 96-Well Plates (Bio-rad) by aspirating 40 µl from the DG32 cartridge by the AutoDG System. The plate was then heat sealed with pierceable foil using a PX1 PCR plate sealer 5 s at 180 °C (Bio-Rad), and PCR amplification was carried out in a T100 thermal cycler (Bio-Rad). The thermal consisted of initial denaturation at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s (denaturation) and 60 °C for 1 minute (annealing/elongation) with a ramp of 2 °C/s, a signal stabilization step at 4 °C 5 min followed by 90 °C 5 min. After PCR amplification the positive droplets were counted with a QX200 droplet reader (Bio-Rad).

Cell fractionation

HL-1 cells placed in normoxia or hypoxia and transduced by P54nrb-HA construct were trypsinized, rinsed with PBS and lysed in solution 1 (Hepes 50 mM/NaCl 150 mM pH7.3, digitonin (100 µg/mL), EDTA 1 mM, protease inhibitor cocktail) and incubated on ice. Then the lysate was centrifugated at 2000 g for 5 min and the supernatant (cytosolic fraction) was aliquoted. Then the pellet was rinsed in PBS, and incubated in solution 2 (Hepes 50 mM/NaCl 150 mM pH7.3, NP40 1%, EDTA 1 mM, protease inhibitor cocktail) during 30 min at 4 °C. After centrifugation at 7000 g, the pellet was rinsed and resuspended in solution 3 (Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1% (RIPA), protease inhibitor cocktail) and incubated for 10 min at 4 °C. Finally, the lysate was centrifuged for 10 min at 8200 g and the supernatant was aliquoted (nuclear fraction).

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation experiments were realized with 150 µg of total protein amounts from the cytosolic and nuclear fraction in normoxia or hypoxia, with a HA antibody (H9558/H3663, Sigma) 72 µg (2.4 mg/mL) or IgG mouse control (Sigma I5381) (2 mg/mL) using EZ view red protein G beads (Sigma). The beads-antibody-protein mix was incubated overnight at 4 °C and bounds protein were eluted with 35 µg HA peptides diluted in PBS (Sigma); then Laemmli buffer was added and the eluate heated at 95 °C 2 min.

In-gel trypsin digestion and mass spectrometry analysis

For mass spectrometry analysis, immunoprecipitated samples, prepared in triple or quadruple biological replicates for each condition, were submitted to an additional protein reduction in 24.5 mM dithiothreitol for 30 min at 56 °C followed by alkylation of cysteine residues in 74 mM iodoacetamide for 30 min in the dark at room temperature. Each reduced/alkylated sample was loaded onto 1D SDS-PAGE gel (stacking 4% and separating 12% acrylamide). For a one-shot analysis of the entire mixture, no fractionation was performed, and the electrophoretic migration was stopped as soon as the protein sample entered the separating gel. The gel was briefly stained using Quick Coomassie Blue (Generon). Each single slice containing the whole sample was excised and subjected to in-gel tryptic digestion using modified porcine trypsin (Promega, France) at 10 ng/µl as previously described (***Shevchenko et al., 1996***). The dried peptide extracts obtained were dissolved in 17 µl of 0.05% trifluoroacetic acid in 2% acetonitrile and analyzed by online nanoLC using an Ultimate 3000 RSLCnano LC system (Thermo Scientific Dionex) coupled to an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany) for data-dependent CID fragmentation experiments. Five µl of each

peptide extracts were loaded in two or three injection replicates onto 300 µm ID x 5 mm PepMap C18 pre-column (ThermoFisher, Dionex) at 20 µl/min in 2% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid. After 5 min of desalting, peptides were online separated on a 75 µm ID x 50 cm C18 column (in-house packed with Reprosil C18-AQ Pur 3 µm resin, Dr. Maisch; Proxeon Biosystems, Odense, Denmark), equilibrated in 95% of buffer A (0.2% formic acid), with a gradient of 5 to 25% of buffer B (80% acetonitrile, 0.2% formic acid) for 80 min then 25% to 50% for 30 min at a flow rate of 300 nL/min. The LTQ Orbitrap Velos was operated in data-dependent acquisition mode with the XCalibur software (version 2.0 SR2, Thermo Fisher Scientific). The survey scan MS was performed in the Orbitrap on the 350–1800 m/z mass range with the resolution set to a value of 60,000. The 20 most intense ions per survey scan were selected with an isolation width of 2 m/z for subsequent data-dependent CID fragmentation, and the resulting fragments were analyzed in the linear trap (LTQ). The normalized collision energy was set to 30%. To prevent repetitive selection of the same peptide, the dynamic exclusion duration was set to 60 s with a 10 ppm tolerance around the selected precursor and its isotopes. Monoisotopic precursor selection was turned on. For internal calibration the ion at 445.120025 m/z was used as lock mass.

MS-based protein identification

Acquired MS and MS/MS data as raw MS files were converted to the mzDB format using the pwiz-mzdb converter (version 0.9.10, https://github.com/mzdb/pwiz-mzdb) executed with its default parameters (***Bouyssié et al., 2015***). Generated mzDB files were processed with the mzdb-access library (version 0.7, https://github.com/mzdb/mzdb-access; ***Bouyssié et al., 2020***) to generate peak lists. Peak lists were searched against the UniProtKB/Swiss-Prot protein database with *Mus musculus* taxonomy (16,979 sequences) in the Mascot search engine (version 2.6.2, Matrix Science, London, UK). Cysteine carbamidomethylation was set as a fixed modification and methionine oxidation as a variable modification. Up to two missed trypsin/P cleavages were allowed. Mass tolerances in MS and MS/MS were set to 10 ppm and 0.6Da, respectively. Validation of identifications was performed through a false-discovery rate set to 1% at protein and peptide-sequence match level, determined by target-decoy search using the in-house-developed software Proline software version 1.6 (***Bouyssié et al., 2020***).

Polysomal RNA preparation

HL-1 cells were cultured in 150 mm dishes. Ten0 min before harvesting, cells were treated with cycloheximide at 100 mg/mL. Cells were washed with PBS at room temperature containing 100 mg/mL cycloheximide and harvested with Trypsin. After centrifugation at 500 g for 3 min at 4 °C, cells were washed two times in PBS cold containing 100 mg/mL cycloheximide, and cells were lysed by hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES-KOH Ph7.5; 10 mM KCl; 1.5 mM $MgCl_2$) containing 100 mg/mL cycloheximide. Cells were centrifuged at 500 g for 3 min and lysed by lysis solution containing hypotonic buffer, 1 mM DTT, 0.5 U/mL Rnasin, and protease inhibitor 100 X. Cells were centrifuged by two times, first at 1000 g for 10 min at 4 °C and second at 10,000 g for 15 min; the supernatants were collected and loaded onto a 10–50% sucrose gradient. The gradients were centrifuged in a Beckman SW41 Ti rotor at 39,000 rpm for 2.3 hr at 4 °C without a brake. Fractions were collected using a Foxy JR ISCO collector and UV optical unit type 11. RNA was purified from pooled heavy fractions containing polysomes (fractions 12–19) as well as from cell lysate before gradient loading.

qPCR fluidigm array

The DELTAgene Assay was designed by Fluidigm Corporation (San Francisco, USA). The qPCR-array was performed on BioMark with the Fluidigm 96.96 Dynamic Array following the manufacturer's protocol (Real-Time PCR Analysis User Guide PN 68000088). The list of primers is provided in ***Supplementary file 2***. A total of 25 ng of cDNA was preamplified using PreAmp Master Mix (Fluidigm,100–5581, San Francisco, USA) in the plate thermal cycler at 95 °C for 10 min, 16 cycles at 95 °C for 15 sec, and 60 °C for 4 min. The preamplified cDNA was treated with Exonuclease I in the plate thermal cycler at 37 °C for 30 min, 80 °C for 15 min and 10 °C infinity. The preamplified cDNA was mixed with 2 x TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 20 µM of mixed forward and reverse primers, and sample Loading Reagent (Fluidigm, San Francisco, USA). The sample was loaded into the Dynamic Array gene expression 96.96 IFC (Fluidigm San Francisco, USA). The qPCR

reactions were performed in the BioMark RT-qPCR system. Data were analyzed using the BioMark RT-qPCR Analysis Software Version 4.5.2.

GAPDH rRNA was used as a reference gene, and all data were normalized based on GAPDH rRNA level. Relative quantification (RQ) of gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. When the RQ value was inferior to 1, the fold change was expressed as –1/RQ. The oligonucleotide primers used are detailed in ***Supplementary file 2***.

Quantification and statistical analysis qPCR and ddPCR analysis

qPCR data were analyzed on Quantstudio (AppliedBiosystems). RPL11 or HPRT were used as reference gene. Relative quantification (RQ) of gene expression was calculated using the 2-ΔΔCT method. ddPCR data was analyzed using the QuantaSoft 1.7.4 software (Bio-Rad). HPRT was used as a reference gene, and Neat1 RNA expression was normalized by normoxia control and expressed in %.

Label-free quantitative proteomics analysis

For label-free relative quantification across samples, raw MS signal extraction of identified peptides was performed using Proline. The cross-assignment of MS/MS information between runs was enabled (it allows to assign peptide sequences to detected but non-identified features). Each protein intensity was based on the sum of unique peptide intensities and was normalized across all samples by the median intensity. Missing values were independently replaced for each run by its 5% quantile. After log2-transformation of the data, the values of the technical replicates were averaged for each analyzed samples. For each pairwise comparison, an unpaired two-tailed Student's t-test was performed. Proteins were considered significantly enriched when their absolute log2-transformed fold change was higher than 1 and their p-value lower than 0.05. To eliminate false-positive hits from quantitation of low-intensity signals, two additional criteria were applied: only the proteins identified with a total number of averaged peptide spectrum match (PSM) counts >4 and quantified in a minimum of two biological replicates, before missing value replacement, for at least one of the two compared conditions were selected. Volcano plots were drawn to visualize significant protein abundance variations between the two compared conditions. They represent -log10 (p-value) according to the log2 ratio. The complete list of proteins identified and quantified in immunopurified samples and analyzed according to this statistical procedure is described in ***Supplementary file 7***.

Dual luciferase system

Data were analyzed on MicroWin 2000. Background noise was measured with non-transduced cell samples and removed from transduced cell sample measurement. Then LucF/LucR ratio was calculated on Excel 2007 (Microsoft Office) and mean and SD were calculated as well.

FISH

Images were analyzed with a script for ImageJ. For each segmented nucleus, spots are segmented by detecting local maxima after applying a laplacien filter. Spot colocalization is determined by the distance between them.

Capillary Western

Data were analyzed on compass software provided by the manufacturer.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using One Way ANOVA, unpaired two-tailed student t-test, or Mann-Whitney rank comparisons test calculated on GraphPad Prism software depending on n number obtained and experiment configuration. Results are expressed as mean ± standard deviation, *p<0.05, **p<0.01,***<0.001, ****<0.0001.

Acknowledgements

Our thanks go to JJ Maoret and F Martins from the Inserm UMR1297 I2MC GeT-TQ plateau of the GeT platform Genotoul (Toulouse), A Lucas from the I2MC We-Met Functional Biochemistry Facility (Toulouse) and R Flores-Flores from the I2MC imaging plateau. We also thank L Colras for technical

assistance. We also thank P-E Gleizes and H Prats for helpful discussion. This work was supported by Région Occitanie (Midi-Pyrénées), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Fondation Toulouse Cancer Santé and Agence Nationale de la Recherche ANR-18-CE11-0020-RIBOCARD, European funds (Fonds Européens de Développement Régional, FEDER), Toulouse Métropole, and by the French Ministry of Research with the Investissement d'Avenir Infrastructures Nationales en Biologie et Santé program (ProFI, Proteomics French Infrastructure project, ANR-10-INBS-08). ACG, FH, and ER had fellowships from the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC).

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Agence Nationale de la Recherche	ANR-18-CE11-0020-RIBOCARD	Anne-Catherine Prats
Agence Nationale de la Recherche	ProFI ANR-10-INBS-08	Odile Burlet-Schiltz Carine Froment
Ligue Contre le Cancer		Anne-Claire Godet Fransky Hantelys Emilie Roussel

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Anne-Claire Godet, Conceptualization, Formal analysis, Validation, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Writing - review and editing; Emilie Roussel, Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing - review and editing; Florian David, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology; Fransky Hantelys, Florence Tatin, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing - review and editing; Florent Morfoisse, Anthony K Henras, Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Writing - review and editing; Joffrey Alves, Formal analysis, Investigation, Methodology; Françoise Pujol, Investigation, Methodology; Isabelle Ader, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Writing - review and editing; Edouard Bertrand, Eric Lacazette, Conceptualization, Supervision, Methodology, Writing - review and editing; Odile Burlet-Schiltz, Formal analysis, Methodology, Writing - review and editing; Carine Froment, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing - review and editing; Patrice Vitali, Conceptualization, Supervision, Methodology; Barbara Garmy-Susini, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Writing - review and editing; Anne-Catherine Prats, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Project administration, Writing - review and editing

Author ORCIDs

Florian David http://orcid.org/0000-0001-9842-1548
Carine Froment http://orcid.org/0000-0003-3688-5560
Anne-Catherine Prats http://orcid.org/0000-0002-5282-3776

Decision letter and Author response

Decision letter https://doi.org/10.7554/eLife.69162.sa1
Author response https://doi.org/10.7554/eLife.69162.sa2

Additional files

Supplementary files

- Supplementary file 1. IRES activities in normoxic and hypoxic HL-1 cells after *Neat1* knock-down. HL-1 cells were transduced with Lucky Luke bicistronic lentivector containing the IRES of *FGF1* mRNA. Cells were submitted to normoxia or hypoxia 1% O_2 during 4 hr, 8 hr or 24 hr. Renilla and

firefly luciferase activities were measured (page 1) and the IRES activities evaluated with the ratio LucF/LucR (page 2). Mann-Whitney test was performed with n=12. ***P*<0.01. For each hypoxia condition the mean of the LucF/LucR ratio has been calculated with 12 cell culture biological replicates, normalized to normoxia Experiments A, B, C correspond to experiments performed at different dates, while 1, 2, 3, 4 are experiments performed in parallel at the same date, each of them being already the mean of three technical replicates (36 technical replicates in total).

- Supplementary file 2. Sequences of FISH and smiFISH probes, PCR primers, gapmers, siRNAs and Fluidigm probes. A/ FISH and smiFISH probes. B/ qPCR primers and cloning primers. C/ LNA gapmers used in *Neat1* knock-down assays. D/ SiRNA SMARTpools (Dharmacon) used for IRES activity studies. E/ Fluidigm deltagene primers. The corresponding genes are indicated in the left column.
- Supplementary file 3. IRES activities in normoxic and hypoxic HL-1 cells after *Neat1* knock-down. HL-1 cells were transduced with Lucky Luke bicistronic lentivectors containing the IRES of *FGF1, FGF2, VEGFA* (IRES a or b), *VEGFC, VEGFD, IGF1R, MYC* or EMCV. Cells were then treated with a pool of gapmers Neat1, or control during normoxia or hypoxia 1% O_2. For the lentivector with FGF1 IRES, cells were also treated with the gapmer Neat1_2 (N1_2, page 2). Renilla and firefly luciferase activities were measured (upper panel) and the IRES activities evaluated with the ratio LucF/LucR (lower panel). Mann-Whitney test was performed with n=9. **P*<0.05, ***P*<0.01, ***<0.001, *****P*<0.0001. For each IRES the mean has been calculated with nine cell culture biological replicates Experiments A, B, C correspond to experiments performed at different dates, while 1, 2, 3 are experiments performed in parallel at the same date, each of them being already the mean of three technical replicates (27 technical replicates in total).
- Supplementary file 4. *FGF1* IRES activity in normoxic and hypoxic HL-1 cells after *Sfpq, Rps2, Hnrnpm* knock-down. HL-1 cells were transduced with a Lucky Luke bicistronic lentivector containing the IRES of FGF1. Cells were then treated with siSfpq (A), siRps2 (B), sihnRNPM (C), siNucleolin (siNcl, D) or siControl (siCtrl) smartpools during normoxia or hypoxia 1% O_2. Renilla and firefly luciferase activities were measured and the IRES activities evaluated with the ratio LucF/LucR. Mann-Whitney test was performed with n=9 (n=12 for FGF1 IRES). **P*<0.05, ***P*<0.01, ***<0.001, *****P*<0.0001. For each siRNA the mean has been calculated with nine cell culture biological replicates Experiments A, B, C correspond to experiments performed at different dates, while 1, 2, 3 are experiments performed in parallel at the same date, each of them being already the mean of three technical replicates (27 technical replicates in total).
- Supplementary file 5. IRES activities in normoxic and hypoxic HL-1 cells after $p54^{nrb}$ knock-down. HL-1 cells were transduced with Lucky Luke bicistronic lentivectors containing the IRES of *FGF1, FGF2, VEGFA* (IRES a or b), *VEGFC, VEGFD, IGF1R, MYC* or EMCV. Cells were then treated with $siP54^{nrb}$ or siControl (siCtrl) smartpool during normoxia or hypoxia 1% O_2. Renilla and firefly luciferase activities were measured (upper panel, or page 1 for *FGF1* IRES) and the IRES activities evaluated with the ratio LucF/LucR (lower panel, or page 2 for *FGF1* IRES). Mann-Whitney test was performed with n=9 (n=12 for *FGF1* IRES). **P*<0.05, ***P*<0.01, ***<0.001, *****P*<0.0001. For each IRES the mean has been calculated with nine cell culture biological replicates Experiments A, B, C correspond to experiments performed at different dates, while 1, 2, 3 are experiments performed in parallel at the same date, each of them being already the mean of three technical replicates (27 technical replicates in total).
- Supplementary file 6. IRES activities in normoxic and hypoxic HL-1 cells after *Pspc1* knock-down. HL-1 cells were transduced with Lucky Luke bicistronic lentivectors containing the IRES of *FGF1, FGF2, VEGFA* (IRES a or b), *VEGFC, VEGFD, IGF1R, MYC* or EMCV. Cells were then treated with siPSPC1 or siControl (siCtrl) smartpool during normoxia or hypoxia 1% O_2. Renilla and firefly luciferase activities were measured (upper panel, or page 1 for *FGF1* IRES) and the IRES activities evaluated with the ratio LucF/LucR (lower panel, or page 2 for FGF1 IRES). Mann-Whitney test was performed with n=9 (n=12 for *FGF1* IRES). **P*<0.05, ***P*<0.01, ***<0.001, *****P*<0.0001. For each IRES the mean has been calculated with nine cell culture biological replicates Experiments A, B, C correspond to experiments performed at different dates, while 1, 2, 3 are experiments performed in parallel at the same date, each of them being already the mean of three technical replicates (27 technical replicates in total).
- Supplementary file 7. Label-free quantitative analysis of HA-$P54^{nrb}$-bound proteins identified by mass spectrometry in different conditions. $p54^{nrb}$-HA transduced HL-1 cells were subjected to normoxia or hypoxia, then nucleus and cytoplasm fractionation was performed and extracts were immunoprecipitated using anti-HA antibody. Enriched interacting proteins were identified by using a label-free quantitative mass spectrometry approach. The dataset list of proteins identified by MS/MS

is presented in alphabetical order. An unpaired bilateral student t-test with equal variance was used. Enrichment significance thresholds correspond to an absolute log2-transformed fold-change (FC) greater than 1 and a -log10-transformed (p-value) greater than 1.3.

- Supplementary file 8. Change of mRNA recruitment into polysomes following *Neat1* or *Neat1_2* knock-down. HL-1 cardiomyocytes were transfected with gapmer Neat1, Neat1_2, or control. Polysomes were purified on sucrose gradient as described in Star Methods. RNAs were purified from cytoplasmic extracts and from pooled polysomal fractions and analyzed on a Fluidigm deltagene PCR array from two biologicals replicates (cell culture dishs and cDNAs), each of them measured in three technical replicates (PCR reactions). mRNA levels in polysomes (polysomal RNA/ total RNA) were analyzed for each gene. Relative quantification (RQ) of mRNA level was calculated using the 2–ΔΔCT method with normalization to *Gapdh* mRNA and to HL-1 tranfected by gapmer control, and is shown as fold change of expression. RQ1 and RQ2 correspond to two independent experiments. To measure the fold change of repression, the mean is expressed as –1/RQ for the values <1 (yellow column).
- Transparent reporting form

Data availability

Lentivector plasmid sequences are available on Dryad. https://doi.org/10.5061/dryad.2330r1b and https://doi.org/10.5061/dryad.m0cfxpp75. The MS proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD024067.

The following datasets were generated:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Froment C	2021	Long non-coding RNA Neat1 is a key translational regulator in hypoxia	http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=PXD024067	ProteomeXchange, PXD024067
Godet A, Roussel E, David FP, Hantelys F, Morfoisse F, Alves J, Pujol F, Ader I, Bertrand E, Burlet-Schiltz O, Froment C, Henras A, Vitali P, Lacazette E, Tatin F, Garmy-Susini B	2022	Long non-coding RNA Neat1 and paraspeckle components are translational regulators in hypoxia	https://doi.org/10.5061/dryad.m0cfxpp75	Dryad Digital Repository, 10.5061/dryad.m0cfxpp75

The following previously published dataset was used:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Hantelys F, Godet A, David F, Tatin F, Renaud-Gabardos E, Pujol F, Diallo L, Ader I, Ligat L, Henras A, Sato Y, Parini A, Lacazette E, Garmy-Susini B, Prats A	2020	Data from: Vasohibin1, a new IRES trans-acting factor for induction of (lymph)angiogenic factors in early hypoxia	https://doi.org/10.5061/dryad.2330r1b	Dryad Digital Repository, 10.5061/dryad.2330r1b

References

Ainaoui N, Hantelys F, Renaud-Gabardos E, Bunel M, Lopez F, Pujol F, Planes R, Bahraoui E, Pichereaux C, Burlet-Schiltz O, Parini A, Garmy-Susini B, Prats A-C. 2015. Promoter-dependent translation controlled by p54nrb and hnrnpm during myoblast differentiation. *PLOS ONE* **10**:e0136466. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136466, PMID: 26332123

Bouyssié D, Dubois M, Nasso S, Gonzalez de Peredo A, Burlet-Schiltz O, Aebersold R, Monsarrat B. 2015. MzDB: a file format using multiple indexing strategies for the efficient analysis of large LC-MS/MS and SWATH-MS data sets. *Molecular & Cellular Proteomics* **14**:771–781. DOI: https://doi.org/10.1074/mcp.O114.039115, PMID: 25505153

Bouyssié D, Hesse A-M, Mouton-Barbosa E, Rompais M, Macron C, Carapito C, Gonzalez de Peredo A, Couté Y, Dupierris V, Burel A, Menetrey J-P, Kalaitzakis A, Poisat J, Romdhani A, Burlet-Schiltz O, Cianférani S, Garin J, Bruley C. 2020. Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* **36**:3148–3155. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa118, PMID: 32096818

Chen J, Guo K, Kastan MB. 2012. Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA. *Journal of Biological Chemistry* **287**:16467–16476. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M112.349274, PMID: 22433872

Choudhry H, Albukhari A, Morotti M, Haider S, Moralli D, Smythies J, Schödel J, Green CM, Camps C, Buffa F, Ratcliffe P, Ragoussis J, Harris AL, Mole DR. 2015. Tumor hypoxia induces nuclear paraspeckle formation through HIF-2α dependent transcriptional activation of NEAT1 leading to cancer cell survival. *Oncogene* **34**:4482–4490. DOI: https://doi.org/10.1038/onc.2014.378, PMID: 25417700

Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ. 1998. Hl-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *PNAS* **95**:2979–2984. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2979, PMID: 9501201

Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, Chess A, Lawrence JB. 2009. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Molecular Cell* **33**:717–726. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.026, PMID: 19217333

Cobbold LC, Spriggs KA, Haines SJ, Dobbyn HC, Hayes C, de Moor CH, Lilley KS, Bushell M, Willis AE. 2008. Identification of internal ribosome entry segment (IRES) -trans-acting factors for the Myc family of IRESs. *Molecular and Cellular Biology* **28**:40–49. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.01298-07, PMID: 17967896

Créancier L, Morello D, Mercier P, Prats AC. 2000. Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity ex vivo and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation. *The Journal of Cell Biology* **150**:275–281. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.150.1.275, PMID: 10893274

Créancier L, Mercier P, Prats AC, Morello D. 2001. C-Myc internal ribosome entry site activity is developmentally controlled and subjected to a strong translational repression in adult transgenic mice. *Molecular and Cellular Biology* **21**:1833–1840. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1833-1840.2001, PMID: 11238920

Fox AH, Lam YW, Leung AKL, Lyon CE, Andersen J, Mann M, Lamond AI. 2002. Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Current Biology* **12**:13–25. DOI: https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00632-7, PMID: 11790299

Fox AH, Bond CS, Lamond AI. 2005. P54Nrb forms a heterodimer with PSP1 that localizes to paraspeckles in an RNA-dependent manner. *Molecular Biology of the Cell* **16**:5304–5315. DOI: https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0587, PMID: 16148043

Gidlöf O, Bader K, Celik S, Grossi M, Nakagawa S, Hirose T, Metzler B, Olde B, Erlinge D. 2020. Inhibition of the long non-coding RNA NEAT1 protects cardiomyocytes from hypoxia in vitro via decreased pri-mirna processing. *Cell Death & Disease* **11**:677. DOI: https://doi.org/10.1038/s41419-020-02854-7, PMID: 32826883

Giraud S, Greco A, Brink M, Diaz JJ, Delafontaine P. 2001. Translation initiation of the insulin-like growth factor I receptor mrna is mediated by an internal ribosome entry site. *The Journal of Biological Chemistry* **276**:5668–5675. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M005928200, PMID: 11063741

Godet AC, David F, Hantelys F, Tatin F, Lacazette E, Garmy-Susini B, Prats AC. 2019. Ires trans-acting factors, key actors of the stress response. *International Journal of Molecular Sciences* **20**:924. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms20040924, PMID: 30791615

Hantelys F, Godet A-C, David F, Tatin F, Renaud-Gabardos E, Pujol F, Diallo LH, Ader I, Ligat L, Henras AK, Sato Y, Parini A, Lacazette E, Garmy-Susini B, Prats A-C. 2019. Vasohibin1, a new mouse cardiomyocyte IRES trans-acting factor that regulates translation in early hypoxia. *eLife* **8**:e50094. DOI: https://doi.org/10.7554/eLife.50094, PMID: 31815666

Hertz MI, Landry DM, Willis AE, Luo G, Thompson SR. 2013. Ribosomal protein S25 dependency reveals a common mechanism for diverse internal ribosome entry sites and ribosome shunting. *Molecular and Cellular Biology* **33**:1016–1026. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.00879-12, PMID: 23275440

Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, Yokoi T, Nakagawa S, Bénard M, Fox AH, Pierron G. 2014. Neat1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Molecular Biology of the Cell* **25**:169–183. DOI: https://doi.org/10.1091/mbc.E13-09-0558, PMID: 24173718

Holcik M, Sonenberg N. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **6**:318–327. DOI: https://doi.org/10.1038/nrm1618, PMID: 15803138

Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. 2003. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Molecular and Cellular Biology* **23**:9361–9374. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003, PMID: 14645546

Huez I, Créancier L, Audigier S, Gensac MC, Prats AC, Prats H. 1998. Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mrna. *Molecular and Cellular Biology* **18**:6178–6190. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6178, PMID: 9774635

Imamura K, Imamachi N, Akizuki G, Kumakura M, Kawaguchi A, Nagata K, Kato A, Kawaguchi Y, Sato H, Yoneda M, Kai C, Yada T, Suzuki Y, Yamada T, Ozawa T, Kaneki K, Inoue T, Kobayashi M, Kodama T, Wada Y, et al. 2014. Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli. *Molecular Cell* **53**:393–406. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.009, PMID: 24507715

Kenneweg F, Bang C, Xiao K, Boulanger CM, Loyer X, Mazlan S, Schroen B, Hermans-Beijnsberger S, Foinquinos A, Hirt MN, Eschenhagen T, Funcke S, Stojanovic S, Genschel C, Schimmel K, Just A, Pfanne A, Scherf K, Dehmel S, Raemon-Buettner SM, et al. 2019. Long noncoding RNA-enriched vesicles secreted by

hypoxic cardiomyocytes drive cardiac fibrosis. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **18**:363–374. DOI: https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.09.003, PMID: 31634682

Koh MY, Lemos R, Liu X, Powis G. 2011. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1α- to HIF-2α-dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Research* **71**:4015–4027. DOI: https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4142, PMID: 21512133

Lampe S, Kunze M, Scholz A, Brauß TF, Winslow S, Simm S, Keller M, Heidler J, Wittig I, Brüne B, Schmid T. 2018. Identification of the TXNIP IRES and characterization of the impact of regulatory IRES trans-acting factors. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* **1861**:147–157. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.01.010, PMID: 29378331

Lee M, Sadowska A, Bekere I, Ho D, Gully BS, Lu Y, Iyer KS, Trewhella J, Fox AH, Bond CS. 2015. The structure of human SFPQ reveals a coiled-coil mediated polymer essential for functional aggregation in gene regulation. *Nucleic Acids Research* **43**:3826–3840. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkv156, PMID: 25765647

Martineau Y, Le Bec C, Monbrun L, Allo V, Chiu IM, Danos O, Moine H, Prats H, Prats AC. 2004. Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* **24**:7622–7635. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7622-7635.2004, PMID: 15314170

Morfoisse F, Kuchnio A, Frainay C, Gomez-Brouchet A, Delisle M-B, Marzi S, Helfer A-C, Hantelys F, Pujol F, Guillermet-Guibert J, Bousquet C, Dewerchin M, Pyronnet S, Prats A-C, Carmeliet P, Garmy-Susini B. 2014. Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1α-independent translation-mediated mechanism. *Cell Reports* **6**:155–167. DOI: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.011, PMID: 24388748

Morfoisse F, Tatin F, Hantelys F, Adoue A, Helfer A-C, Cassant-Sourdy S, Pujol F, Gomez-Brouchet A, Ligat L, Lopez F, Pyronnet S, Courty J, Guillermet-Guibert J, Marzi S, Schneider RJ, Prats A-C, Garmy-Susini BH. 2016. Nucleolin promotes heat shock-associated translation of VEGF-D to promote tumor lymphangiogenesis. *Cancer Research* **76**:4394–4405. DOI: https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3140, PMID: 27280395

Naganuma T, Nakagawa S, Tanigawa A, Sasaki YF, Goshima N, Hirose T. 2012. Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *The EMBO Journal* **31**:4020–4034. DOI: https://doi.org/10.1038/emboj.2012.251, PMID: 22960638

Nakagawa S, Naganuma T, Shioi G, Hirose T. 2011. Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *The Journal of Cell Biology* **193**:31–39. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.201011110, PMID: 21444682

Nanbru C, Lafon I, Audigier S, Gensac MC, Vagner S, Huez G, Prats AC. 1997. Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *The Journal of Biological Chemistry* **272**:32061–32066. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32061, PMID: 9405401

Nanbru C, Prats AC, Droogmans L, Defrance P, Huez G, Kruys V. 2001. Translation of the human c-myc P0 tricistronic mRNA involves two independent internal ribosome entry sites. *Oncogene* **20**:4270–4280. DOI: https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204548, PMID: 11464293

Passon DM, Lee M, Rackham O, Stanley WA, Sadowska A, Filipovska A, Fox AH, Bond CS. 2012. Structure of the heterodimer of human nono and paraspeckle protein component 1 and analysis of its role in subnuclear body formation. *PNAS* **109**:4846–4850. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1120792109, PMID: 22416126

Pavao M, Huang YH, Hafer LJ, Moreland RB, Traish AM. 2001. Immunodetection of nmt55/p54nrb isoforms in human breast cancer. *BMC Cancer* **1**:15. DOI: https://doi.org/10.1186/1471-2407-1-15, PMID: 11710964

Peddigari S, Li PWL, Rabe JL, Martin SL. 2013. HnRNPL and nucleolin bind LINE-1 RNA and function as host factors to modulate retrotransposition. *Nucleic Acids Research* **41**:575–585. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gks1075, PMID: 23161687

Pouysségur J, Dayan F, Mazure NM. 2006. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**:437–443. DOI: https://doi.org/10.1038/nature04871, PMID: 16724055

Prasanth KV, Prasanth SG, Xuan Z, Hearn S, Freier SM, Bennett CF, Zhang MQ, Spector DL. 2005. Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* **123**:249–263. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.033, PMID: 16239143

Prats AC, Van den Berghe L, Rayssac A, Ainaoui N, Morfoisse F, Pujol F, Legonidec S, Bikfalvi A, Prats H, Pyronnet S, Garmy-Susini B. 2013. CXCL4L1–fibstatin cooperation inhibits tumor angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis. *Microvascular Research* **89**:25–33. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.05.005, PMID: 23747987

Prats AC, David F, Diallo LH, Roussel E, Tatin F, Garmy-Susini B, Lacazette E. 2020. Circular RNA, the key for translation. *International Journal of Molecular Sciences* **21**:8591. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms21228591, PMID: 33202605

Semler BL, Waterman ML. 2008. IRES-mediated pathways to polysomes: nuclear versus cytoplasmic routes. *Trends in Microbiology* **16**:1–5. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.11.001, PMID: 18083033

Sharathchandra A, Lal R, Khan D, Das S. 2012. Annexin A2 and PSF proteins interact with p53 IRES and regulate translation of p53 mRNA. *RNA Biology* **9**:1429–1439. DOI: https://doi.org/10.4161/rna.22707, PMID: 23131771

Shen W, Liang XH, Sun H, De Hoyos CL, Crooke ST. 2017. Depletion of NEAT1 lncRNA attenuates nucleolar stress by releasing sequestered p54NRB and PSF to facilitate c-myc translation. *PLOS ONE* **12**:e0173494. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173494, PMID: 28288210

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* **68**:850–858. DOI: https://doi.org/10.1021/ac950914h, PMID: 8779443

Shi Y, Yang Y, Hoang B, Bardeleben C, Holmes B, Gera J, Lichtenstein A. 2016. Therapeutic potential of targeting IRES-dependent c-myc translation in multiple myeloma cells during ER stress. *Oncogene* **35**:1015–1024. DOI: https://doi.org/10.1038/onc.2015.156, PMID: 25961916

Shi Z, Fujii K, Kovary KM, Genuth NR, Röst HL, Teruel MN, Barna M. 2017. Heterogeneous ribosomes preferentially translate distinct subpools of mRNAs genome-wide. *Molecular Cell* **67**:71–83.. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.021, PMID: 28625553

Stoneley M, Subkhankulova T, Le Quesne JP, Coldwell MJ, Jopling CL, Belsham GJ, Willis AE. 2000. Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acids Research* **28**:687–694. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/28.3.687, PMID: 10637319

Sunwoo H, Dinger ME, Wilusz JE, Amaral PP, Mattick JS, Spector DL. 2009. Men epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Research* **19**:347–359. DOI: https://doi.org/10.1101/gr.087775.108, PMID: 19106332

Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB. 2005. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* **123**:49–63. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.034, PMID: 16213212

Tatin F, Renaud-Gabardos E, Godet AC, Hantelys F, Pujol F, Morfoisse F, Calise D, Viars F, Valet P, Masri B, Prats AC, Garmy-Susini B. 2017. Apelin modulates pathological remodeling of lymphatic endothelium after myocardial infarction. *JCI Insight* **2**:e93887. DOI: https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887, PMID: 28614788

Tsanov N, Samacoits A, Chouaib R, Traboulsi AM, Gostan T, Weber C, Zimmer C, Zibara K, Walter T, Peter M, Bertrand E, Mueller F. 2016. SmiFISH and FISH-quant-a flexible single RNA detection approach with super-resolution capability. *Nucleic Acids Research* **44**:e165. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkw784, PMID: 27599845

Vagner S, Gensac MC, Maret A, Bayard F, Amalric F, Prats H, Prats AC. 1995. Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Molecular and Cellular Biology* **15**:35–44. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.15.1.35, PMID: 7799942

Wilusz JE, JnBaptiste CK, Lu LY, Kuhn CD, Joshua-Tor L, Sharp PA. 2012. A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly (a) tails. *Genes & Development* **26**:2392–2407. DOI: https://doi.org/10.1101/gad.204438.112, PMID: 23073843

Yamamoto K, Goyama S, Asada S, Fujino T, Yonezawa T, Sato N, Takeda R, Tsuchiya A, Fukuyama T, Tanaka Y, Yokoyama A, Toya H, Kon A, Nannya Y, Onoguchi-Mizutani R, Nakagawa S, Hirose T, Ogawa S, Akimitsu N, Kitamura T. 2021. A histone modifier, ASXL1, interacts with nono and is involved in paraspeckle formation in hematopoietic cells. *Cell Reports* **36**:109576. DOI: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109576, PMID: 34433054

Yan H, Liang H, Liu L, Chen D, Zhang Q. 2019. Long noncoding RNA NEAT1 sponges mir-125a-5p to suppress cardiomyocyte apoptosis via BCL2L12. *Molecular Medicine Reports* **19**:4468–4474. DOI: https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10095, PMID: 30942442

Yan H, Wang Z, Sun Y, Hu L, Bu P. 2021. Cytoplasmic NEAT1 suppresses AML stem cell self-renewal and leukemogenesis through inactivation of wnt signaling. *Advanced Science* **8**:e2100914. DOI: https://doi.org/10.1002/advs.202100914, PMID: 34609794

Yang C, Li Z, Li Y, Xu R, Wang Y, Tian Y, Chen W. 2017. Long non-coding RNA NEAT1 overexpression is associated with poor prognosis in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* **8**:2672–2680. DOI: https://doi.org/10.18632/oncotarget.13737, PMID: 27926523

Yang Y, Wang C, Zhao K, Zhang G, Wang D, Mei Y. 2018. TRMP, a p53-inducible long noncoding RNA, regulates G1/S cell cycle progression by modulating IRES-dependent p27 translation. *Cell Death & Disease* **9**:886. DOI: https://doi.org/10.1038/s41419-018-0884-3, PMID: 30166522

Ylä-Herttuala S, Baker AH. 2017. Cardiovascular gene therapy: past, present, and future. *Molecular Therapy* **25**:1095–1106. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.027, PMID: 28389321

Zhang Y, Wu D, Wang D. 2020. Long non-coding RNA ARAP1-AS1 promotes tumorigenesis and metastasis through facilitating proto-oncogene c-myc translation via dissociating PSF/PTB dimer in cervical cancer. *Cancer Medicine* **9**:1855–1866. DOI: https://doi.org/10.1002/cam4.2860, PMID: 31953923

Chapitre 2 : La composition ribosomique est modifiée différentiellement par le stress génotoxique et le stress du réticulum endoplasmique dans les cellules endothéliales lymphatiques

Introduction

Les vaisseaux lymphatiques jouent un rôle crucial dans la pathogenèse du cancer. Ils se développent à l'intérieur et autour des tumeurs et constituent une voie privilégiée pour la dissémination des métastases du fait de leur grande perméabilité (Vaahtomeri et al., 2017). La lymphangiogenèse, croissance de nouveaux vaisseaux lymphatiques, est permise grâce à différents facteurs de croissance des familles VEGF (vascular endothelial growth factors) et FGF (fibroblast growth factor). La lymphangiogenèse est augmentée en réponse à l'hypoxie tumorale et favorise la dissémination métastatique. Les traitements anticancéreux (chirurgie et chimiothérapies) peuvent quant à eux engendrer une dysfonction lymphatique. Mon laboratoire a démontré que la fonction lymphatique est altérée par plusieurs traitements anticancéreux, le tamoxifène, le paclitaxel et la doxorubicine. Le tamoxifène abolit l'effet protecteur des œstrogènes et le paclitaxel induit l'autophagie des cellules endothéliales lymphatiques (Morfoisse et al., 2018; Zamora et al., 2019). Cependant, le mécanisme d'action de la doxorubicine demeure peu connu. Le stress génotoxique induit par les chimiothérapies anticancéreuses et notamment par la doxorubicine a un impact important sur l'expression génique. La doxorubicine est connue pour impacter négativement la traduction, en bloquant la biogenèse des ribosomes et en engendrant une ubiquitination importante des protéines ribosomiques (Halim et al., 2018).

Mon laboratoire travaille depuis de nombreuses années sur le contrôle traductionnel de l'expression des facteurs de croissances angiogéniques et lymphangiogéniques en réponse au stress. Le stress entraine un blocage de la traduction globale alors que la traduction de certains ARNm essentiels à la survie cellulaire est maintenue par des mécanismes alternatifs tel que la traduction IRES-dépendante (Godet et al., 2019). C'est le cas des facteurs de croissance de la famille des FGF et des VEGF dont les ARNm possèdent tous des IRES activés en réponse au stress du réticulum endoplasmique et à l'hypoxie (Hantelys et al., 2019; Philippe et al., 2016). Ainsi mon équipe a montré qu'en condition d'hypoxie les cellules tumorales sont capables d'induire la traduction IRES-dépendante de l'ARNm du facteur lymphangiogénique majeur VEGFC, ce qui stimule fortement la lymphangiogenèse tumorale et participe à la dissémination métastatique (Morfoisse et al., 2014a).

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il est apparu que l'hétérogénéité ribosomique est un mécanisme permettant la traduction de groupes de messagers spécifiques : notamment, plusieurs protéines ribosomiques sont impliquées dans la traduction spécifique d'ARNm à IRES, comme Rps25, Rpl10A… (Godet et al., 2019). Ces observations nous ont poussés à nous intéresser au rôle du l'hétérogénéité ribosomique dans la régulation traductionnelle des facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques en réponse au stress.

Nous avons choisi comme modèle cellulaire la cellule endothéliale lymphatique humaine (HDLEC) qui joue un rôle majeur dans la lymphangiogenèse tumorale mais aussi dans des pathologies comme l'ischémie cardiaque et le lymphoedème. Les HDLEC sont au premier rang lors du processus de lymphangiogenèse durant lequel elles sont amenées à migrer et à proliférer afin de former de nouveaux vaisseaux. Lors de différents processus pathologiques auxquels elles sont confrontées, les HDLEC sont exposées à différents types de stress tel que l'hypoxie et le stress du réticulum endoplasmique (RE). Les traitements antitumoraux utilisés sont bien souvent des agents qui induisent de puissants stress génotoxiques pour les cellules.

L'objectif de ce premier chapitre a donc été d'étudier l'hypothèse de ribosomes spécialisés dans les HDLEC, en réponse à deux stress, le stress du RE et le stress génotoxique doxorubicine, d'évaluer des variations de la composition protéique des ribosomes par une approche de protéomique et d'identifier des protéines candidates capables de contrôler la traduction IRES-dépendante.

Résultats

La traduction globale est inhibée dans les cellules endothéliales soumises au stress génotoxique et au stress du RE

Afin d'étudier le rôle du stress cellulaire sur les régulations traductionnelles auxquelles sont soumises les cellules endothéliales lymphatiques dans les contextes de stress, nous avons soumis les cellules à deux traitements capables de générer un stress génotoxique (la doxorubicine) et un stress du réticulum (la tunicamycine). La doxorubicine est un agent de chimiothérapie, elle appartient à la classe de médicaments appelée anthracyclines. Elle exerce ses effets anti-cancéreux au travers de divers mécanismes : inhibition de la réplication de l'ADN en agissant comme agent intercalant, inhibition de la topoisomérase II, la génération de radicaux libres, pouvant induire des dommages à l'ADN. C'est donc un puissant inducteur du stress génotoxique. L'accumulation de la protéine p53 est une caractéristique du stress génotoxique. On peut observer que la p53 s'accumule dès deux heures de traitement par la doxorubicine dans les cellules endothéliales lymphatiques (Figure 23A). De plus ce traitement induit la phosphorylation de la protéine eIF2α (Figure 2B). La phosphorylation du facteur eIF2α témoigne d'un blocage de la traduction coiffe-dépendante. Parallèlement, nous avons soumis les cellules à un traitement par la tunicamycine qui peut induire un stress du reticulum. La tunicamycine est un antibiotique qui inhibe l'enzyme responsable de la glycosylation des protéines. L'accumulation de protéine non glycosylées dans le réticulum provoque un stress et déclenche la réponse UPR (unfolded protein response). L'accumulation de la protéine chaperonne BIP (GRP78) est une caractéristique au stress du RE. Nous avons donc regardé l'effet de cet antibiotique sur les cellules endothéliales lymphatiques. On peut observer une accumulation de la chaperonne GRP78 à partir de 8h (Figure 23C) et une phosphorylation du facteur d'initiation canonique eIF2α dès 2 heures (Figure 23D). Le stress génotoxique et le stress du réticulum induit dans les cellules endothéliales lymphatiques induisent la phosphorylation du facteurs eIF2α, confirmant que l'initiation de la traduction coiffe-dépendante est inhibée en réponse à ces stress dans les HDLEC.

Afin de confirmer cette inhibition traductionnelle induite par la doxorubicine et la tunicamycine, nous avons réalisé des fractionnements sur gradients de sucrose afin d'observer les profils polysomiques des cellules en conditions de stress (Figure 24).

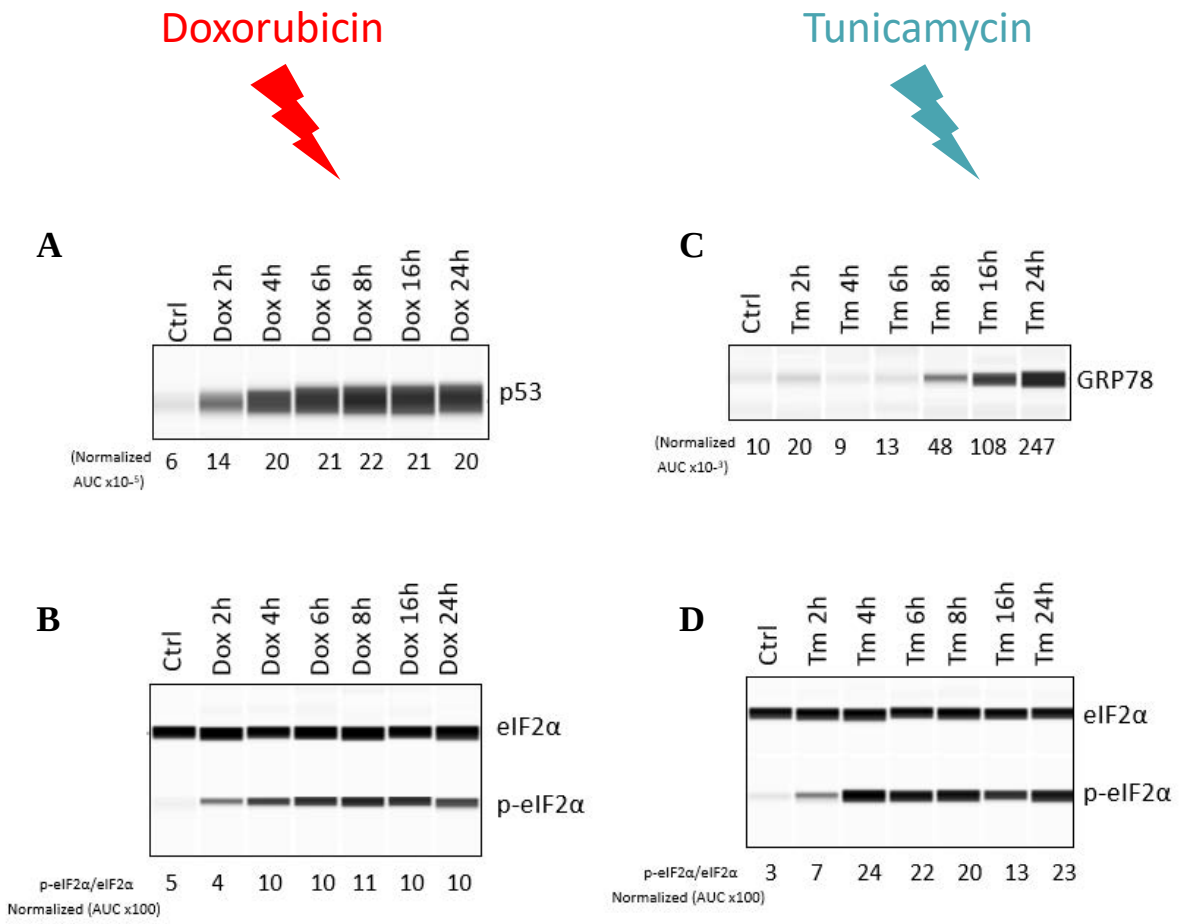


Figure 23 : Le stress cellulaire induit un blocage de la traduction globale dans les cellules endothéliales lymphatiques. Cinétique de traitement des cellules HDLEC par la doxorubicine ou la tunicamycine. Les niveaux de protéines ont été analysés et quantifiés en western capillaire avec des anticorps spécifiques, comme décrit dans le matériel et méthodes. (A) Détection de p53 à différents temps de traitement par la doxorubicine (Dox). (B) Détection de la protéine GRP78 à différents temps de traitement par la tunicamycine (Tm). (C-D) Détection du facteur eIF2α (C) et eIF2α phosphorylé (D) après traitement Dox ou Tm. Les valeurs de quantification ont été exprimées en unités arbitraires de luminescence (area under the curve AUC) et normalisées par la quantité de protéines totales. Trois expériences indépendantes ont été réalisées; une expérience représentative est présentée.

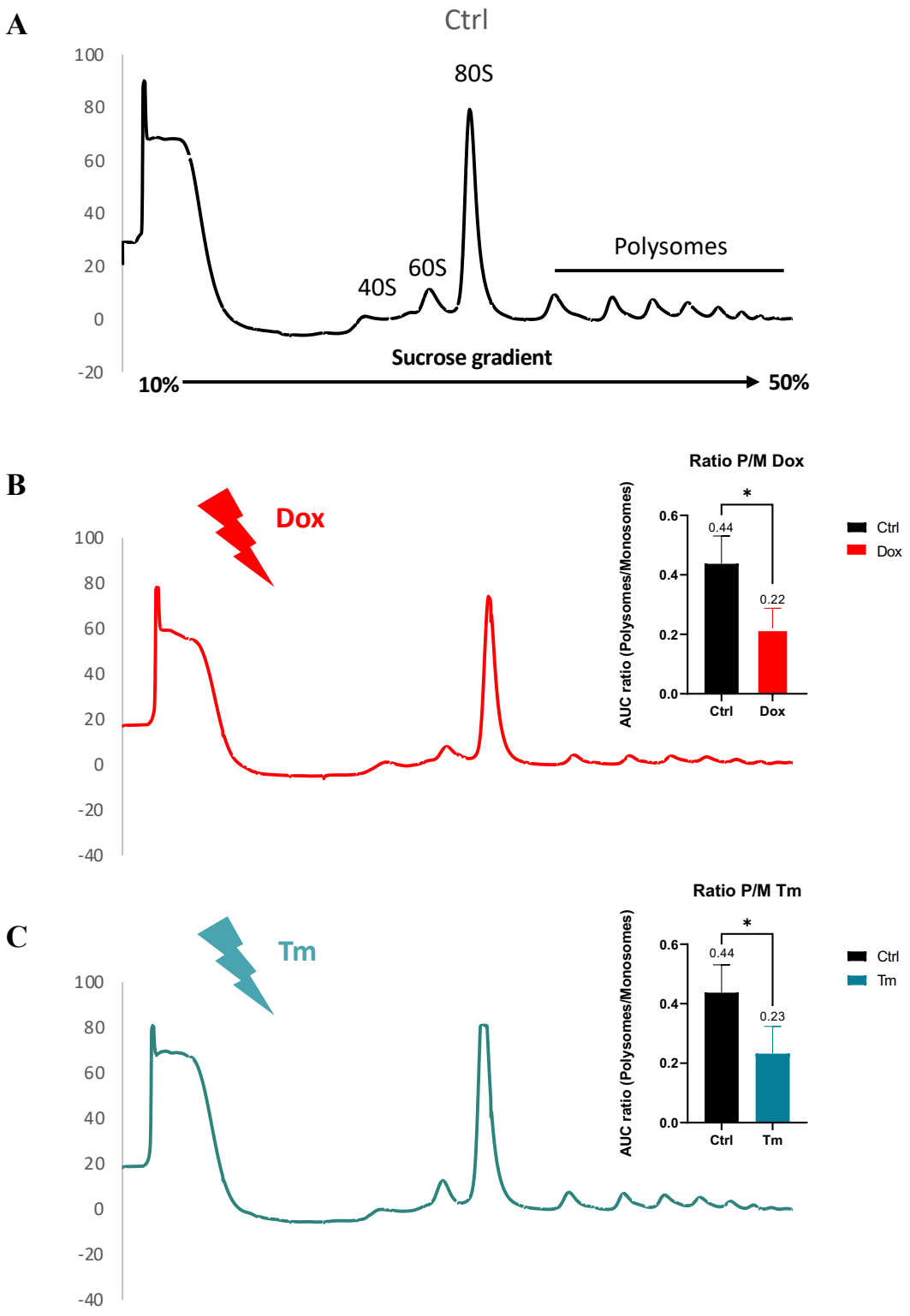


Figure 24 : Le stress cellulaire induit un blocage de la traduction globale dans les cellules endothéliales lymphatiques. Les cellules endothéliales lymphatiques HDLEC ont été soumises au stress génotoxique (doxorubicine) et au stress du RE (tunicamycine) puis traitées cycloheximide avant la lyse. Les extraits cytoplasmiques contenant les polysomes ont été préparés puis déposés sur gradients de sucrose *(10-50%)* afin d'évaluer l'efficacité de traduction dans les cellules non traitées (Ctrl) (A), traitées par la doxorubicine (Dox) (B) ou traitées par la tunicamycine (Tm)(C). Les ratios polysome/monosome (P/M) ont été calculés à partir des aires sous la courbe de polysomes. Les expériences ont été réalisées trois fois et un test de Student avec une correction de Welch a été appliqué. *p<0.05, **p<0.01, ***<0.001, ****p<0.0001

Afin de visualiser le blocage de la traduction, les cellules ont été traitées par la doxorubicine ou par la tunicamycine durant 6h et la traduction a été « figée » à l'aide de la cycloheximide. La cycloheximide est un antibiotique qui va bloquer la traduction en se liant de manière spécifique à la sous-unité 60S au site E et bloque la translocation en empêchant la liaison de l'ARNt déchargé au site E. Nous avons observé une diminution du ratio polysomes sur monosomes (reflétant la diminution de la traduction) d'un facteur 2 environ lorsque les cellules sont soumises à la doxorubicine ou à la tunicamycine (Figure 24B et 24C). Cela confirme que les HDLEC soumises au stress génotoxique et au stress du RE voient leur traduction globale diminuer.

Les IRES des facteurs de croissance (lymph)angiogéniques VEGFC et FGF1 sont activés en réponse au stress génotoxique et au stress du RE

Les cellules endothéliales lymphatiques sont les principales actrices du processus de lymphangiogenèse, elles expriment les récepteurs VEGFR3 et VEGFR2 qui peuvent lier le VEGFC et le VEGFD afin de promouvoir leur survie, leur prolifération et leur migration. Il a été montré précédemment que le VEGFC est induit traductionnellement via une traduction IRES-dépendante de son ARNm en conditions d'hypoxie (Morfoisse 2014 ; Hantelys et al, 2019). Afin de déterminer si les stress doxorubicine et tunicamycine sont capables d'induire l'expression de ce facteur dans les cellules endothéliales nous avons analysé l'expression de l'ARNm et de la protéine endogène du VEGFC en condition de stress (Figure 25). Le traitement doxorubicine réduit l'expression de l'ARNm du VEGFC d'environ deux fois (Figure 25A). Au contraire, le niveau de protéine VEGFC intracellulaire est maintenu alors que le niveau de VEGFC secrété tend à augmenter en réponse à la doxorubicine (Figure 25B-C). Le traitement par la tunicamycine n'affecte pas l'expression de l'ARNm du VEGFC mais fait augmenter celui de la protéine intracellulaire d'environ 30% (Figure 25D-F). Ces données indiquent que malgré l'inhibition de la traduction globale, l'expression de la protéine VEGFC, rapportée à la quantité d'ARNm, tend à augmenter dans les HDLEC stressées par la doxorubicine ou la tunicamycine, suggérant que la traduction de l'ARNm est activée.

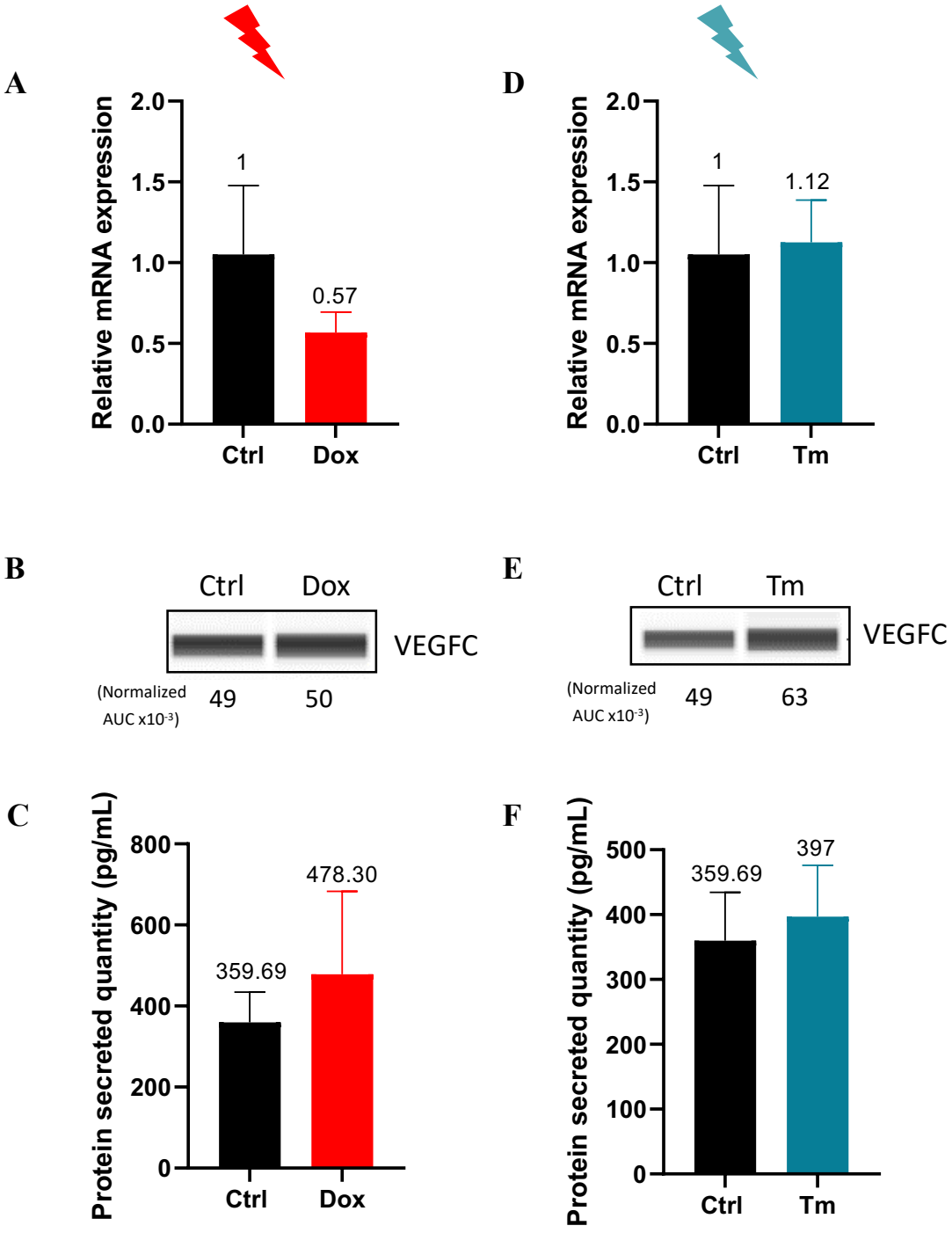


Figure 25 : Les niveaux protéiques du facteur de croissance VEGFC sont maintenus malgré le blocage de la traduction par le stress dans les cellules endothéliales lymphatiques. Les niveaux endogènes d'ARNm (A, D) et de protéine (B,C,E,F) VEGFC ont été mesurés par RT qPCR, Western capillaire et ELISA à partir d'extraits de cellules traitées Dox ou Tm durant 6h. Trois expériences indépendantes ont été réalisées ; une expérience représentative est présentée.

Nous avions précédemment démontré que le VEGFC était induit traductionnellement via l'IRES de son ARNm en condition de stress hypoxique et dans des tumeurs (Morfoisse et al., 2014a). Afin de déterminer si l'activité de l'IRES de l'ARNm VEGFC est responsable du maintien de l'expression de la protéine durant le stress, nous avons utilisé le système de rapporteur bicistronique mis au point au laboratoire, appelé Lucky Luke car utilisant deux gènes rapporteurs luciférase (cf introduction)(Créancier et al., 2000). La stratégie bien établie des vecteurs bicistroniques, précédemment validée par nous et par d'autres, permet de mesurer l'activité de l'IRES, qui est révélée par l'expression du second cistron, LucF. L'IRES du VEGFC a été introduit dans la cassette bicistronique (Figure 26A). Celle-ci a été clonées dans un plasmide lentivecteur car les cellules HDLEC ne sont pas efficacement transfectées par des plasmides mais peuvent être facilement transduites par des lentivecteurs. Les HDLEC ont d'abord été transduits avec le lentivecteur contenant l'IRES du VEGFC (appelé CRHVCL+) et une cinétique a été réalisée afin d'étudier l'activité de cet IRES après plusieurs temps de traitement. Les activités de la luciférase ont été mesurées à partir d'extraits cellulaires et les activités de l'IRES ont été rapportées comme le ratio de luminescence LucF/LucR. Les données montrent que le stress génotoxique et le stress du réticulum sont tous deux capables d'induire l'activité IRES du VEGFC (Figure 26 B-C ; Annexe Tables 1-2). En réponse au stress génotoxique, l'IRES est activé dès 4 heures de stress tandis que le traitement par la tunicamycine entraîne une élévation de la traduction IRES-dépendante après 6h de stress. L'activité de l'IRES du VEGFC lui permet donc de garantir sa traduction malgré l'inhibition de la traduction globale induit par le stress.

Afin de déterminer si l'activation de la traduction IRES-dépendante concerne d'autres IRES, nous avons testé l'IRES de l'ARNm FGF1. Le FGF1 aussi est un facteur angiogénique majeur qui a aussi une activité lymphangiogénique. Il permet par une liaison à son récepteur FGFR3 (cible de prox1) la survie, la migration et la prolifération des CEL (Shin et al., 2006). La même expérience que pour l'IRES du VEGFC a été réalisée (Figure 27). Les résultats indiquent que l'activité de l'IRES FGF1 est induite en réponse au traitement par la doxorubicine dès 4 h (Figure 27B) et que le stress induit par le traitement par la tunicamycine induit l'activation de l'IRES à 6h (Figure 27C), soit exactement le même résultat que pour l'IRES VEGFC.

Dans l'ensemble, ces données montrent que le stress génotoxique et le stress du RE activent tous deux la traduction IRES-dépendante contrôlée par les IRES VEGFC et FGF1 dans les cellules endothéliales lymphatiques. Cette activation survient en phase précoce de stress (4-6 h), comme l'équipe l'avait observé précédemment pour l'hypoxie (Hantelys 2019).

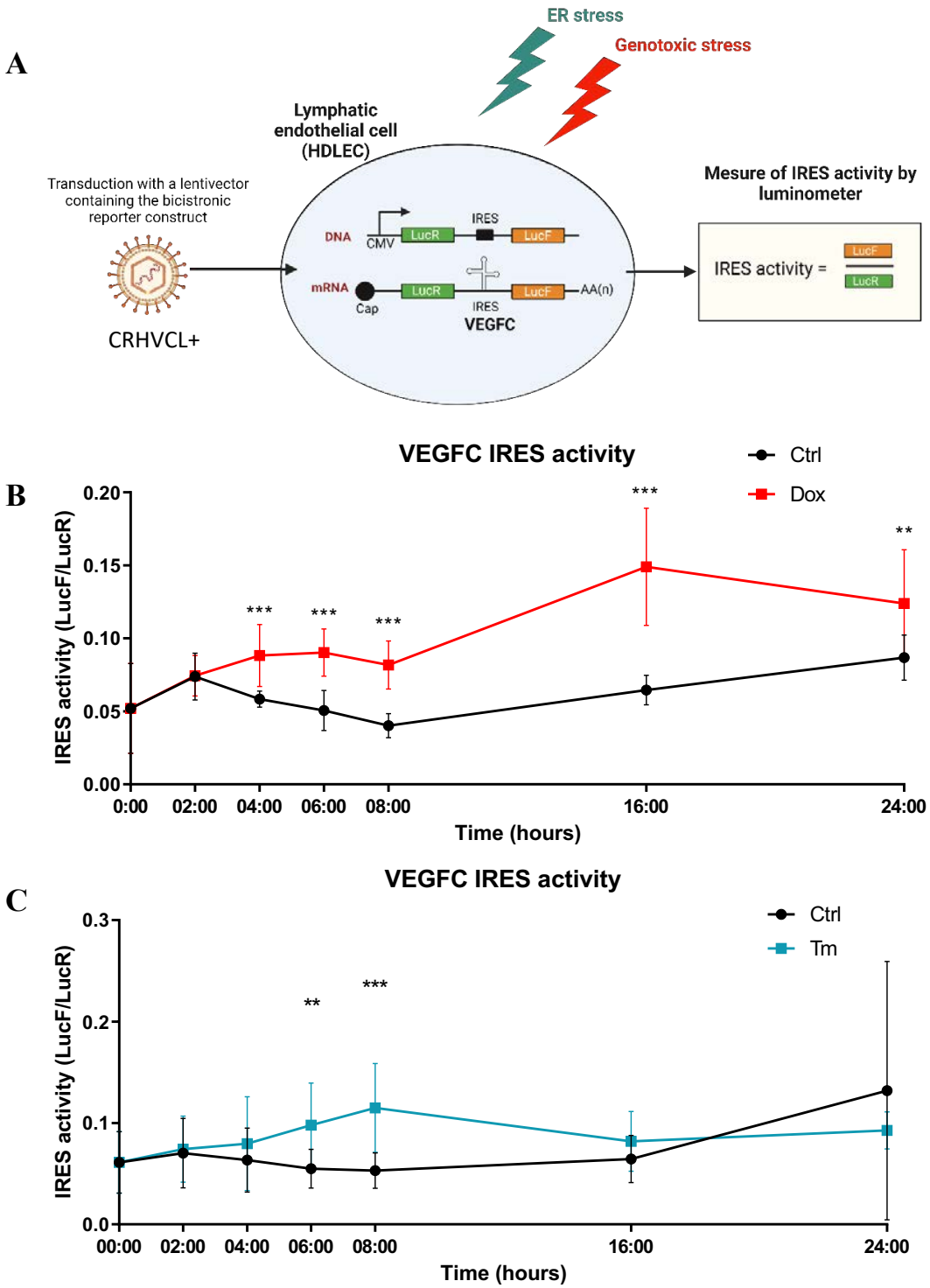


Figure 26 : Le stress cellulaire induit l'activité IRES du VEGFC dans les cellules endothéliales lymphatiques. Pour mesurer la traduction IRES-dépendante dans les HDLEC pendant le stress génotoxique ou le stress du RE, les cellules ont été transduites avec des lentivecteurs bicistroniques « Lucky-Luke » possédant deux luciférases avec l'IRES cloné entre les gènes de la luciférase renilla (LucR) et de la luciférase firefly (LucF) (A). L'activité IRES (ratio LucF/LucR) des HDLEC transduites avec le lentivecteur CRHVCL+ puis soumises à une cinétique de stress (0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 16h et 24h) est présentée (B, C). Dans les lentivecteurs bicistroniques, la traduction du premier cistron LucR est coiffe-dépendante, tandis que la traduction du second cistron LucF est IRES-dépendante. Les données présentent la comparaison entre les temps de traitement et le temps 0h réalisée avec un test non paramétrique de Mann-Whitney. *p<0.05, **p<0.01, ***<0.001, ****p<0.0001.

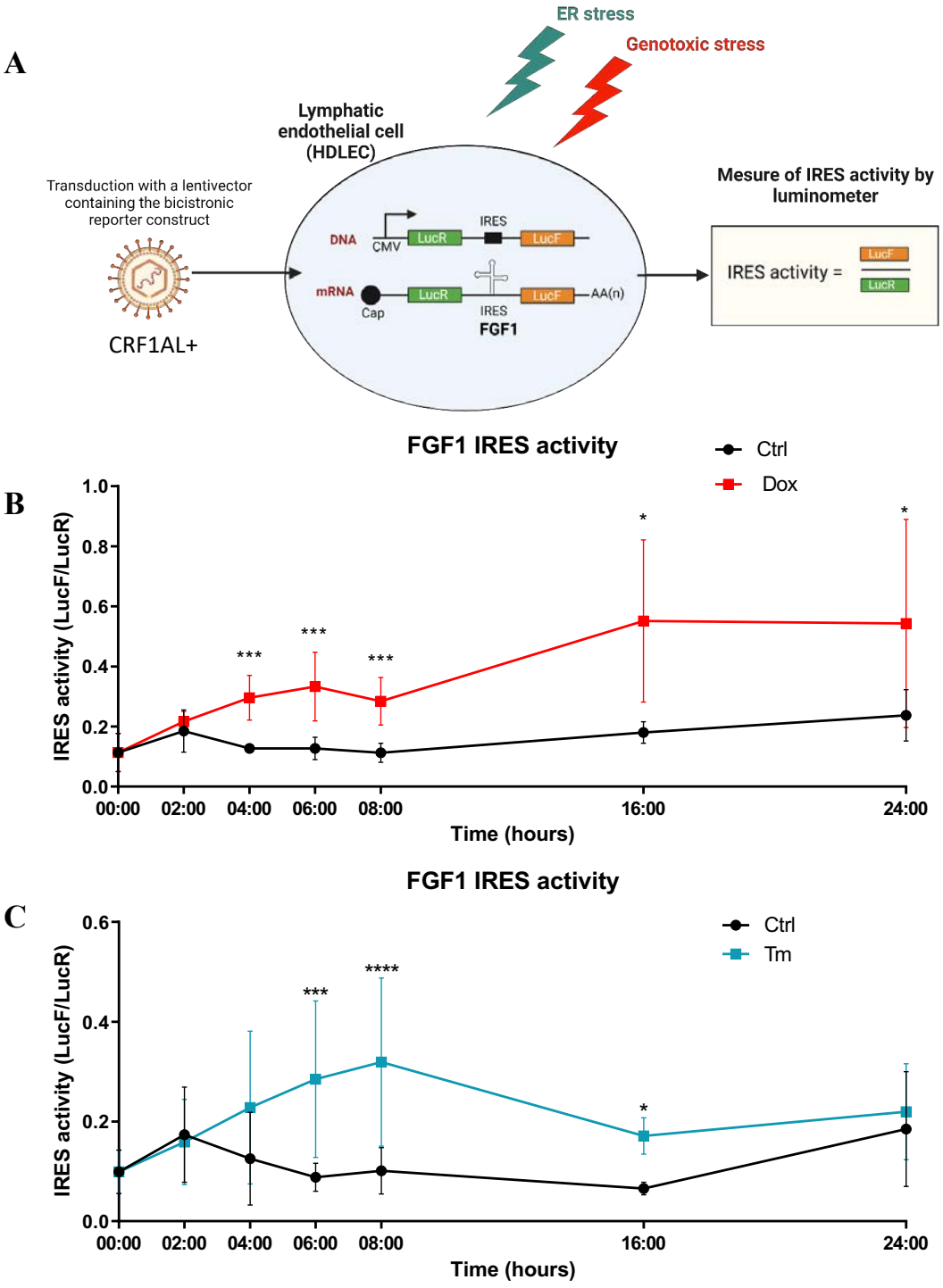


Figure 27 : Le stress cellulaire induit l'activité IRES du FGF1 dans les cellules endothéliales lymphatiques. Pour mesurer la traduction IRES-dépendante dans les HDLEC pendant le stress génotoxique ou le stress du RE, les cellules ont été transduites avec des lentivecteurs bicistroniques « Lucky-Luke » possédant deux luciférases avec l'IRES cloné entre les gènes de la luciférase renilla (LucR) et de la luciférase firefly (LucF) (A). L'activité IRES (ratio LucF/LucR) des HDLEC transduites avec le lentivecteur CRF1AL+ puis soumises à une cinétique de stress (0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 16h et 24h) est présentée (B, C). Dans les lentivecteurs bicistroniques, la traduction du premier cistron LucR est coiffe-dépendante, tandis que la traduction du second cistron LucF est IRES-dépendante. Les données présentent la comparaison entre les temps de traitement et le temps 0h réalisée avec un test non paramétrique de Mann-Whitney. *p<0.05, **p<0.01, ***<0.001, ****p<0.0001.

Le ribo-interactome des CEL est modifié différentiellement en réponse aux deux stress

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'activation de la traduction d'ARN messagers à IRES dans les HDLEC pourrait être liée à une variation de la composition des ribosomes. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une analyse protéomique en collaboration avec Carine Froment de la plateforme de protéomique de l'institut de pharmacologie et de biologie structurale de Toulouse. Cette analyse a été réalisée sur les polysomes de HDLEC soumises soit au stress doxorubicine soit au stress tunicamycine, en comparaison avec un contrôle non stressé. Au vu des résultats de la cinétique d'activation des IRES, nous avons choisi de travailler à un temps de 6 h de stress pour le reste de notre étude. Les HDLEC ont donc été stressées pendant 6 h avec de la doxorubicine, de la tunicamycine ou aucun traitement. 6 h après le stress, les cellules ont été traitées avec de la cycloheximide et les extraits ont été déposés sur un gradient de sucrose. Nous avons récupéré les fractions polysomales (ribosomes en traduction active) et avons réalisé une analyse protéomique en spectrométrie de masse (nano-LC-MS/MS) afin d'étudier la composition et l'interactome des ribosomes en conditions de stress. Les volcano-plots illustrés en Figure 28 montrent les résultats obtenus en réponse au traitement doxorubicine (A) et tunicamycine (B). Alors que la plupart des protéines identifiées dans l'interactome polysomique sont retrouvées en condition non stressée et stressée on peut identifier pour chaque condition une trentaine de protéines qui varient significativement entre les ribosomes stressés ou non stressés (Figure 28).

Parmi les protéines qui ont été significativement enrichies dans les polysomes en réponse à la doxorubicine, on retrouve plusieurs hélicases dont DDX17 et DHX9, L'hélicase DHX9 a déjà été identifiée comme ITAF de la p53 en réponse aux dommages à l'ADN (Halaby et al., 2015). L'hélicase DDX17 a quant à elle déjà été identifiée dans l'interactome de $P54^{nrb}$ dans le premier volet de mes résultats dans les cardiomyocytes. Il y a aussi deux hnRNP, hnRNPDL et hnRNPUL2, dont on peut remarquer la surreprésentation dans les polysomes de cellules stressées. Outre les deux hélicases, il y a plusieurs protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN, comme TPT1(p23), une protéine anti-apoptotique induite en réponse aux dommages à l'ADN, et HSP90AB1 qui est une chaperonne pour les protéines mal repliées. Il n'est pas étonnant de retrouver ce type de chaperonnes en réponse à un stress génotoxique étant donné que les dommages à l'ADN peuvent provoquer des mutations favorisant le mauvais repliement des protéines (Haase and Fitze, 2016).

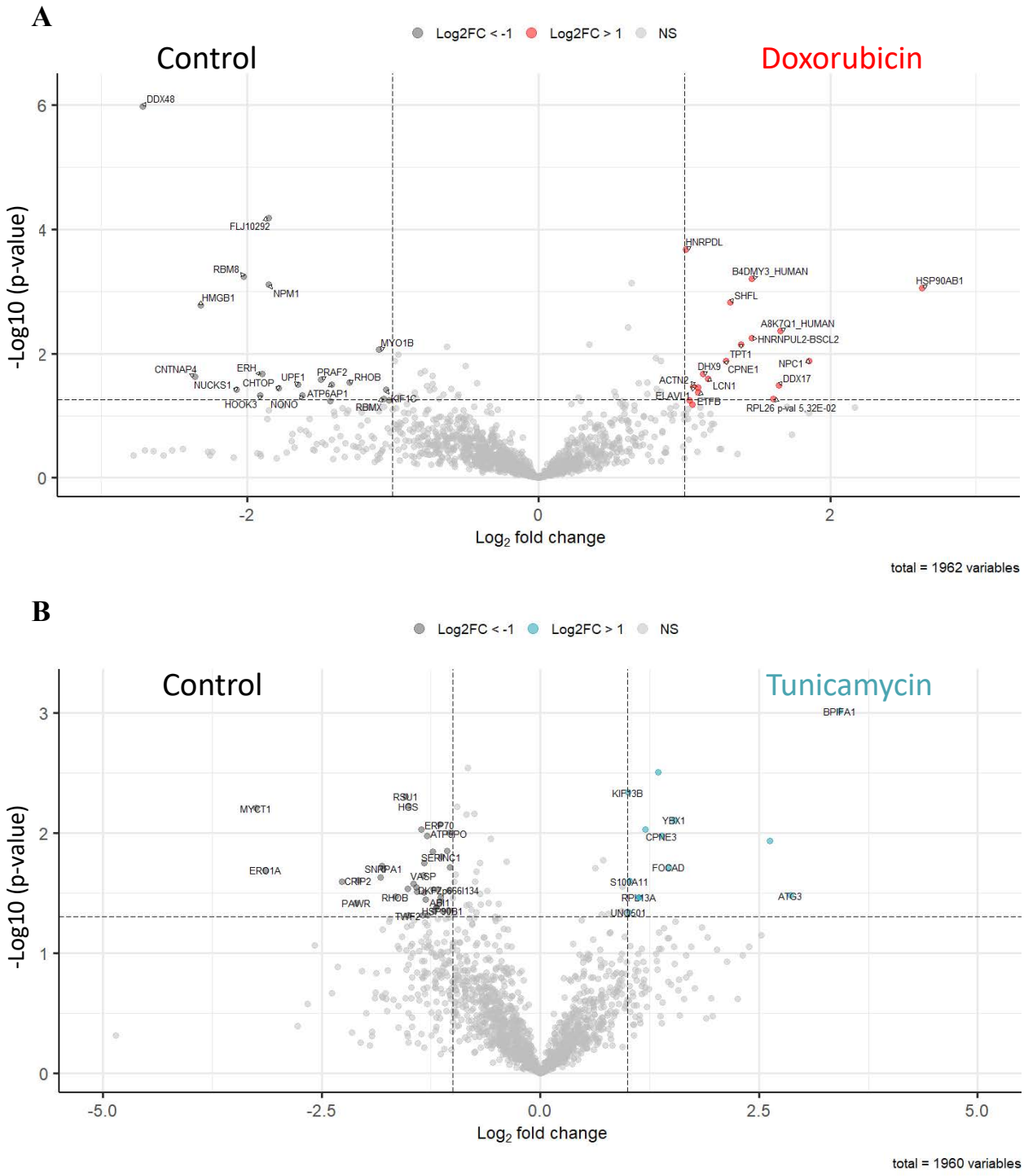


Figure 28 : Modification du Ribo-interactome en réponse au stress induit par la doxorubicine et la tunicamycine. Les HDLEC ont été soumises au stress génotoxique et au stress du RE durant 6h, les cellules ont ensuite été traitées avec de la cycloheximide pour bloquer la traduction et les extraits ont été passés sur gradients de sucrose. Les protéines des polysomes ont été extraites, digérées par la trypsine et analysées par spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS afin de déterminer un changement dans la composition des ribosomes ou des protéines associées par une approche de protéomique quantitative sans marquage. Les volcano-plots montrant les protéines significativement différentielles dans la comparaison entre des cellules non traitées versus traitées doxorubicine (A) ou dans la comparaison entre des cellules non traitées versus traitées tunicamycine (B) sont ici présentés. Un test de Student bilatéral non apparié avec une variance égale a été utilisé. Les seuils de significativité pour la sélection des protéines variantes sont représentés par -1 > Log2 (Fold Change) > 1 et -Log10(p-value) >1.3.

Notre objectif initial était de déterminer une variation possible de la composition en protéines ribosomiques. Une RP est enrichie lors du stress doxorubicine : la RPL26, déjà été associée aux réponses aux dommages à l'ADN dans de précédentes publications. Il a été montré que la protéine RPL26 se lie au 5'UTR de l'ARNm de p53 et induit sa traduction en réponse aux dommages à l'ADN (Takagi et al., 2005b). Ces données suggèrent que la RPL26 pourrait être impliquée dans la régulation de la traduction en réponse au stress génotoxique.

Parmi les protéines sous-représentées dans les polysomes après un traitement par la doxorubicine, on retrouve de nombreuses protéines associées au complexe EJC (exon junction complex) et à la dégradation des ARN par le NMD (non sens mediated decay) : RBM8, Mago nashi protein (FLJ10292), DDX48 et UPF1. Le NDM est un mécanisme de contrôle qualité qui génère à la dégradation des messagers présentant un codon stop prématuré. Le stress génotoxique induit par la doxorubicine inhibe la voie de dégradation NMD par la production d'une forme clivée de l'hélicase UPF1 qui a un effet interférant dominant (Popp and Maquat, 2015). Parmi les protéines statistiquement diminuées, on compte aussi la nucléophosmine 1 (NPM1), une actrice majeure de la biogenèse des ribosomes. NPM1 a un rôle critique dans le maintien de la stabilité du génome grâce à son interaction avec les centrosomes non dupliqués (Box et al., 2016). Cette protéine a été associée à plusieurs voie de réparation de l'ADN. NPM1 régule aussi la 2'O-méthylation de l'ARNr par interaction avec les snoARN à boîte C/D et avec la FBL (Nachmani et al., 2019). La perte de NPM1 entrave aussi la traduction IRES-dépendante des ARNm de XIAP et Cdkn1b. Divers transcrits contenant des IRES ne sont plus recrutés dans les ribsosomes de cellules qui ont perdu NPM1 (Nachmani et al., 2019). Ces résultats suggèrent que le traitement à la doxorubicine pourrait bien entraver les 2'-O-méthylations des ARNr dans les HDLEC (voir chapitre 3).

Enfin, la comparaison des interactome polysomique entre les cellules non stressées et stressées par un traitement tunicamycine montre que la protéine RPL13A est significativement enrichie dans les polysomes en réponse au stress du RE. La protéine RPL13A a fait l'objet d'une série d'études dans les années 2000 notamment (Chaudhuri et al., 2007). Elle a été identifiée comme composant d'un complexe de régulation de la traduction : le complexe GAIT (gamma-interferon-activated inhibitor). Ce complexe induit une inhibition de la traduction des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire. Dans ce contexte, RPL13A est relarguée de la grande sous-unité du ribosome et intégrée au complexe GAIT, qui se fixe alors sur sa séquence cible et inhibe le recrutement de la sous-unité

43S. RPL13A joue également un rôle important dans la méthylation des ARNr et la perte de cette protéine induit un défaut dans la traduction IRES-dépendante des ARNm p27, p53 et SNAT2 sans affecter la traduction canonique (Basu et al., 2011a; Chaudhuri et al., 2007).

L'information importante qui ressort de cette étude comparative est la différence drastique dans la composition du ribo-interactome durant le stress génotoxique et le stress du RE. La seule protéine commune aux deux volcanoplots est la GTPase RHOB, sous-représentée en réponse aux deux stress. Parmi ces protéines variables du ribo-interactome, nous avons choisi de poursuivre l'étude avec les hélicases DDX17, DHX9.

Quant à la composition ribosomique elle-même, elle ne varie pas beaucoup. Seules deux RP varient en condition de stress, que nous avons sélectionnées pour la suite de l'étude: RPL26 et RPL13A, enrichies en réponse au stress génotoxique et au stress du RE, respectivement.

La protéine RPL13A active la traduction IRES-dépendante.

Afin de savoir si la protéine RPL13A peut moduler l'activité des IRES des facteurs de croissance VEGFC et FGF1 en réponse au stress du RE, nous avons procédé à la déplétion de cette protéine à l'aide d'un système de shARN (Figure 29). Des cellules HDLEC, préalablement transduites par des lentivecteurs bicistroniques Lucky Luke portant ces IRES, ont été transduites par un lentivecteur exprimant le shARN RPL13A. Le niveau de déplétion de RPL13A a été mesuré au niveau ARN et protéine après 72h, indiquant une baisse d'expression de 50% environ (Figure 29A). Les niveaux de protéine ont également été vérifié en western blot (Figure 29B). Les mesures des deux luciférases ont été réalisées suite à la déplétion et le ratio LucF/LucR a été calculé. (Figure 29C-D, Annexe table 3). La mesure des activités luciférases réalisée pour déterminer l'activité des IRES indique que la déplétion de RPL13A induit une diminution de l'activité IRES du FGF1 de 40% en l'absence de stress et de 50% environ suite au stress (Figure 29C, panel de droite). La déplétion de RPL13A tend à impacter positivement la traduction coiffe-dépendante (Figure 29 C-D, panels de gauche). Quant à l'IRES VEGFC, son activité n'est pas impactée par la déplétion de RPL13A (Figure 29D).

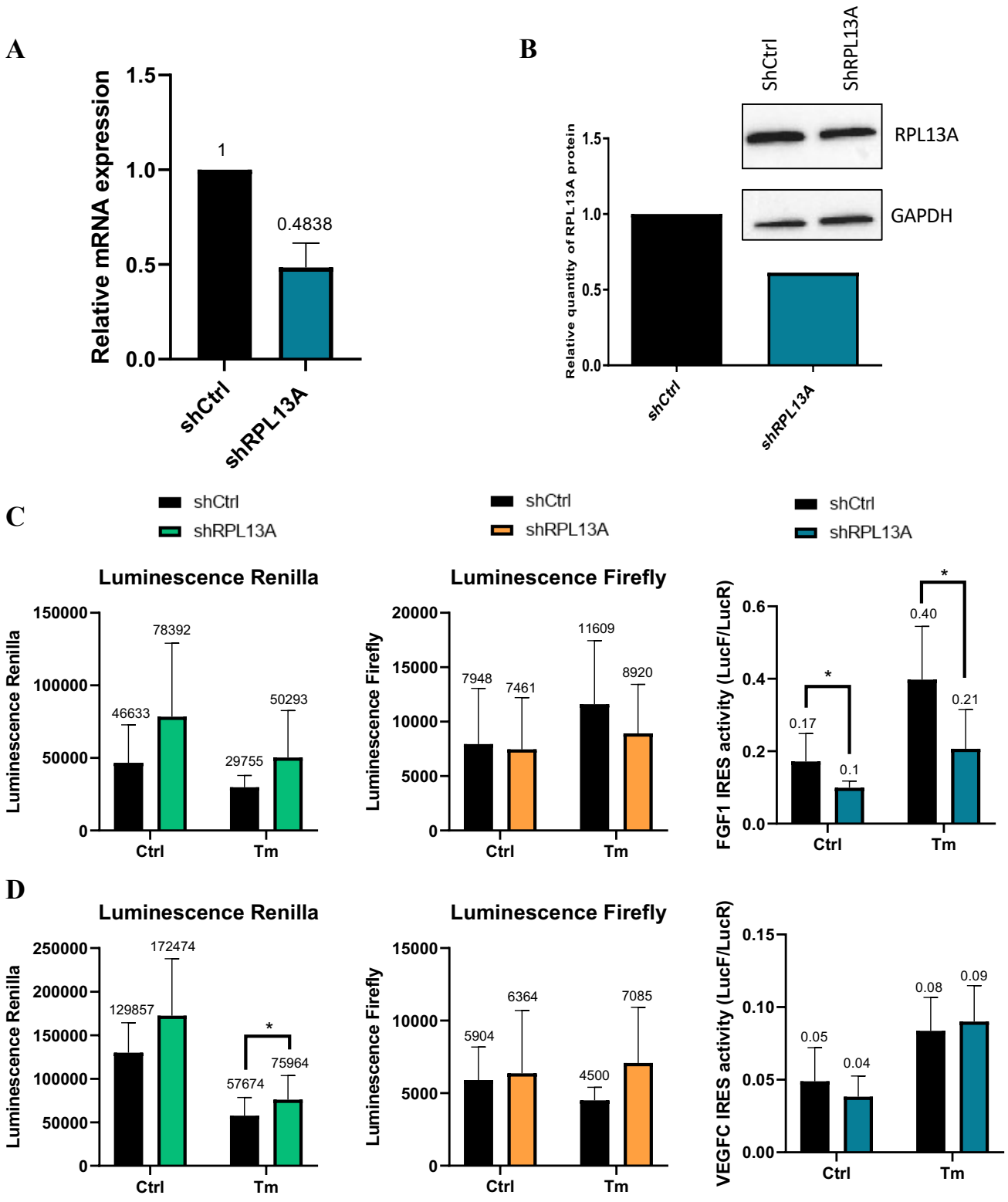


Figure 29 : Effet de la déplétion de RPL13A sur l'activité des IRES de l'ARNm du FGF1 et du VEGFC, Les cellules HDLEC ont été transduites avec un lentivecteur exprimant un shARN ciblant RPL13A (shRPL13A) ou un shARN « scramble » (shCtrl). L'efficacité de déplétion a été mesurée en RT-qPCR (A) et en Western Blot (B). L'activité de chaque luciférase a été mesuré pour les construction CRF1AL+ et CRHVCL+ (C, D) puis le ratio LucF/LucR reflétant l'activité de l'IRES. Les statistiques ont été réalisées avec un test de Mann-Withney avec n=9 ou n=6. *p<0.05, **p<0.01, ***<0.001, ****p<0.0001.

Afin de confirmer le rôle de la protéine RPL13A sur la traduction, nous avons également réalisé une surexpression de cette dernière (Figure 30). Le niveau d'ARNm RPL13A total est augmenté d'un facteur 2,2 suite à la transduction pas le lentivecteur RPL13A (Figure 30A). Étonnamment, le ratio LucF/LucR diminue pour les deux IRES, dans les cellules non stressées, et ne varie pas dans les cellules stressées (Figure 30 B-C, panels de droite). Cependant, l'analyse de l'expression de chacune des luciférases indique que RPL13A surexprimée entraîne une augmentation de 3 à 4 fois de l'expression de la LucR (Figure 30 B-C, panels de gauche). Cette augmentation est également observée dans les cellules stressées, suggérant que la RPL13A surexprimée stimule la traduction dépendante de la coiffe, et contrecarre même l'inhibition de cette traduction due au stress.

La LucF en revanche, qui est sous la dépendance traductionnelle de l'IRES, augmente d'une facteur 2 pour l'IRES du FGF1 dans les cellules non stressées mais n'est pas affectée pour ce qui concerne l'IRES du VEGFC (Figure 30 B-C, panels centraux). Dans les cellules stressées, la LucF augmente de 4 fois pour l'IRES FGF1 et de 2,3 fois pour l'IRES VEGFC. Les valeurs sont données dans la table 4 de l'annexe. Même s'il faudrait pouvoir se rapporter à la quantité d'ARNm bicistronique pour pouvoir interpréter complétement ces résultats, ils suggèrent que la protéine ribosomique RPL13A surexprimée active fortement la traduction coiffe-dépendante, ce qui ne permettait pas de voir son effet sur la traduction IRES à partir du ratio LucF/LucR. Concernant les IRES, les résultats indiquent un comportement totalement indépendant de celui de la traduction cap-dépendante : on observe une augmentation seulement en cas de stress pour l'IRES VEGFC, et une augmentation dans les deux cas pour l'IRES FGF1, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus pour la déplétion.Toutes les valeurs de luciférases sont reportées en annexe table 3-4.

En conclusion ces premiers résultats de déplétion et de surexpression indiquent que la RPL13A contrôle positivement la traduction IRES-dépendante, plus particulièrement l'IRES FGF1, mais que sa surexpression également a un effet activateur de la traduction dépendante de la coiffe.

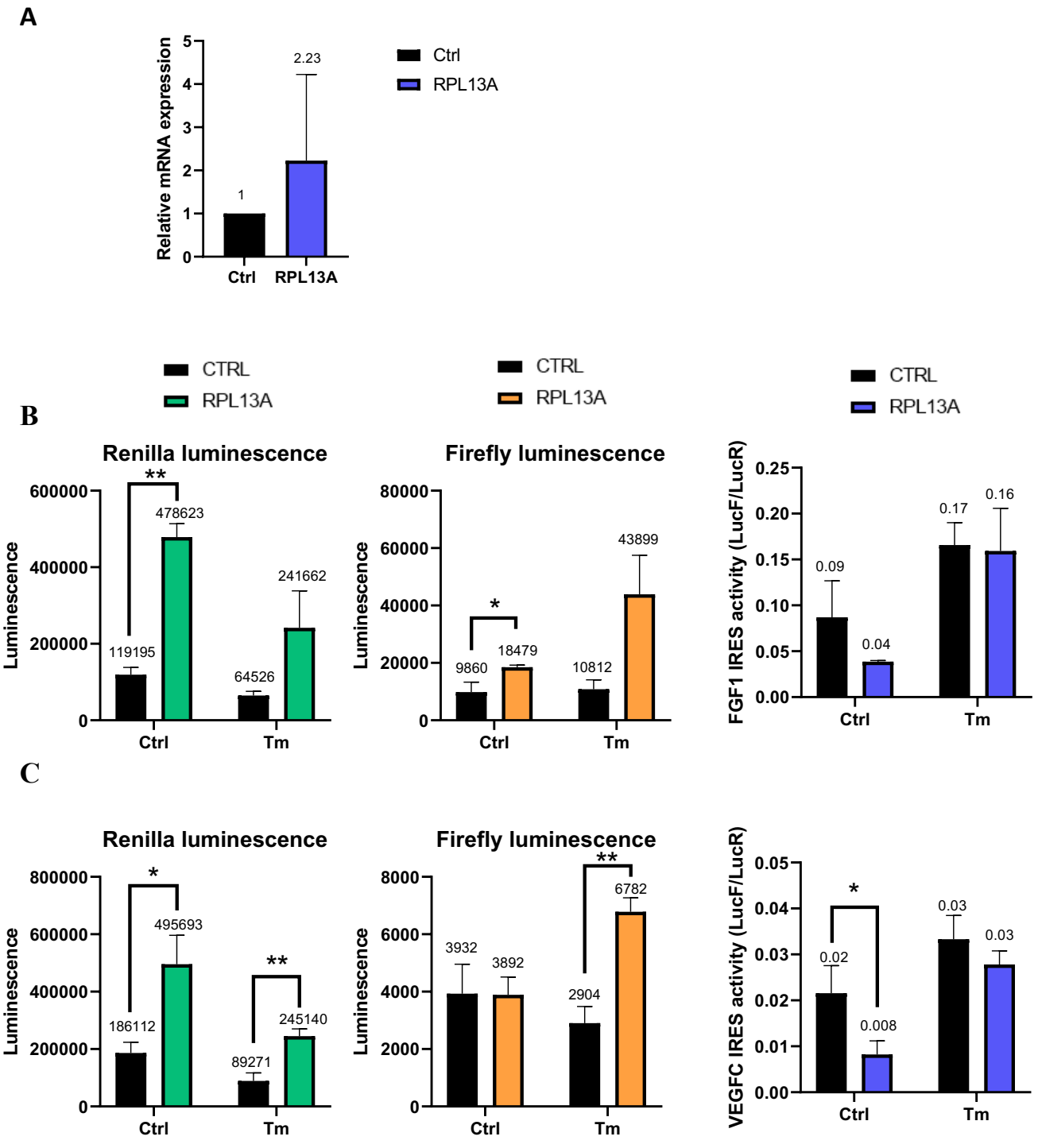


Figure 30 : Effet de la surexpression de RPL13A sur l'activité des IRES du FGF1 et du VEGFC. Les cellules HDLEC ont été transduites par le lentivecteur Lucky Luke, puis par le lentivecteur-RPL13A (RPL13A) ou aucun vecteur (Ctrl). (A) Le niveau d'ARN messager de RPL13A dans les extraits cellulaires totaux a été mesuré en RT-qPCR. L'activité de chaque luciférase a été mesuré pour les construction CRF1AL+ et CRHVCL+ sont été mesurées (B-C), puis le ratio LucF/LucR reflétant l'activité de l'IRES, Les statistiques ont été réalisées avec un test de Student avec une correction de Welch avec n=3. *p<0.05, **p<0.01, ***<0.001, ****p<0.0001

L'hélicase DHX9 régule négativement l'activité de l'IRES du FGF1 en réponse au stress génotoxique

La présence de plusieurs hélicases dans le ribo-interactome des HDLEC en réponse au stress génotoxique nous a incités à étudier leur impact sur la traduction IRES-dépendante. Nous avons donc utilisé des siARN afin de dépléter DDX17 et DXH9 dans les HDLEC transduites par les lentivecteurs bicistroniques comme ci-dessus et observé l'effet de cette déplétion sur l'activité des IRES.

La déplétion de DDX17 bien qu'efficace, n'a généré aucune variation de l'activité des IRES des ARNm du VEGFC et du FGF1 (Figure S1).

Quant à DHX9, il faut remarquer que cette hélicase est fortement surexprimée en réponse au traitement doxorubicine (Figure 31A). La déplétion de DHX9, de plus de 50% d'efficacité, induit étonnamment une augmentation de l'activité de l'IRES de L'ARNm du FGF1 lors du stress (Figure 31C). Elle paraît donc avoir un rôle d'ITAF négatif sur l'IRES du FGF1. Nous avons par la suite voulu déterminer si DHX9 interagit avec directement avec le ribosome plutôt qu'avec l'ARNm. Dans ce but, nous avons procédé à une expérience de PLA (proximity ligation assay). La technologie de PLA permet de détecter des interactions très proches entre des protéines, de l'ordre de 40 nm. Nous avons analysé l'interaction de DHX9 avec la protéine ribosomique RPS6. Les résultats révèlent un nombre important de spots de colocalisation en PLA dans le cytoplasme des cellules stressées et non stressées (Figure 31D). En moyenne, on compte 1580 spots par cellule dont seulement 102 dans le noyau, et ce indépendamment du stress. La majorité des interactions entre DHX9 et RPS6 se fait donc dans le cytoplasme, ce qui est en faveur d'une interaction directe avec le ribosome.

En conclusion, nos résultats indiquent que DHX9 régule négativement l'activité de l'IRES FGF1 et que cette hélicase interagit directement avec le ribosome.

Conclusion

L'étude protéomique réalisée ici du ribo-interactome des HDLEC soumises au stress génotoxique et au stress du RE a permis d'identifier un nombre important de protéines qui varient en réponse au stress, et qui varient différentiellement selon le stress concerné. Le stress doxorubicine a permis d'identifier plusieurs hélicases variables, parmi lesquelles nous montrons que DHX9 a un effet

inhibiteur de l'IRES du FGF1. Son interaction directe avec le ribosome suggère qu'elle pourrait intervenir dans la formation d'un ribosome spécialisé lors du stress doxorubicine. Quant à la composition ribosomique elle-même, elle nous a permis d'identifier deux protéines qui varient : RPL26 pour le stress doxorubicine et RPL13 pour le stress tunicamycine. De premiers résultats indiquent que RPL13A régule l'activité de l'IRES FGF1, mais pas celle de l'IRES VEGFC. Quant à RPL26, il est prévu de poursuivre les expériences afin de déterminer son rôle, par la même approcha que pour RPL13A.

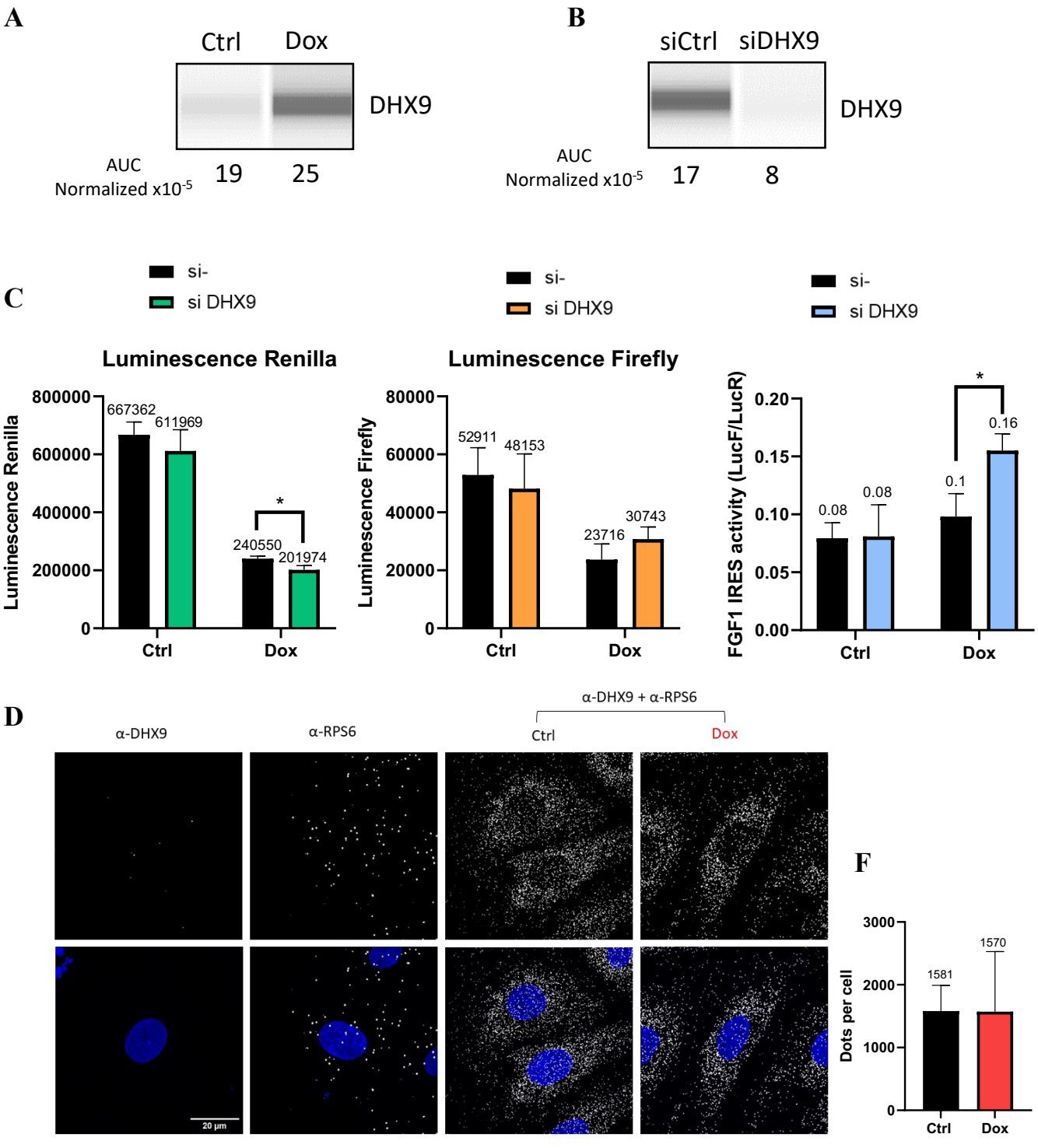


Figure 31 : Impact de la déplétion de DHX9 sur la traduction IRES-dépendante de l'ARNm FGF1. Les cellules HDLEC transduites par les lentivecteurs Lucky Luke (CRF1AL+) et ont ensuite été transfectées par un pool de siARN (Smartpool) ciblant l'ARNm de DHX9 ou par un contrôle scramble (Si-), puis stressées (Dox) ou non (Ctrl) par la doxorubicine. Le niveau de protéine DHX9 a été mesuré 72 h après la transfection par Western capillaire (A-B). L'activité des luciférases Renilla et Firefly ainsi que le ratio LucF/LucR est représenté (C). Les statistiques ont été réalisées avec un test de Student avec une correction de Welch avec n=3. *p<0.05, **p<0.01, ***<0.001, ****p<0.0001. (D) L'interaction entre RPL13A et RPS6 a été analysée par PLA (proximity ligation assay) avec des anticorps a-DHX9 et a-RPS6. Les contrôles avec chaque anticorps seul sont présentés (panels de gauche). Seuls les résultats dans les cellules stressées sont présentés. Chaque spot indique un événement de colocalisation. (F) La colocalisation a été quantifiée dans des cellules stressées ou non stressées.

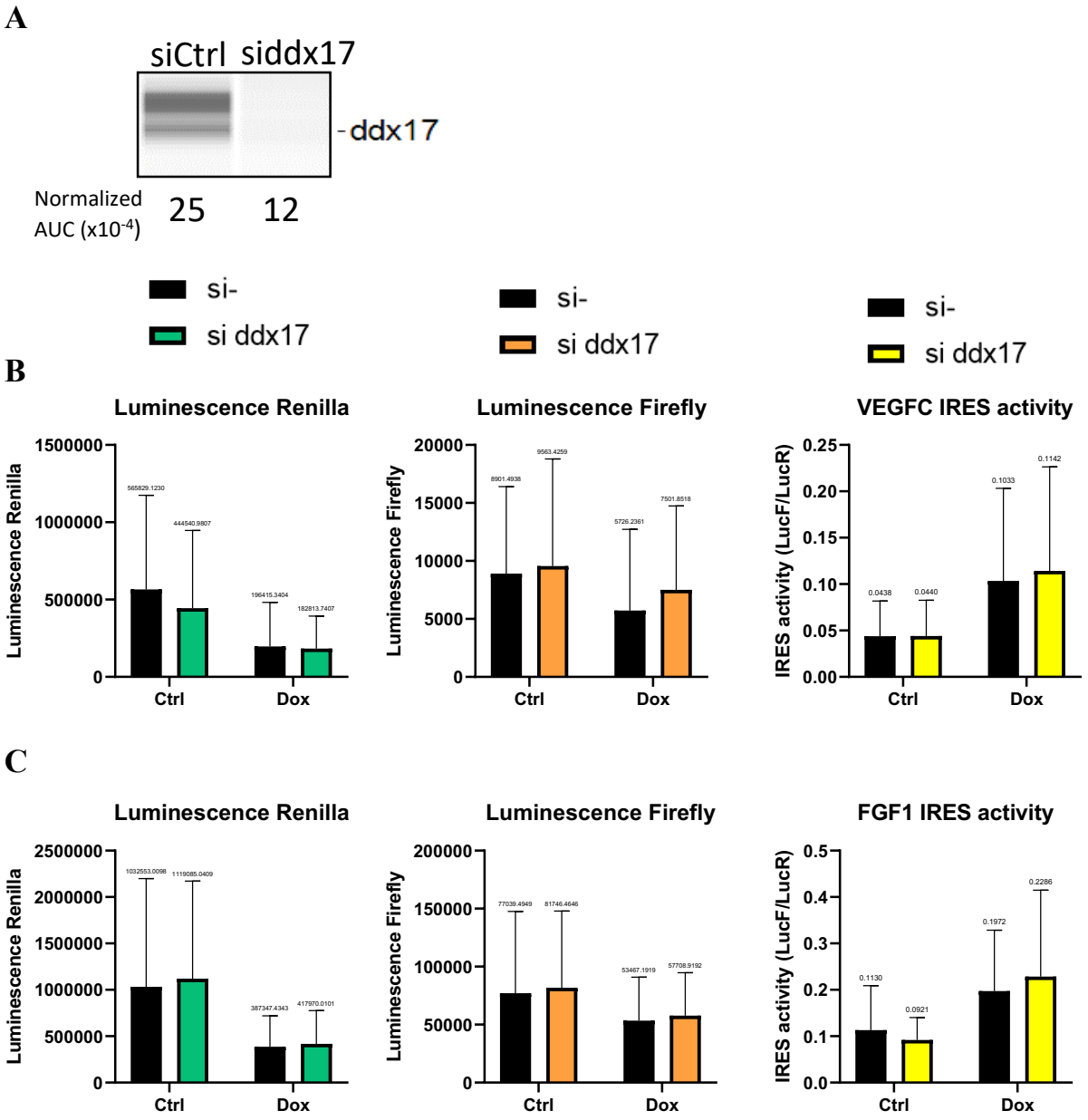


Figure S1 : Impact de la déplétion de DDX17 sur la traduction IRES-dépendante de l'ARNm FGF1 et du VEGFC. Les cellules HDLEC transduites par les lentivecteurs Lucky Luke (CRF1AL+ ou CRHVCL+) et ont ensuite été transfectées par un pool de siARN (Smartpool) ciblant l'ARNm de DDX17 ou par un contrôle scramble (Si-), puis stressées (Dox) ou non (Ctrl) par la doxorubicine. Le niveau de protéine DDX17 a été mesuré 72 h après la transfection par Western capillaire (A). L'activité des luciférases Renilla et Firefly ainsi que le ratio LucF/LucR est représenté (B-C). Les statistiques ont été réalisées avec un test de Student avec une correction de Welch avec n=3. *p<0.05, **p<0.01, ***<0.001, ****p<0.0001

Chapitre 3 : Modifications des 2'-O-méthylations des ARNr en réponse au stress dans les HDLEC

Introduction

Dans la partie précédente, nous avons observé que l'interactome ribosomique et la composition des ribosomes actifs des HDLEC sont modifiés en réponse au stress. Qu'en est-il des ARN ribosomiques ? En effet comme nous l'avons largement abordé dans l'introduction de cette thèse, les modifications des ARNr sont une source majeure d'hétérogénéité des ribosomes et peuvent conduire à « spécifier » le ribosome pour la traduction de certains messagers. Le ribosome humain contient un grand nombre de modifications post-transcriptionnelles de ses ARNr. Parmi les plus abondantes se trouvent les 2'-O-méthylations (Natchiar et al., 2017; Sloan et al., 2016). Ces modifications ont longtemps été considérées comme invariables et essentielles au sein du ribosome. Pourtant il est apparu qu'elles constituent une immense source d'hétérogénéité dynamique dans les cellules et les tissus humains. Cette variabilité a donné naissance au concept de « ribosome spécialisé », qui peut en réponse divers stimuli reprogrammer la traduction pour traduire des catégories de messagers particuliers, comme ceux possédant des sites d'entrée interne. Dans diverses pathologies et notamment le cancer, l'altération des 2'O-méthylations peut entrainer la traduction d'ARNm d'oncogène spécifiques, notamment via leur IRES, par des ribosomes reprogrammés, les « onco-ribosomes » (Marcel et al., 2013). Il a également été démontré que la modulation de la 2'O-méthylation de l'ARNr affecte la traduction d'ARNm contenant les IRES de IGF1R et du CrPV (Erales et al., 2017). Les traitements anti-cancéreux quant à eux sont connus pour altérer la biogenèse des ribosomes. Ces molécules peuvent également générer la résistance aux traitements en s'incorporant dans les particules ribosomiques et en rendant le ribosome plus affin pour des transcrits oncogéniques (Therizols et al., 2022). Les méthylations d'ARNr sont apportées par des ARN guides à boîte C/D qui reconnaissent leurs cibles par appariement de bases, permettant à la méthyltransférase, la fibrillarine, de réaliser la méthylation du 2′-OH du résidu cible. Cela fournit un système flexible qui permet de réguler le profil de méthylation de l'ARNr par l'expression et l'activation d'ARN guides. A cet égard il est intéressant de noter que les ARN à boîtes C/D sont parmi les ARN les plus dérégulés dans le cancer (Herter et al.,

2015; Su et al., 2014). De plus, La déplétion de la fibrillarine et donc l'altération des méthylations des ARNr entraîne une diminution de l'initiation de la traduction de messagers portant des IRES.

La plupart des études réalisées à ce jour sur les modifications chimiques et particulièrement les 2-O-méthylations que subissent les cellules se sont concentrées sur la cellule tumorale. Pourtant dans le contexte du cancer, les cellules endothéliales sont des actrices non négligeables du processus pathogénique et la modulation de leur expression génique représente donc un enjeu de taille. Dans un contexte de stress intense tel que celui généré par l'environnement tumoral et l'utilisation de traitements génotoxiques, une question se pose : comment les cellules qui sont les cibles privilégiées des cellules tumorales et des traitements contre le cancer régulent-elles leur expression génique ? La modification de la composition ribosomique et du ribo-interactome de ces cellules en réponse au stress nous a poussé à étudier la question des modifications chimiques de leurs ARNr. Dans la présente étude, nous avons donc procédé à une analyse par RiboMetSeq des variations de 2'-O-Methylations des ARNr dans les cellules endothéliales lymphatiques soumises au stress génotoxique par la doxorubicine et au stress du RE par la tunicamycine .

L'objectif de ce premier chapitre a donc été d'étudier l'hypothèse de ribosomes spécialisés dans les HDLEC, en réponse à deux stress, le stress du RE et le stress génotoxique doxorubicine, d'évaluer des variations des 2'-O-méthylations des ARN ribosomiques par une approche de Ribomethseq et d'identifier des sites candidats capables de contrôler la traduction IRES-dépendante.

Résultats

Profil de 2'-O-Methylation des HDLEC

Afin d'étudier le profil de méthylations des ARNr des HDLEC, nous avons réalisé une expérience de RiboMethseq, en collaboration avec l'équipe de Jean-Jacques Diaz (Lyon). Cette méthode permet de cartographier les 2'-O-méthylations en se basant sur la protection à l'hydrolyse que confère la méthylation. Elle permet aussi de quantifier leur niveau de méthylation à une position donnée (Marchand et al., 2016).

Le principe du RiboMethseq repose sur le fait que la 2-O-méthylation protège la liaison phosphodiester de l'hydrolyse (Birkedal et al., 2015; Motorin and Marchand, 2018). Une hydrolyse alcaline est réalisée sur les ARNr afin de dégrader l'ARN en petits fragments de 20 à 40 nucléotides,

suffisamment longs pour être cartographiés par alignement de séquence sur un génome de référence. Les fragments générés sont ligaturés avec des oligomères et réverse-transcrits, puis les ADNc sont séquencés. La conséquence est, qu'après une fragmentation alcaline, un nucléotide méthylé ne sera pas séparé du nucléotide N+1 en 3', on retrouvera donc rarement ce nucléotide en 3' d'un fragment. En revanche le nucléotide N+1 quant à lui ne sera pas séparé du nucléotide précédent et sera donc rarement retrouvé en 5'. Les fragments d'ARN se terminant par 3′-Nm et commençant au nucléotide N + 1 sont sous-représentés dans le pool séquencé, créant un écart caractéristique dans le profil des extrémités 5′/3′. A partir de cette observation, la technique consiste à comptabiliser le nombre de fois où chaque nucléotide est présent en 5' et en 3' des fragments générés. Le nucléotide méthylé sera en 5' à une fréquence normale mais rarement en 3', à l'inverse le nucléotide N+1 sera présent en 3' à une fréquence normale mais rarement en 5'. La fréquence d'apparition en 3' et en 5' de chaque nucléotide est calculée et cela permet de déterminer la présence ou non d'une méthylation à un nucléotide donné.

Nous avons d'abord établi une carte de référence de l'ARNr 2′-O-Me dans les cellules HDLEC, en utilisant trois réplicas biologiques indépendants. En plus de la cartographie des sites 2′- *O* -Me, le RMS fournit une mesure de la fraction de molécules modifiées sur un site particulier. Afin d'étudier les différences de méthylations sur les sous-unités libres des ribosomes, les monosomes ou les ribosomes en cours de traduction active (les polysomes), nous avons réalisé des fractionnements sur gradient de sucrose. Les ARN ont été extraits de ces fractions et l'analyse par la méthode RMS décrite au-dessus a été réalisée. Les résultats ont été exprimés en score RMS correspondant à la fraction de molécules méthylées à une position donnée. Un score RMS a été tabulé pour toutes les positions. Un total de 112 sites (validé dans la littérature) a été détecté, comprenant 42 sites dans la petite sous-unité donc dans l'ARNr 18S ainsi que 70 sites dans la grande sous unité, incluant 68 sites dans l'ARNr 28S et 2 sites dans l'ARNr 5,8S (Figure 32 et Annexe Table 6). Parmi les 112 sites identifiés, les niveaux de méthylations varient de 0 à 0,99. Cela démontre que dans une même lignée, toutes les molécules ne sont pas entièrement et également 2'O-méthylées. Dans les HDLEC, la grande majorité des sites sont entièrement ou presque entièrement méthylés (Methscore >0.90). On retrouve en proportion des valeurs similaires à ce qui a déjà identifiée dans la littérature, à savoir deux tiers des sites pleinement méthylés contre un tiers partiellement méthylé (Erales et al., 2017; Krogh et al., 2016). La majorité des sites sont méthylés dans plus de 90% des ribosomes. La distribution des scores est représentée sur la figure S2, on y retrouve également le pourcentage de site fortement ou faiblement méthylé avec un seuil à 0.9.

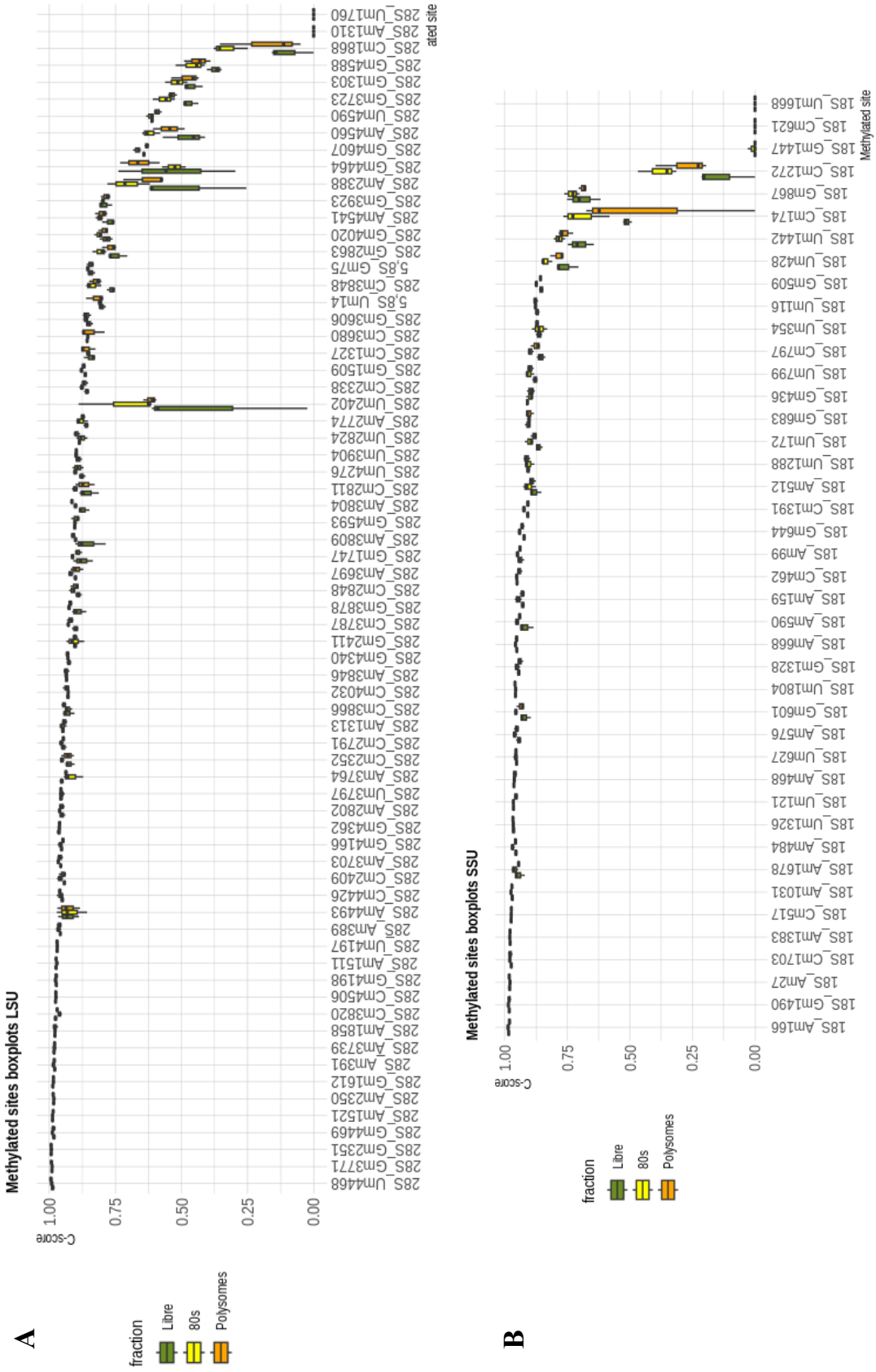


Figure 32: Profil de 2'-O-méthylation des ARNr dans les HDLEC. Les scores de méthylations attenants à chaque site sont représentés en A-B. Les scores s'étendent de 0 à 1 par ordre croissant de niveau de méthylation. (A) Box plot représentant les scores de méthylation des ARNr présents dans la grande sous-unité du ribosome. (B) Box plot représentant les scores de méthylation des ARNr présents dans la petite sous-unité du ribosome. Le boxplot montre le niveau moyen du MethScore (barre centrale) et les quartiles (bordures et moustaches des boîtes).

On observe une tendance globale qui fait que plus les sites sont peu méthylés, plus ces derniers sont variables. En analysant les comportements des sites entre les différentes fractions (libres, monosomes et polysomes), il s'avère que sur la plupart des sites fortement méthylés les scores sont identiques entre les fractions. Au contraire, les sites plus faiblement méthylés présentent plus de variations de niveau de méthylation entre les fractions. Notamment, les sites 28S-Cm1868, -Am2388, -Gm4464, -Am4560, -Gm3723 et –Gm1303, ainsi que les sites 18S-Um428, -Um442 et Cm-1272, sont plus fortement méthylés dans la fraction monosome que dans les fractions libres et dans les polysomes (Figure 1A-B). Les variations sont statistiquement significatives pour les sites 28S-Am4560, 28S-Gm3723, 28S-Gm4588, 18S-Um428, 18S-Um1442 et 18S-Cm1272. On retrouve 18 des sites parmi les plus variables. Les scores de tous les sites sont répertoriés en annexe table 6. Ces sites partiellement méthylés suggère que le pool de ribosomes est de composition hétérogène soit au sein d'une même cellule, soit entre les cellules et conforte la notion de ribosomes spécialisés.

Le stress induit par la doxorubicine ou par la tunicamycine affecte différemment la méthylation des sites variables dans les monosomes et polysomes par rapport aux sous-unités libres.

Nous avons ensuite voulu savoir si le stress cellulaire généré par la doxorubicine et par la tunicamycine pouvait modifier les profils de 2'-O-Me dans les ARNr des HDLEC. Pour répondre à cette question, nous avons traité les cellules durant 6h avec de la doxorubicine ou de la tunicamycine ou aucun traitement. Afin de maximiser nos chances de percevoir des variations, nous avons également soumis deux autres groupes à ces traitements mais cette fois avec une récupération de 24h après le traitement. En effet, la demie-vie des ribosomes pour des cellules en culture est d'en moyenne 20h, il faut donc 20h pour que la moitié du pool de ribosome soit dégradé et qu'un pool de ribosome nouveau soit synthétisé. Les 6h de stress suivi des 24h de récupération laissent le temps de percevoir des modifications issues d'un nouveau processus de biogenèse. Nous avons ensuite procédé à un fractionnement sur gradient de sucrose afin de récupérer les fractions de sous-unité libres 40/60S, les monosomes ainsi que les polysomes. Les profils des gradients obtenus sont présentés en Figure 33. Les profils polysomiques sont représentés figure 33 A-E, on peut observer une baisse des polysomes dans les profils traités avec la doxorubicine et la tunicamycine, ainsi qu'une élévation du 80S. Ce phénotype semble s'accentuer lorsque l'on réalise la récupération en condition dox. Les ratios polysomes sur monosomes ont été calculés (Figure 33 F-I) et on peut voir une baisse de moitié du ratio reflétant une baisse de la traduction globale suite aux traitements. En condition de traitement doxorubicine, la baisse du ratio s'accentue lorsque l'on réalise une récupération, tandis que la récupération semble plus efficace en condition de traitement tunicamycine puisque le ratio réaugmente.

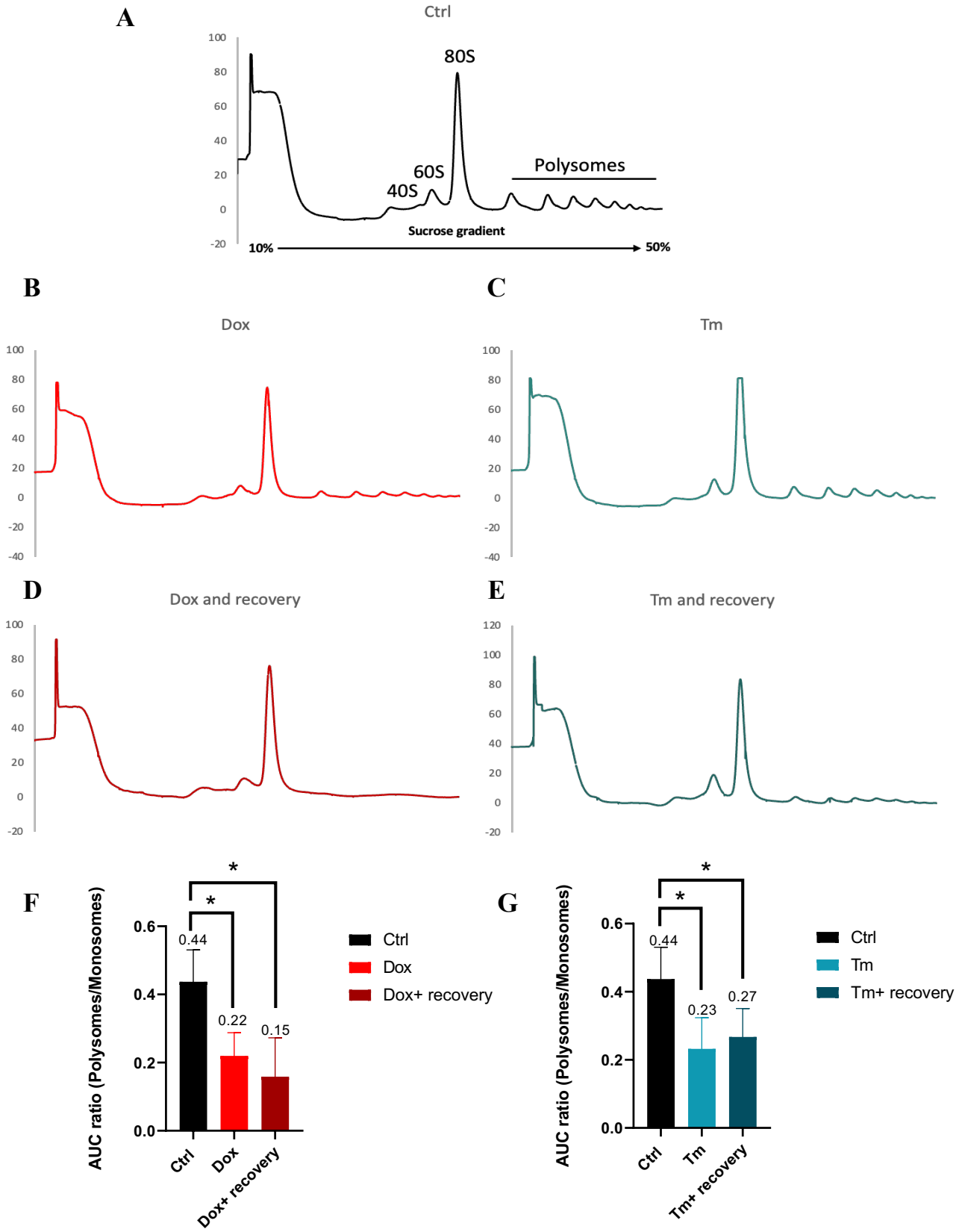


Figure 33 : Profils polysomiques après traitement doxorubicine ou tunicamycine. Les cellules ont été traitées avec de la doxorubicine ou de la tunicamycine durant 6h avec ou sans récupération de 24h. Les lysats cellulaires ont ensuite été fractionnés sur gradient de sucrose. (A-E) profils polysomiques. (F-I) ratios P/M.

Ces données montrent que les traitements doxorubicine et tunicamycine bloquent la traduction globale. La récupération ne semble efficace que pour le traitement tunicamycine.

Le RiboMethSeq permet de réaliser l'étude de plusieurs échantillons en parallèle, et rend possible les comparaisons des profils de méthylations. Ces comparaisons sont représentées en figures 34-37 (Les scores sont disponibles en Annexe table 7). On peut y voir la comparaison entre les échantillons de HDLEC n'ayant pas reçu de traitement et ceux ayant reçu un traitement avec ou sans récupération. L'analyse est séparée par fraction (libres, monosomes et polysomes). On observe que sur la majorité des sites, les traitements n'ont peu ou pas d'impact sur le niveau de méthylation. Sur les sites de la grande sous-unité, dans les fractions libres on observe peu de variations dans les sites les plus méthylés et donc les moins variables, à mesure que l'on s'approche des sites les plus partiellement méthylés, on commence à observer des variations plus importantes entre nos différentes conditions (Figure 34A). Dans cette fraction, la tendance observée semble être une hausse de la méthylation en condition de traitement doxorubicine, les sites 28S-Cm1868, 28S-Gm3723 et 28S-Gm4588 sont significativement plus méthylés en réponse au traitement dox. Deux de ces sites avaient été identifiés comme variables entre les fractions libres versus 80S et polysomes dans la figure 32. A l'inverse de la tendance observée dans les fractions libres, le traitement doxorubicine affecte négativement les scores de méthylation dans les fractions monosomiques, notamment après récupération (Figure 34B). Les sites 28S-Gm1303, 28S-Cm2338, 28S-Am2388, 28S-Am4560 et 28S-Gm4588 ont des scores de méthylation significativement plus bas en réponse au traitement. Enfin, dans les fractions polysomales, on retrouve une tendance similaire à celle des monosomes, avec une baisse du score de méthylation dans la condition de traitement à la dox (Figure 34C). Les sites les plus faiblement méthylés et les plus variables semblent être plus affectés par le traitement doxorubicine. La récupération quant à elle fait encore plus décroître le score de méthylation. Les sites 28S-Gm4464, 28S-Gm3723 ainsi que 28S-Am2388 sont significativement moins méthylés après récupération (mais on avait observé qu'il n'y a en fait pas de récupération).

Dans les sites de la petite sous-unité, on observe le même comportement de la méthylation en réponse à la doxorubicine (Figure 35). Les sites 18S-Cm1272 et 18S-Cm174 voient leurs scores de méthylation augmenter dans les fractions de sous-unité libre alors que dans les monosomes et les polysomes, leur score baisse.

Dans l'ensemble, un comportement différent des sites variables se dégage si on compare les fractions libres avec les fractions monosomes ou polysomes. Dans les sous-unités libres, le traitement doxorubicine fait augmenter le score de méthylation, tandis que dans les sous-unités 80S et dans les polysomes, la doxorubicine fait baisser ces scores.

A **LSU Free fraction**



B **LSU 80S fraction**



C **LSU Polysomes fraction**

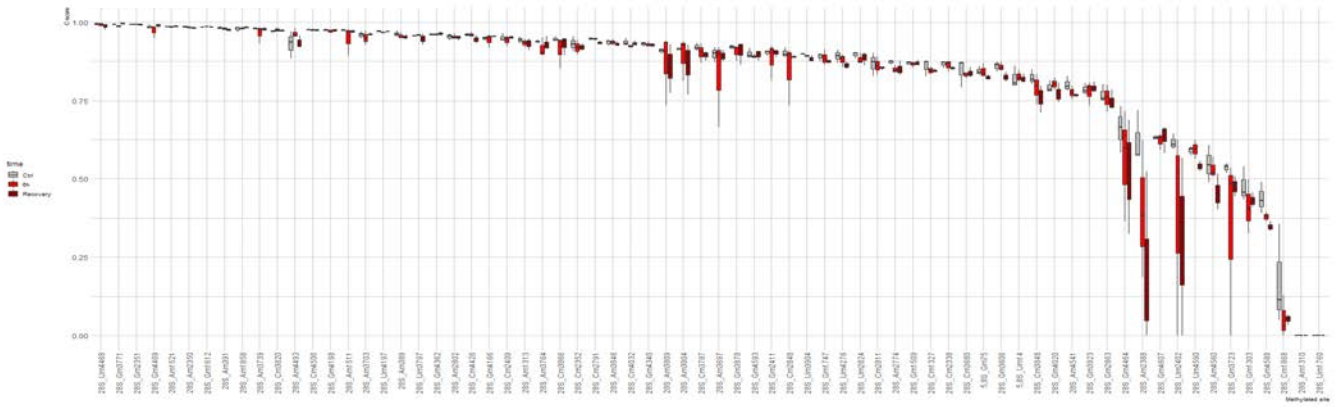
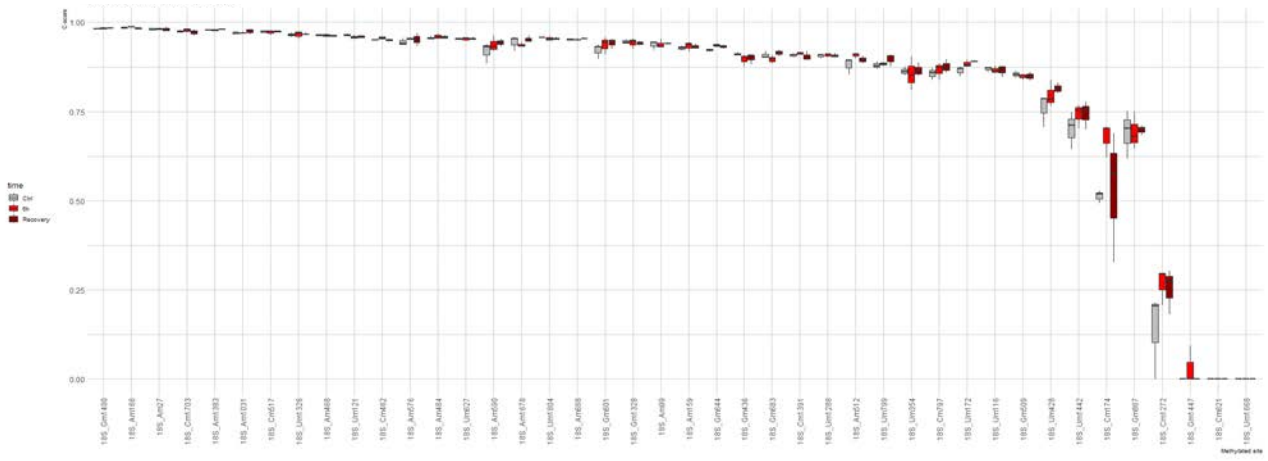


Figure 34 : Méthylation des sites de la grande sous-unité (LSU) après traitement doxorubicine. Les scores de méthylation attenants à chaque site sont représentés en A-C. Les Box plots représentent les scores de méthylation pour chacun des sites des ARNr 28S et 5,8S, après 6h traitement doxorubicine avec ou sans récupération, dans les sous-unité 60S libres (A), dans les monosomes 80S (B) et dans les polysomes (C).

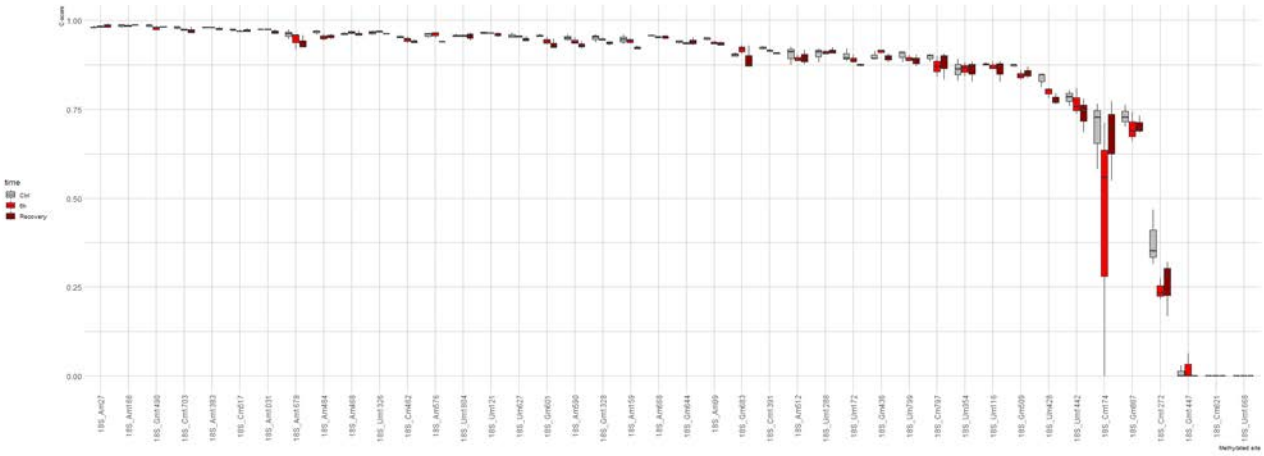
A

SSU Free fraction



B

SSU 80S fraction



C

SSU Polysomes fraction

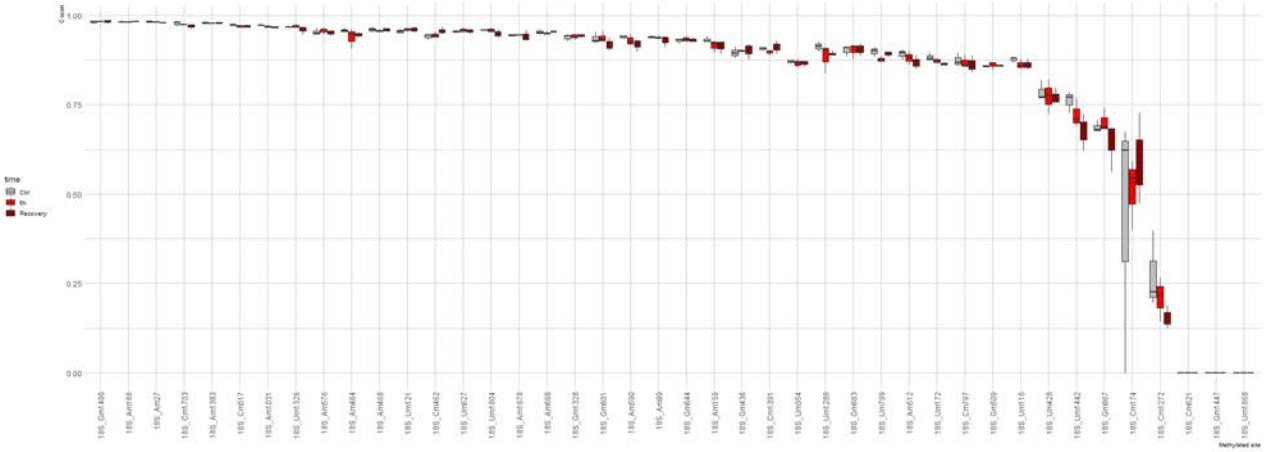
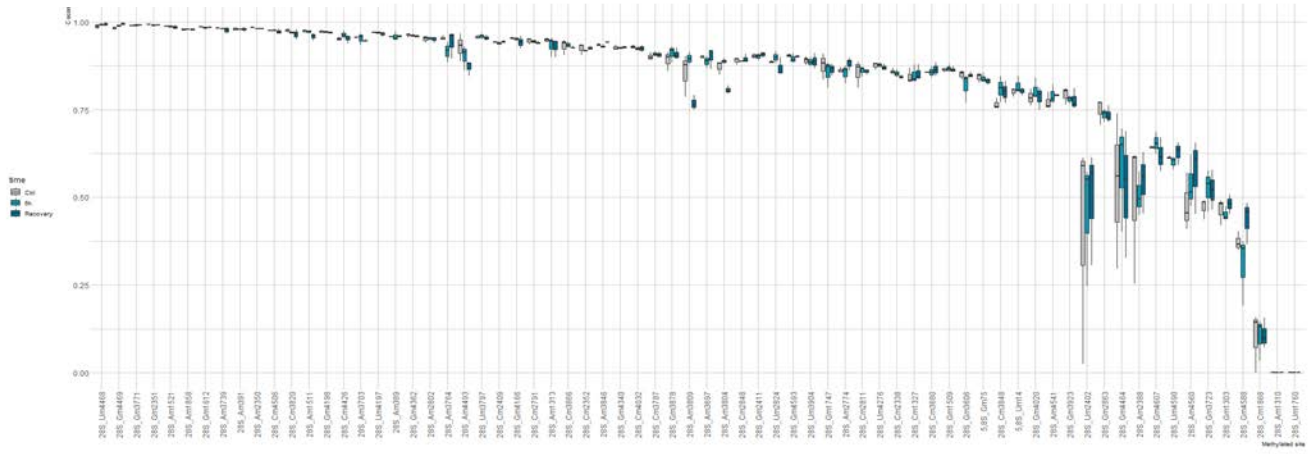
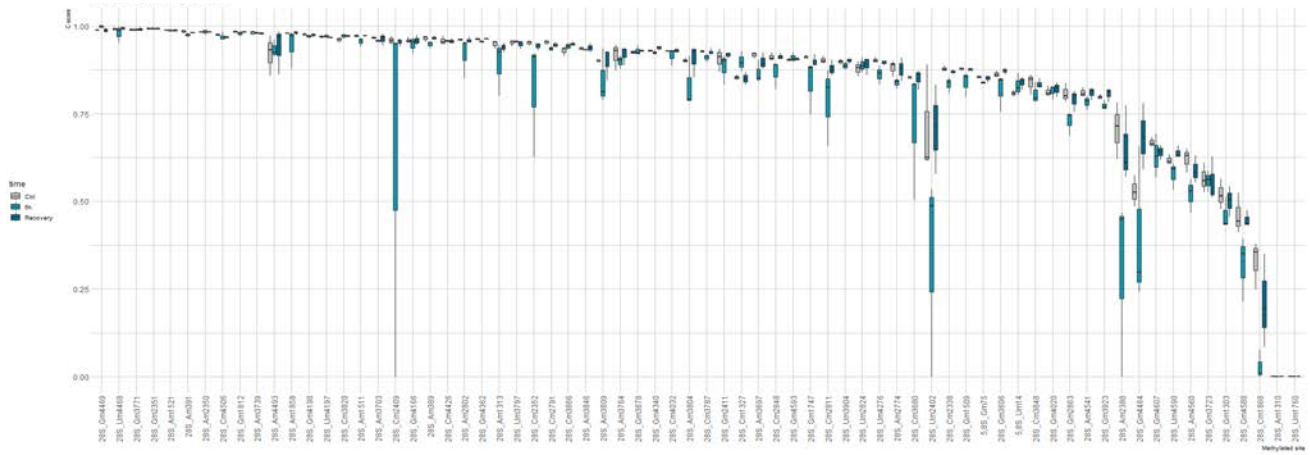


Figure 35 : Méthylations des sites de la petite sous-unité (SSU) après traitement doxorubicine. Les scores de méthylation attenants à chaque site sont représentés en A-C. Les Box plots représentent les scores de méthylation pour chacun des sites de l'ARNr 18S, après 6h traitement doxorubicine avec ou sans récupération, dans les sous-unités 40S libres (A), dans les monosomes 80S (B) et dans les polysomes (C).

A **LSU Free fraction**



B **LSU 80S fraction**



C **LSU Polysomes fraction**

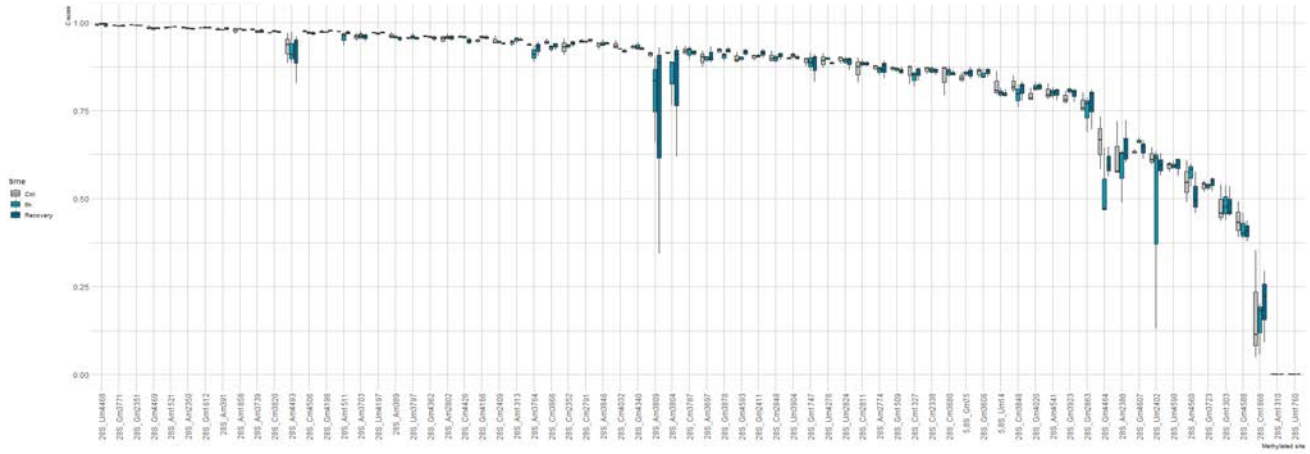
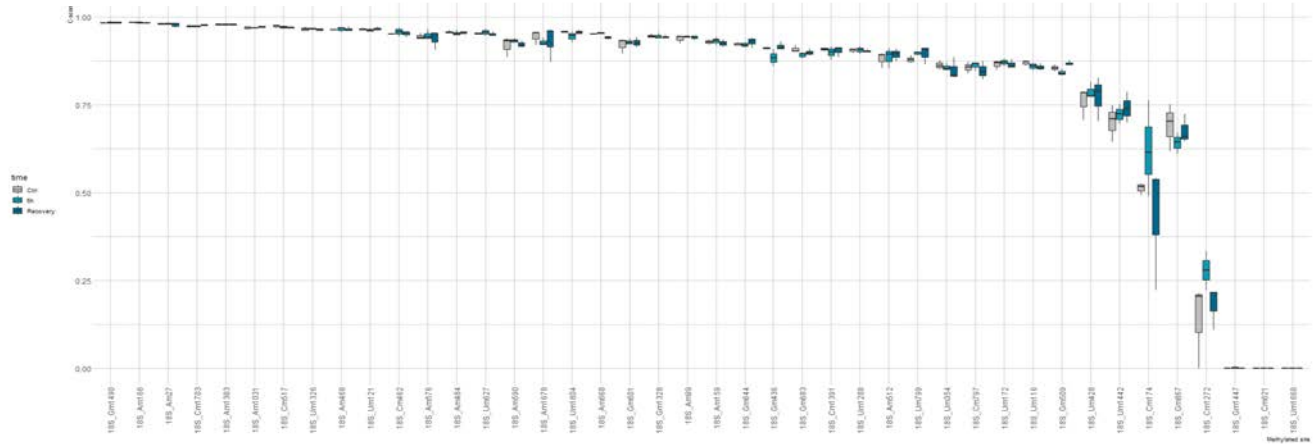


Figure 36 : Méthylations des sites de la grande sous-unité (LSU) après traitement tunicamycine . Les scores de méthylation attenants à chaque site sont représentés en A-C. Les Box plots représentent les scores de méthylation pour chacun des sites des ARNr 28S et 5,8S, après 6h traitement tunicamycine avec ou sans récupération, dans la sous-unité 60S libre (A), dans les monosomes 80S (B) et dans les polysomes (C).

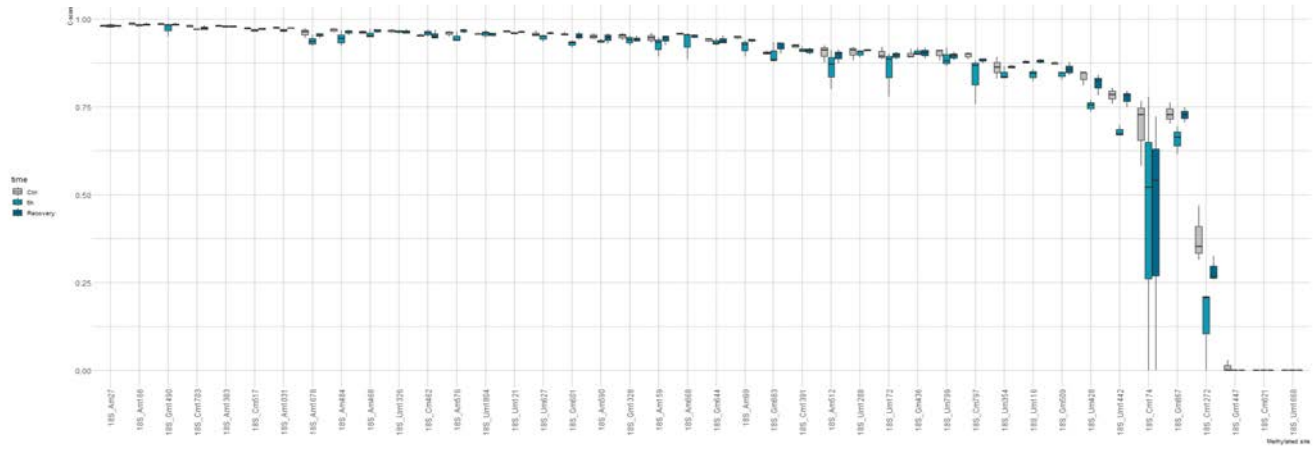
A

SSU Free fraction



B

SSU 80S fraction



C

SSU Polysomes fraction

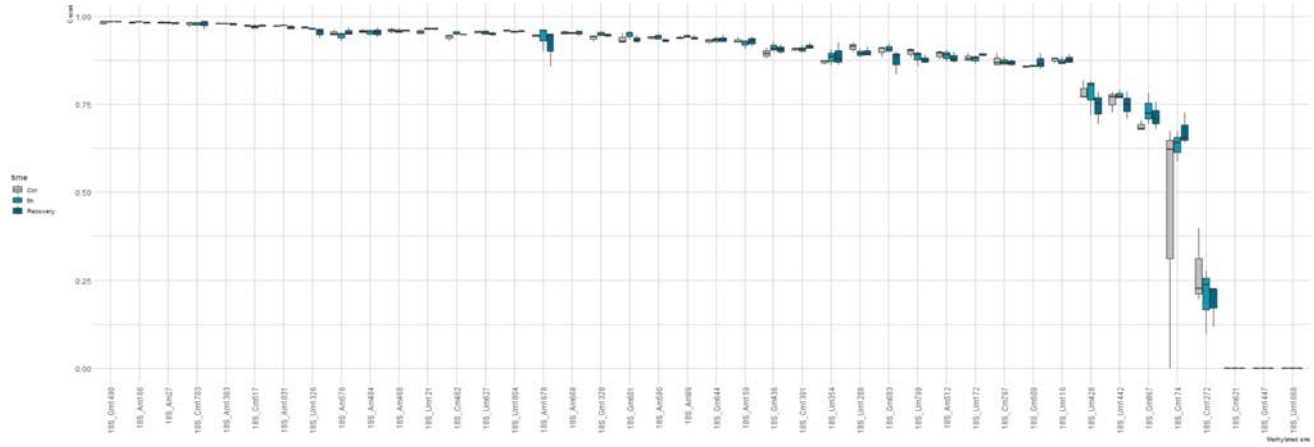


Figure 37 : Méthylations des sites de la petite sous-unité (SSU) après traitement tunicamycine. Les scores de méthylation attenants à chaque site sont représentés en A-C. Les Box plots représentent les scores de méthylation pour chacun des sites de l'ARNr 18S, après 6h traitement tunicamycine avec ou sans récupération, dans les sous-unités 40S libres (A), dans les monosomes 80S (B) et dans les polysomes (C).

Les mêmes comparaisons ont été effectuées en conditions de traitement à la tunicamycine (inducteur de stress de RE) (Figure 36-37). L'analyse des 3 sous-unités confirme que les sites les moins méthylés sont les plus impactés par les traitements, bien que quelques sites des grandes sous-unités des fractions 80S et polysomes dérogent à cette règle. En ce qui concerne le sens de la variation, il ne présente pas d'homogénéité pour les sous-unités libres. En revanche, dans les fractions 80S, les scores de méthylation baissent suite au traitement tunicamycine pour les sites 28S-Am4560, 28S-Gm4464, 28S-Gm2863. De plus cette baisse est restaurée par la lors de la récupération (Figure 36B, Figure 37B). Dans les polysomes, les fluctuations ne semblent moins synchrones, bien qu'une tendance à la baisse soient observable pour la majorité des sites variables. (Figure 36C, Figure 37C).

Afin de voir si les échantillons pouvaient être regroupés en fonction de leur niveau de méthylation et dégager un comportement similaire résultant des traitements, nous avons utilisé des outils de regroupement. Une « heat map » est représentés en Figure 38. Le regroupement se fait en deux dimensions, il regroupe tout d'abord entre eux les sites qui se comportent de façon identique, on retrouve donc un premier bloc 100% méthylé (en haut) ainsi que 5 autres blocs de moins en moins méthylés. Il n'y a pas de différence importante observée entre les échantillons, car aucun bloc vertical ne se dessine. La seconde dimension est la séparation des conditions (visualisable en haut). Notre regroupement n'a pas permis de regrouper les échantillons traités entre eux, ni les fractions entre elles, même si on voit dans le groupe sous-méthylé jaune-clair qu'il y a des sites sous-méthylés correspondant majoritairement à des échantillons traités Dox ou Tm. Un regroupement hiérarchique est montré en Figure 39, ici les groupes sont séparés par traitement et temps de traitement, malgré cela, on ne distingue toujours pas de comportement différentiel global entre les différentes conditions de traitements.

En conclusion, ces données montrent que les traitements doxorubicine et tunicamycine n'altèrent pas de façon drastique le paysage de 2'-O-Me dans les cellules HDLEC. La plupart des sites ne sont pas affectés par les traitements et conservent de forts niveaux de méthylation. Cependant, des écarts de comportements apparaissent clairement entre les différentes conditions sur des sites individuels correspondant à des sites variables.

Pour la suite de l'analyse, nous avons donc décidé de focaliser notre attention sur les 18 sites qui présentent des variations selon les conditions.

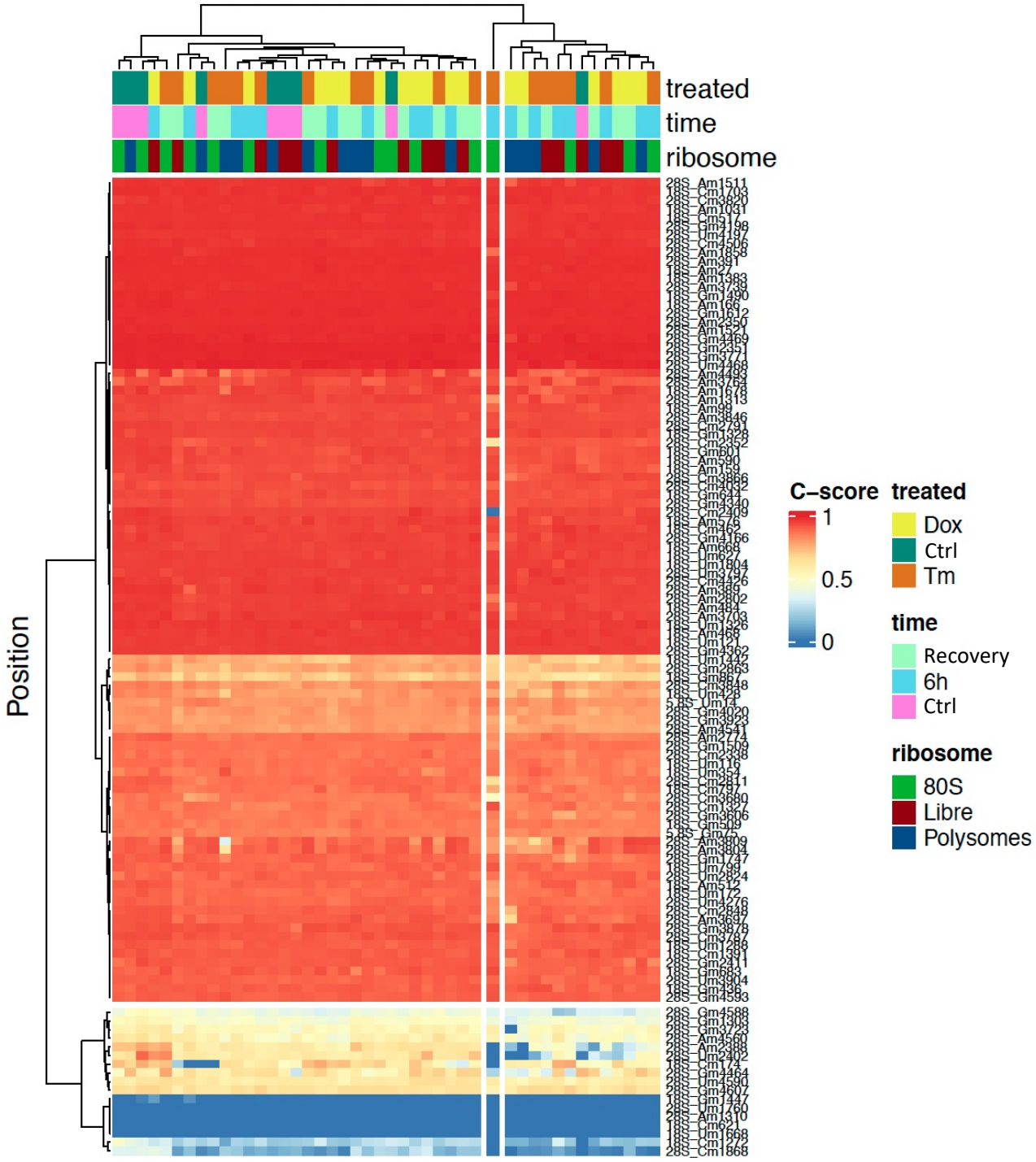


Figure 38 : Regroupement des sites de méthylation. Heat Map représentant les sites de méthylation (à droite) et les échantillons correspondant aux différents traitements (en bas) Le C-score est représenté selon un gradient de couleur bleu : 0 ; rouge : 1.

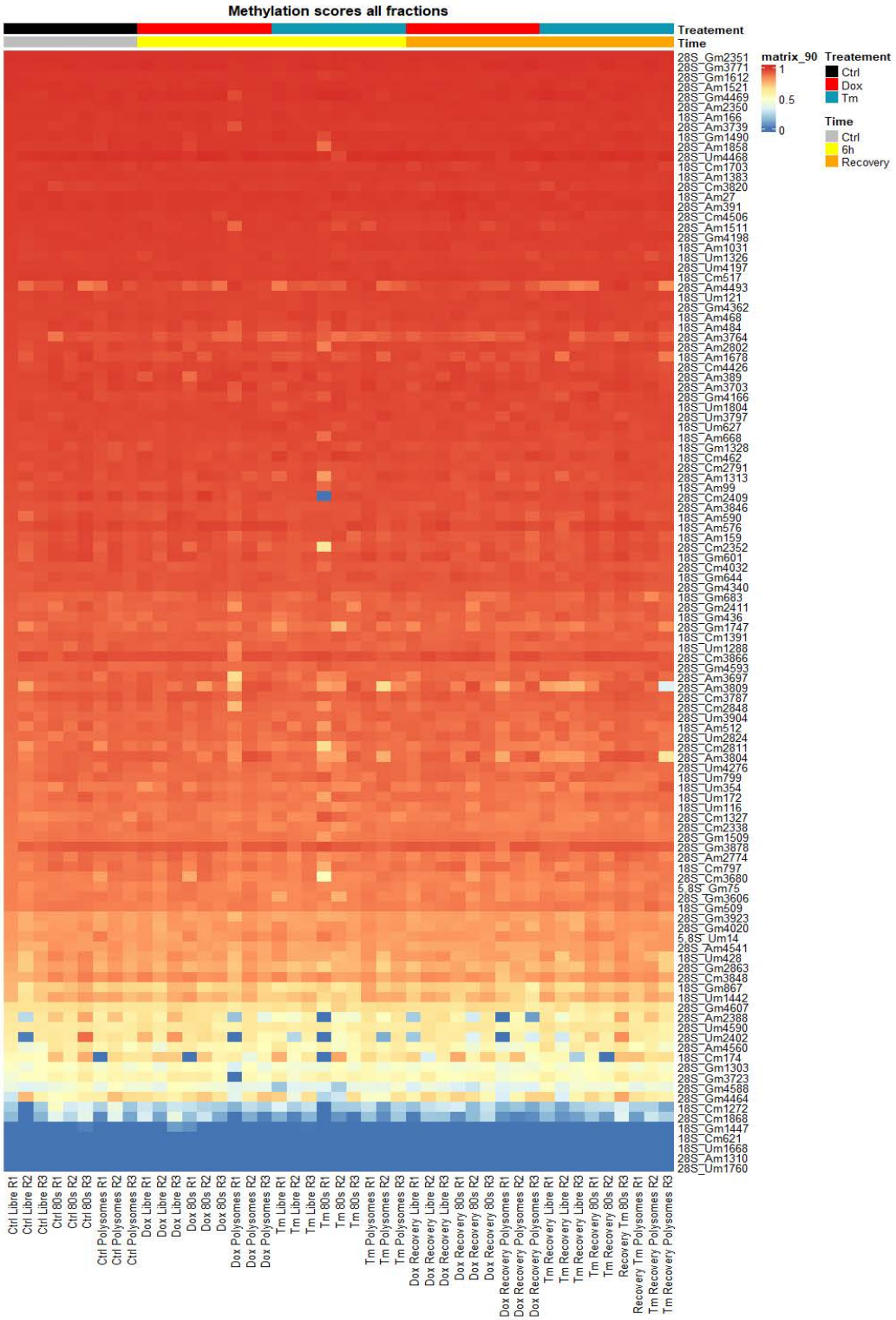


Figure 39 : Regoupement hierarchique des sites de méthylation. Heat Map représentant les sites de méthylation (à droite) et les échantillons provenant des différents traitements (en bas). Le C-score est représenté selon un gradient de couleur bleu : 0 ; rouge : 1.

Le stress induit des changements dans la 2'-O-Me de sites spécifiques

Nous avons donc décidé de nous concentrer sur les 18 sites statistiquement variables entre les conditions. De la même façon que précédemment, nous avons voulu savoir si les variations observées pouvaient nous permettre de séparer les échantillons entre eux en fonction des traitements. Nous avons donc réalisé le même regroupement sur les 18 sites variants. Bien que ces sites soient tous variants, leurs comportements ne sont pas regroupables (Figure S3-5). Ces données suggèrent que les variations observées ne sont pas toujours synchrones. Cependant, en analysant individuellement les 18 sites variables identifiés ci-dessus, on confirme pour chaque fraction la tendance observée sur les figures 4 à 7 (Figure 40). On observe un comportement intéressant de la méthylation des sites en réponse au traitement doxorubicine. Dans plusieurs cas comme par exemple pour le site 18S-Cm-1272, le traitement de 6h (dox) engendre une baisse du score de méthylation dans les 80S et les polysomes, alors que dans les fractions libres, on observe une augmentation de la méthylation. Après récupération, le même profil est observé pour la doxorubicine, alors qu'en condition de stress du RE, un retour aux valeurs contrôles est observé. Ces observations vont de pair avec le comportement des cellules en culture, qui ont bien mieux récupéré après traitement Tm qu'après traitement Dox. Ces données vont également de pair avec les profils de polysomes où on peut observer un début de récupération de la traduction dans la condition Tm+Recovery, ce qui n'est pas le cas avec le traitement doxorubicine. On observe le même comportement en réponse au traitement Dox pour presque tous les sites : 18S-Um1442, 28S-Am2388, 28S-Am3804, 28S-Am3809, 28S-Am4560, 28S-Cm1868, 28S-Um2402. Pour certains sites comme 18S-Um1442 ou 28S-Gm2863 on retrouve le même comportement mais moins marqué, sans doute à cause du fort taux de méthylation basal du site. Le traitement tunicamycine donne des profils plus hétérogènes, si ce n'est une caractéristique commune à tous ces sites : un retour aux valeurs basales en condition de récupération.

Ces données démontrent que pour plusieurs positions, le traitement à la doxorubicine engendre une diminution du score de méthylation dans les 80S et dans les Polysomes, alors qu'il augmente dans les sous-unités libres. Cela suggère un switch entre les ribosomes engagés et les ribosomes non engagés en réponse au stress.



Figure 40 : Représentation des 18 sites les plus variables. Les box-blot représentés illustrent le comportement de méthylation au niveau des 18 sites significativement variables. La légende est indiquée en bas de la figure et les scores de méthylation sont disponibles dans la table 7 de l'annexe.

Les snoARN guides à boîtes C/D sont dérégulés en réponse au stress

Nous nous sommes ensuite demandé si les changements de méthylation pour chaque site se produisaient de manière coordonnée avec l'expression du snoARN correspondant. Nous avons donc mesuré l'expression des snoARN guides pour plusieurs des sites signicativement variants en PCR quantitative. Le tableau de correspondance des SNORD par rapport aux sites de méthylation est présenté en figure 41A. En réponse à la doxorubicine, de nombreux snoARN sont régulés négativement de façon significative, notamment après 24h de récupération (Figure 41B-C). Dans la plupart des cas, il est possible de faire une corrélation positive entre le niveau des snoARN et les niveaux de méthylation. Après un traitement Dox suivi d'une récupération de 24h, les niveaux réduits d'expression

des SNORD66, SNORD45C, SNORD61, SNORD68, SNORD119, SNORD91A et les SNORD143/144 corrèlent avec la baisse des scores de méthylation aux sites correspondants dans les polysomes et les monosomes. En revanche, le niveau inchangé d'expression du SNORD79 quel que soit le temps de traitement, indique que la variation de régulation du niveau de méthylation au site 28S-Am3809 n'est pas dû au niveau d'expression de son snoARN. Étonnement, contrairement aux autres snoARN, l'expression du SNORD30 qui guide la méthylation sur le site 28S-3804 ne semble être affectée qu'a 6h de traitement. A l'inverse, les SNORD119 et le SNORD sans nom qui guident la méthylation sur le site 28S-1868 sont drastiquement affectés par le traitement aux deux temps.
En réponse au traitement à la tunicamycine, à l'opposé de ce qu'on observe avec la doxorubicine, l'expression de plusieurs SNORD augmente significativement, en particulier en l'absence de récupération (Figure 41 D-E). Cette augmentation concerne SNORD45C, SNORD61, SNORD68, SNORD91B et SNOD143. Ils reviennent tous à la normale avec la récupération, ce qui pourrait expliquer que les niveaux de méthylation, eux aussi, reviennent à la normale.
Prises ensemble, ces données montrent pour plusieurs sites une corrélation positive entre le comportement de méthylation et l'expression des snoARN guide. Pour ces sites la variation de méthylation pourrait être régulé par les niveaux d'expression des SNORD.

Représentation 3D des variations de 2'-O-Me

Étant donné que la majorité des nucléotides 2'-O-méthylés sont localisés dans des domaines fonctionnels des ARNr, nous avons cherché à connaître la localisation des nucléotides modifiés par le stress au sein du ribosome (Figures 42 et 43). Chaque site a été cartographié sur la structure 3D du ribosome 80S humain obtenue par Cryo-EM et s'est vu attribuer une couleur en fonction du delta de variation par rapport au non traité (voir échelle Figure 42). On constate que dans les polysomes, à part

A

Site	SNORD
18S-Cm1272	SNORD66
18S-Cm174	SNORD45C
18S-Um1442	SNORD61
28S-Am2388	SNORD68
28S-Am3804	SNORD30
28S-Am3809	SNORD79
28S-Am4560	SNORD119
28S-Cm1868	snoDB1253
28S-Gm4464	SNORD69
28S-Gm4588	SNORD91B/A
28S-Um2402	SNORD143/144

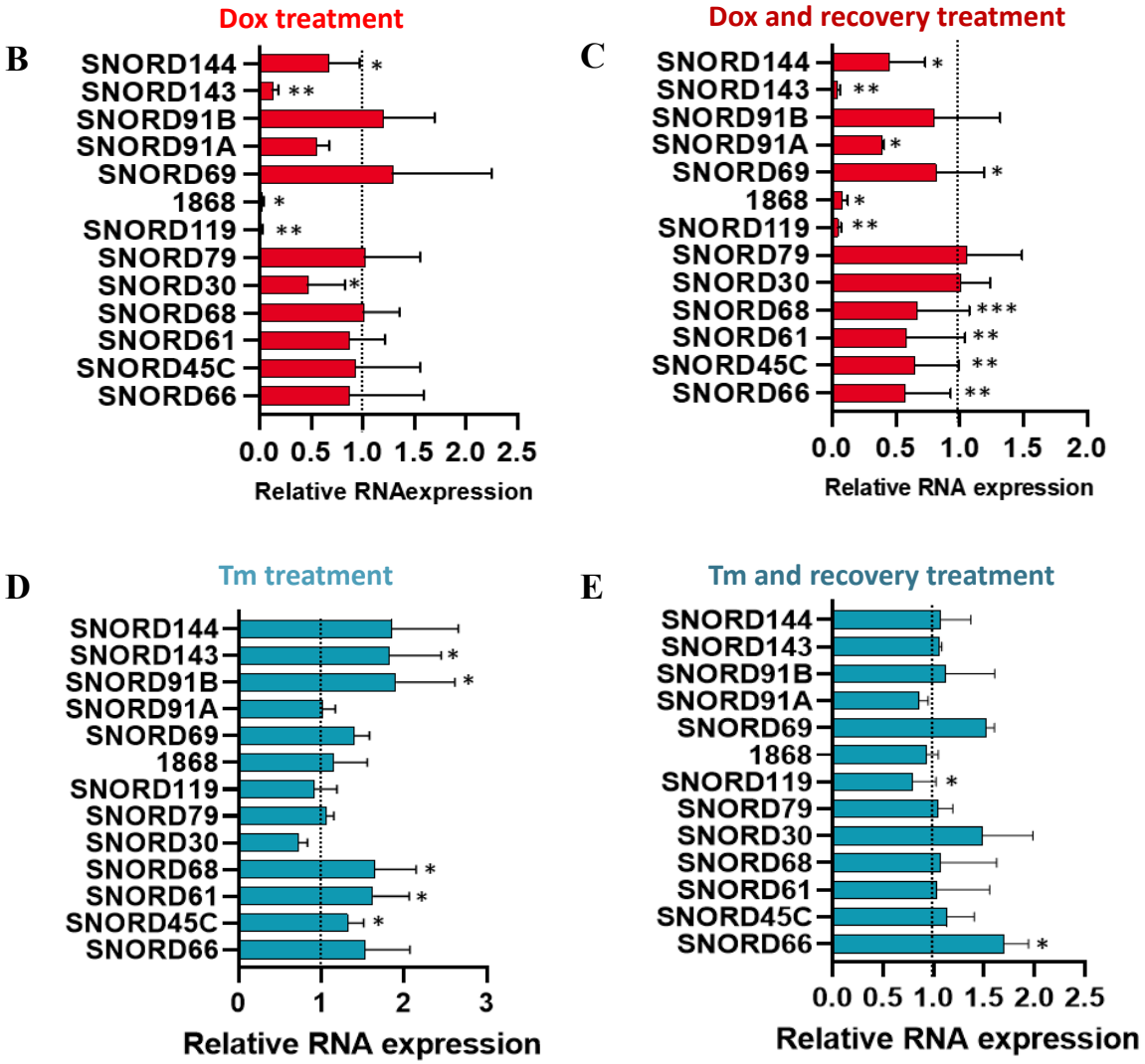


Figure 41 : Expression des snoARN guides. L'expression des snoARN guides de plusieurs des 18 sites variables a été mesurée par RT qPCR. Trois expériences ont été réalisées et un test-T a été effectué.

le site 18S-Cm174H situé dans le site A dont la méthylation augmente avec les deux stress, les autres sites variables sont tous sous-méthylés avec les deux stress. La plupart des sites concernés se trouvent majoritairement à la surface du ribosome. Certains de ces sites se trouvent à proximité de régions fonctionnellement importantes du ribosome tel que le 18S-Cm1272 qui est à proximité du centre de décodage, le 28S-Gm4464 qui se trouve proche du centre peptidyl transférase ainsi que le site 28S-Gm3723 situé à l'interface 40S. Cela pourrait signifier que ces sites différentiellement méthylés en réponse au stress jouent un rôle dans le processus de traduction. De façon intéressante, on peut observer qu'en réponse au stress, les particules libres voient leurs niveaux de méthylation augmenter alors qu'à l'inverse, dans les particules 80S et polysomes, le niveau de méthylations tend à baisser en réponse au stress.

Ces résultats démontrent que plusieurs régions importantes dans le processus de traduction peuvent être soumises à des variations de méthylation.

Conclusions

L'étude de RiboMethSeq réalisée ici dans les HDLEC soumises au stress génotoxique et au stress du RE a permis de déterminer le profil de 2'-O-méthylation dans les HDLEC. Nous avons mis en évidence des différences dans la composition des modifications entre les différentes particules ribosomiques, celle qui sont libres, les monosomes et les particules en traduction actives. Nos résultats suggèrent que plusieurs sites qui se situent dans les ribosomes 80S seraient plus plus méthylés que dans les libres et les polysomes, c'est le cas des sites 28S-Am4560, 28S-Gm3723, 28S-Gm4588, 18S-Um428, 18S-Um1442 et 18S-Cm1272. Nos résultats montrent que le stress induit des variations de 2'-O-me dans les HDLEC. Un comportement se dégage dans lequel plusieurs sites voient leur niveau de méthylation baisser dans les fractions 80S et polysomes en réponse au stress induit par la doxorubicine dont le 28S-Am2388 ou encore le 28S-Um2402. Le traitement à la tunicamycine ne semble affecter surtout que les monosomes. La récupération n'est effective que pour le traitement à la tunicamycine.

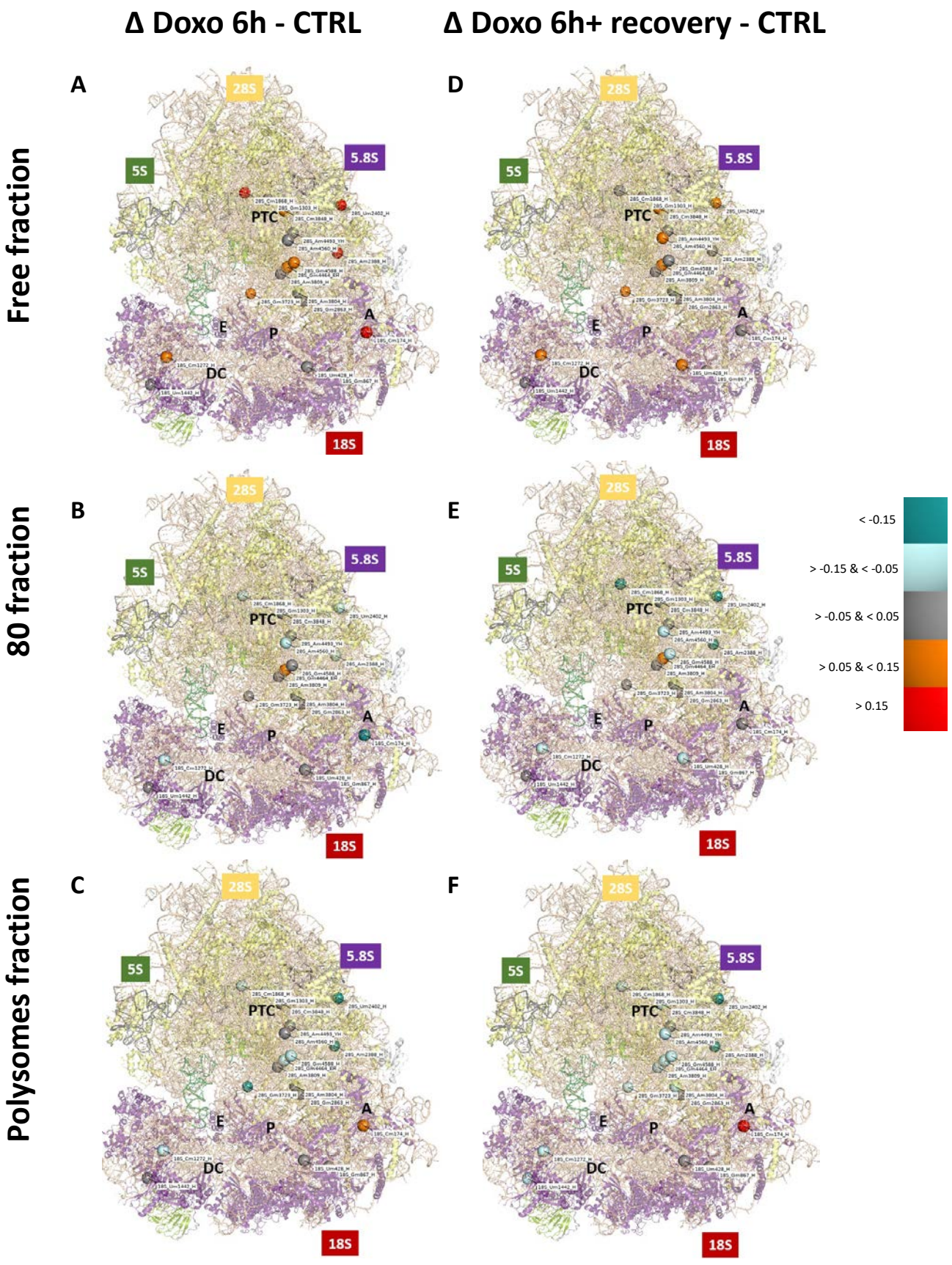


Figure 42 : Distribution des 18 résidus ribose-méthylés sur les modèles 3D des sous-unités ribosomales humaines en réponse à la doxorubicine. Les sites de méthylations sont représentés par des sphères. Les protéines ribosomiques de la petite sous-unité sont représentées en mauve et les protéines de la grande sous-unité en jaune pale. . La légende est représentée à droite et correspond au delta de score de méthylation entre la condition traitée et contrôle.

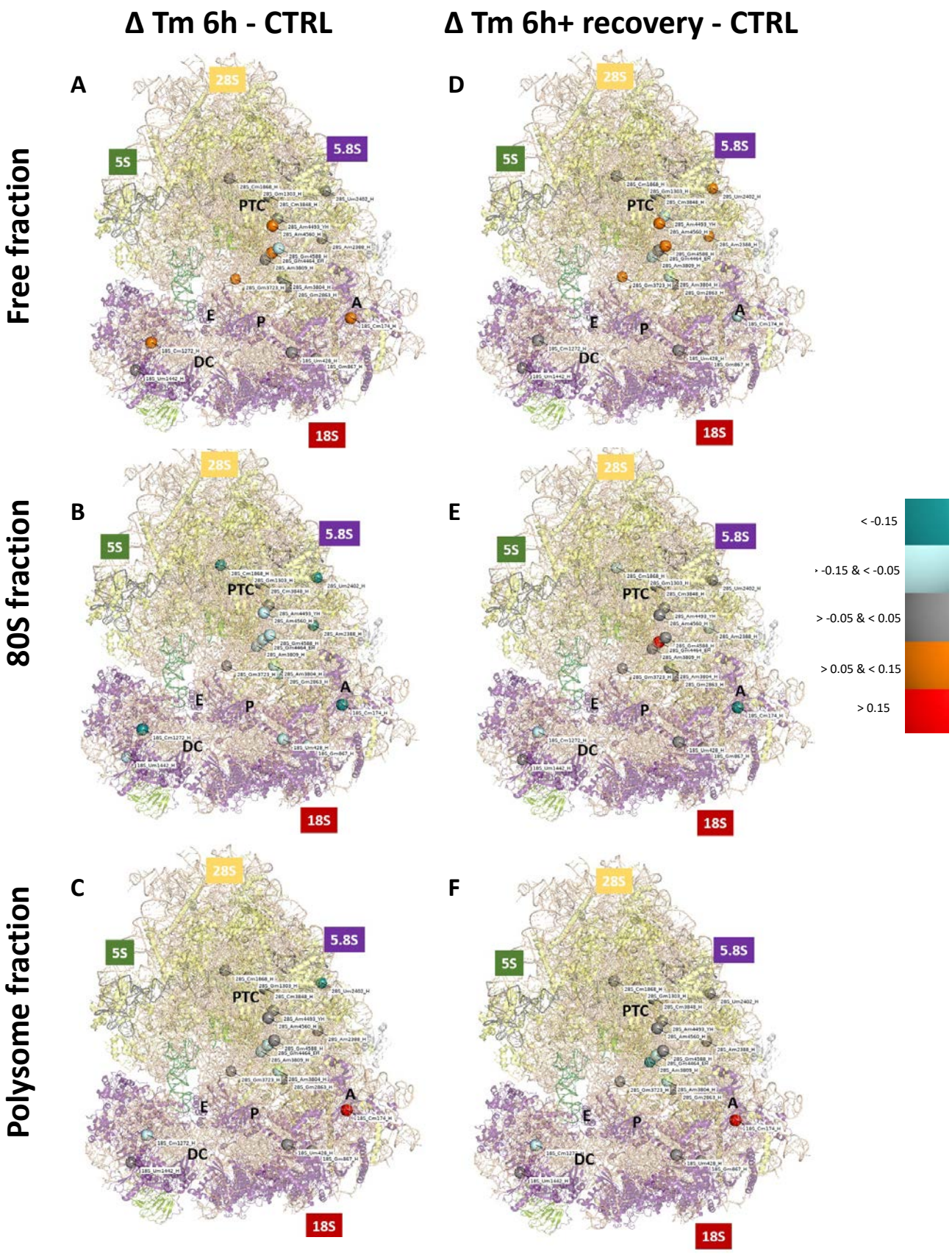


Figure 43 : Distribution des 18 résidus ribose-méthylés sur les modèles 3D des sous-unités ribosomales humaines en réponse à la tunicamycine. Les sites de méthylations sont représentés par des sphères. Les protéines ribosomiques de la petite sous-unité sont représentées en mauve et les protéines de la grande sous-unité en jaune pale. La légende est représentée à droite et correspond au delta de score de méthylation entre la condition traitée et contrôle.

	Free	80S	polysomes
Hypermethylated sites (>0,90)	62	72	63
Hypomethylated sites (<0,90)	50	40	49
proportion of Hyper sites	55%	64%	56%
proportion of Hypos sites	45%	36%	44%

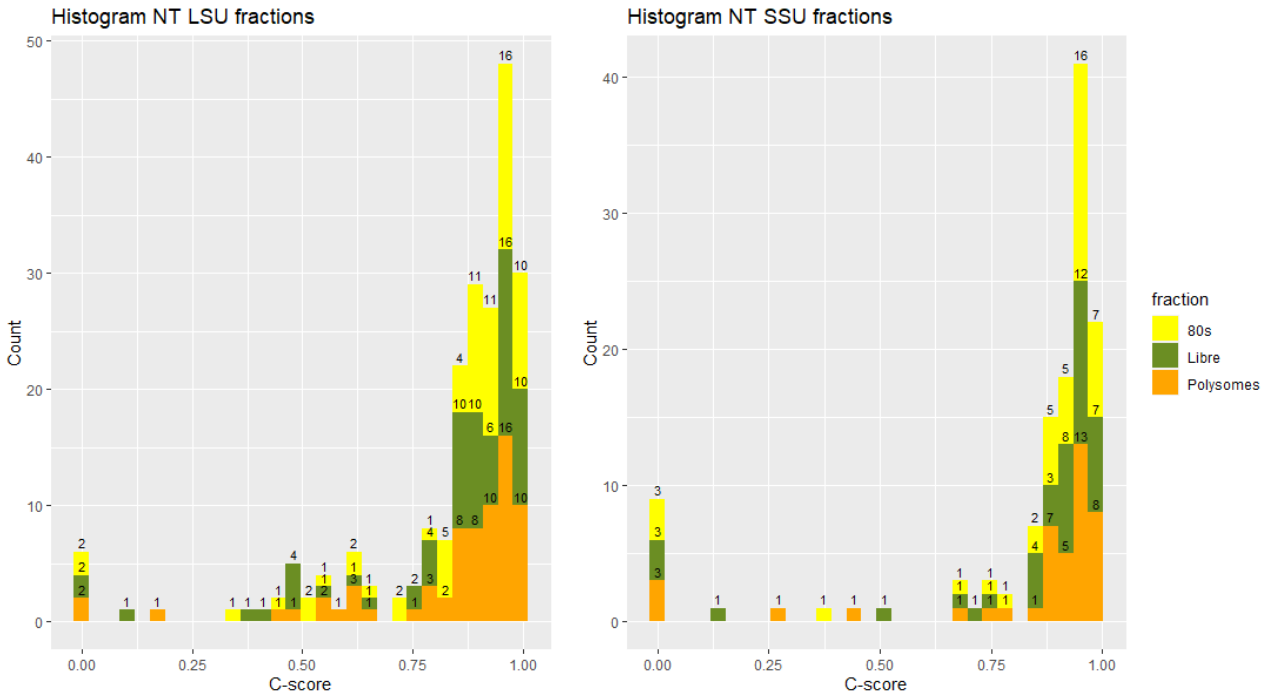


Figure S2 : Distribution des scores RMS dans l'ARNr de HDLEC. Le score exprime la fraction de molécules méthylées à la position demandée. La distribution des scores est représentée par sous-unité : LSU (grande sous-unité) ; SSU (petite sous-unité). La proportion des différentes fractions est représentée.

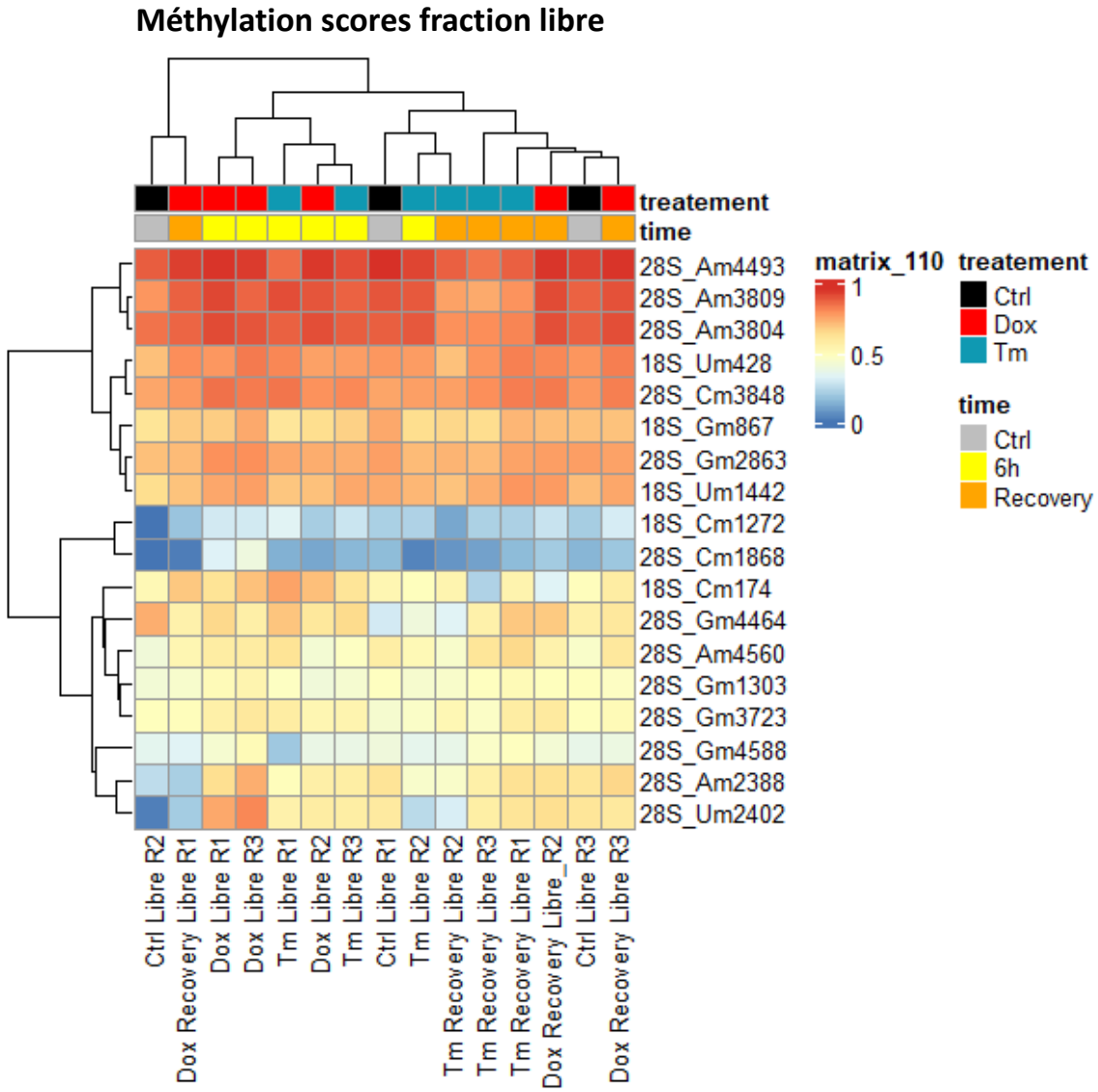


Figure S3 : Regroupement des 18 sites de méthylations variables : fractions sous-unités libres. Heat Map représentant les sites de méthylation (à droite) et les échantillons (en bas). Le C-score est représenté selon un gradient de couleur bleu : 0 ; rouge : 1.

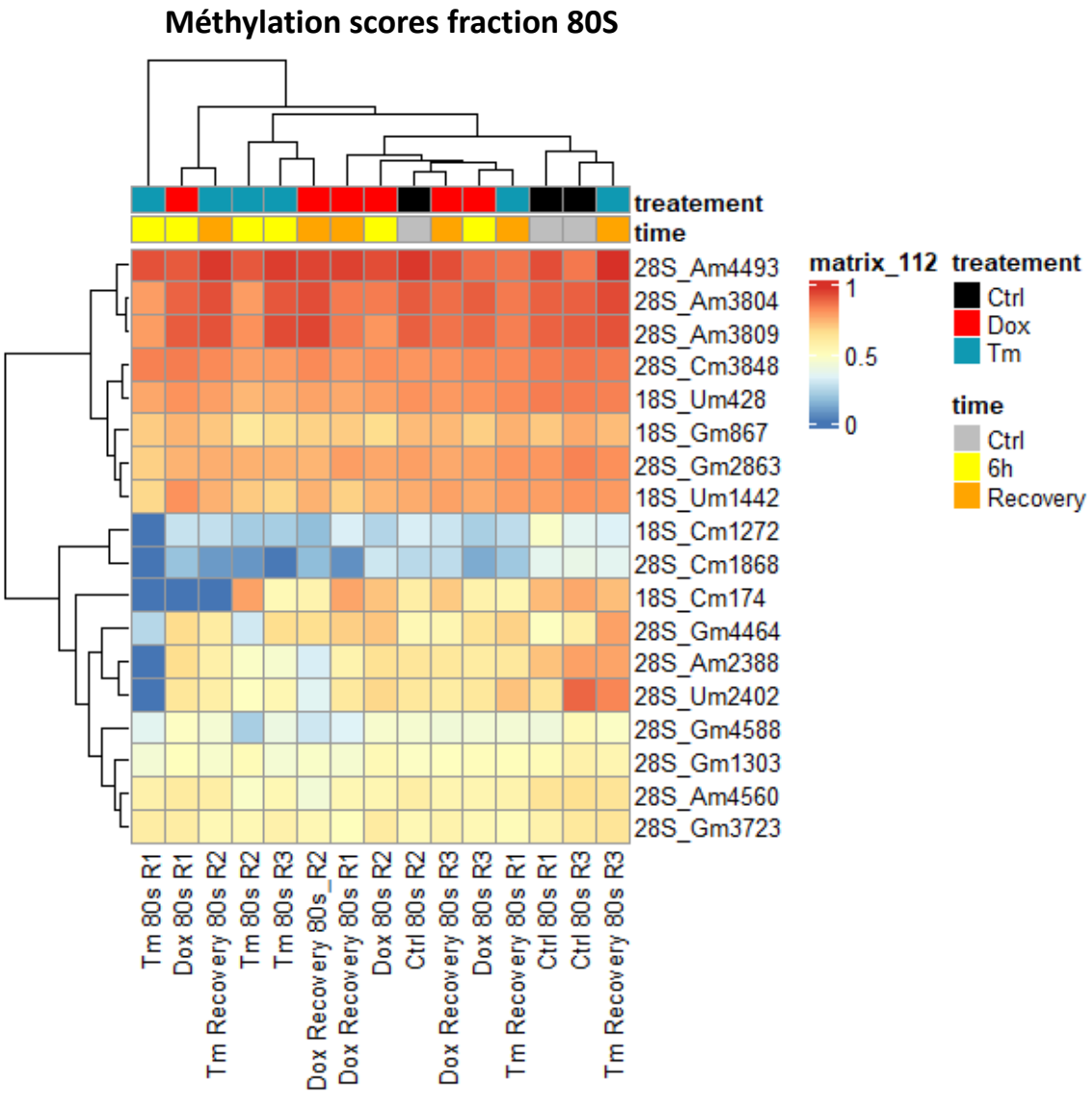


Figure S4 : Regroupement des 18 sites de méthylations variables : fractions monosomes. Heat Map représentant les sites de méthylation (à droite) et les échantillons (en bas). Le C-score est représenté selon un gradient de couleur bleu : 0 ; rouge : 1.

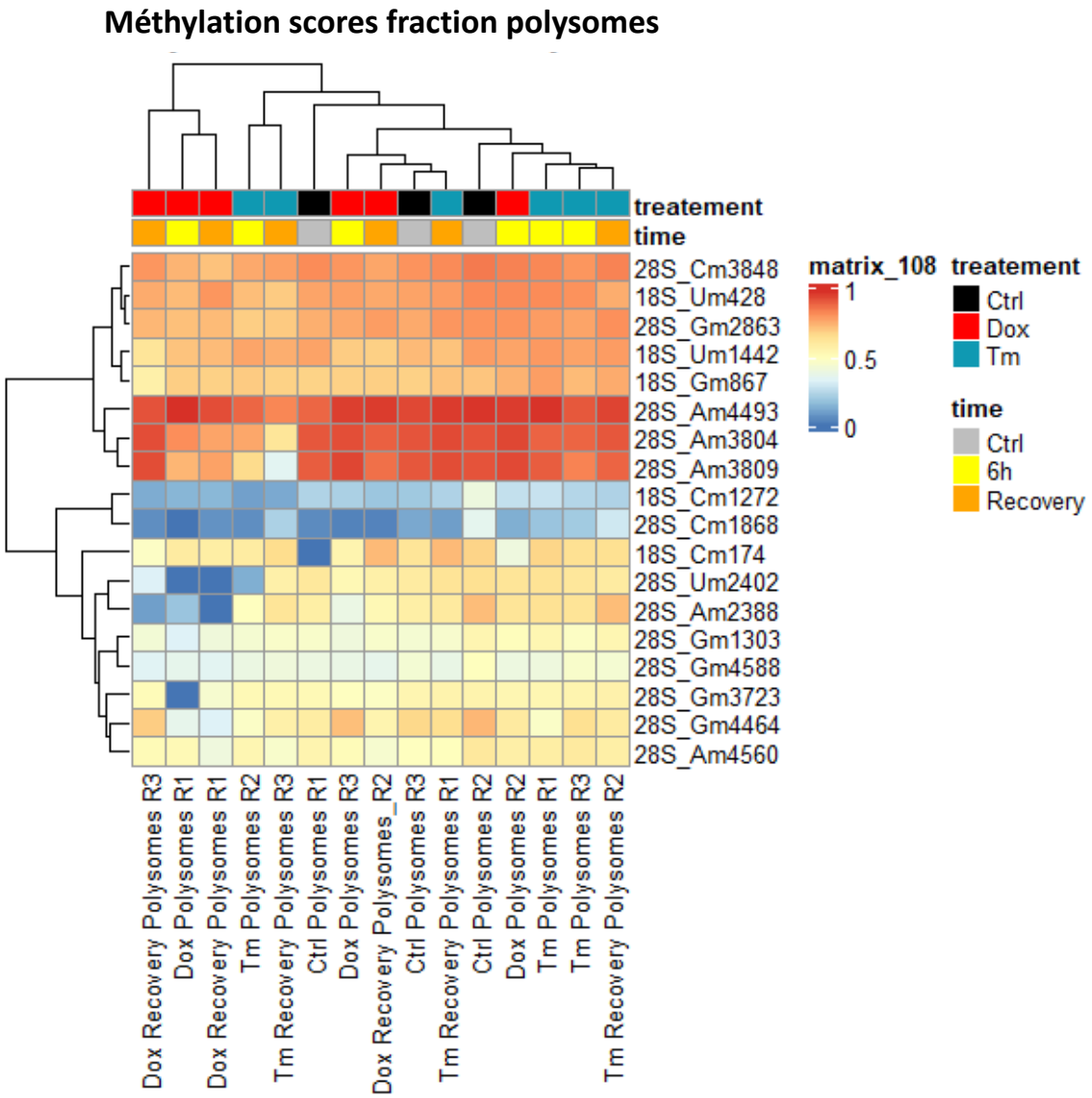


Figure S5 : Regroupement des 18 sites de méthylations variables : fractions polysomes. Heat Map représentant les sites de méthylation (à droite) et les échantillons (en bas). Le C-score est représenté selon un gradient de couleur bleu : 0 ; rouge : 1.

Discussion

Durant ces travaux, j'ai tenté d'identifier et de décrypter les différents mécanismes qui opèrent afin de contrôler la traduction en réponse au stress. Dans diverses situations pathologiques où les tissus sont exposés à d'innombrables facteurs de stress, les cellules qui composent ces tissus subissent d'importantes reprogrammations de leur expression génique afin de répondre au stress. Nous avons mis l'accent sur trois différents types de stress : le stress hypoxique, le stress du réticulum endoplasmique ainsi que le stress génotoxique. Ces stress font partie des stress majoritaires qui sont induits par ou sont la cause d'une multitude de pathologies.

Durant cette thèse, je me suis tout d'abord concentrée sur le rôle de l'hypoxie dans les cellules cardiaques afin de comprendre les mécanismes de régulations génique sous-jacents à l'ischémie du myocarde. Dans de précédentes études menées au laboratoire, nous avons montré que les facteurs de croissances angiogéniques et lymphangiogéniques majeurs de la famille des FGF et des VEGF sont induit par un mécanisme de traduction IRES-dépendant en réponse à l'hypoxie précoce dans les cardiomyocytes (Hantelys et al., 2019). Dans la présente étude, j'ai contribué à montrer le rôle du paraspeckle dans la régulation de la traduction de ces facteurs. J'ai montré que plusieurs des composants de ce corps nucléaire induit en réponse au stress : $p54^{nrb}$, PSPC1 et NEAT1 sont capables de moduler la traduction IRES-dépendante des ARNm des facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques dans les cellules HL-1. De plus, plusieurs protéines qui interagissent avec le composant $p54^{nrb}$ contrôlent également la traduction IRES-dépendante : RPS2 ainsi que la nucléoline. Nous avons montré que bien que tous ces facteurs soient en mesure de moduler la traduction IRES-dépendante, cela est variable en fonction des IRES et de la condition étudiée. Nos résultats montrent que le long ARN non codant NEAT1 est un régulateur positif clé de la fonction de tous les IRES d'ARNm cellulaires sur lesquels nous avons travaillé. A travers des expériences de smiFISH, j'ai pu observer une colocalisation de NEAT1 et d'un ARNm rapporteur portant l'IRES du FGF1. Enfin, dans une expérience à large spectre, nous avons montré que NEAT1 contribue au recrutement de nombreux messagers contenant des IRES dans les polysomes en hypoxie. L'ensemble de ces observations nous ont amené à emmettre une hypothèse mécanistique originale qui est que le paraspeckle pourrait servir de plateforme d'assemblage des ARNm qui contiennent des IRES en réponse au stress. Ainsi, le

paraspeckle recruterait les composants de l'IREsome et ce dernier serait exporté dans le cytoplasme pour favoriser la traduction IRES-dépendante.

Le paraspeckle est-il exporté dans le cytoplasme ?

L'hypothèse d'un export nucléaire du paraspeckle est cohérent avec certaines données de la littérature qui suggèrent que les IRES d'ARNm cellulaires requièrent une "expérience nucléaire" pour être fonctionnels (Ainaoui et al., 2015; Semler and Waterman, 2008; Mark Stoneley et al., 2000). Une étude menée dans mon laboratoire a mis en évidence la nécessité d'un passage nucléaire pour un ARN messager portant l'IRES FGF1 afin que cet IRES soit actif (Ainaoui et al., 2015). L'IRES du FGF1 est induit dans les myoblastes en différenciation (Conte et al., 2009). Or, dans l'étude de Ainaoui et al, le vecteur bicistronique portant l'IRES du FGF1 a été utilisé soit sous forme d'ARN soit sous forme d'ADN plasmidique. L'IRES ne s'est révélé actif que lorsque la transfection des cellules a été faite avec de l'ADN. Les auteurs ont montré que $p54^{nrb}$ et hnRNPM se lient au promoteur du FGF1 pendant la différenciation des cellules musculaires et que cette liaison au promoteur est essentielle pour l'activité de l'IRES. Cette étude apporte une preuve non négligeable de la nécessité pour certains IRES de lier les ITAF avant d'être exporté dans le cytoplasme. Une autre étude sur l'IRES du proto-oncogène c-myc démontre la nécessité d'un passage nucléaire pour l'augmentation de l'activité IRES (Mark Stoneley et al., 2000). Tout comme dans la précédente étude, les auteurs montrent que l'IRES de c-myc n'est capable d'initier la traduction par entrée interne qu'après avoir été produit dans le noyau contrairement à l'IRES du rhinovirus HRV dont le cycle est entièrement cytoplasmique. En effet, en règle générale, les ITAF sont soit des protéines nucléaires, soit des protéines capables de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Godet et al., 2019). Très peu d'entre elles se situent exclusivement dans le cytoplasme, ce qui laisse supposer que l'IREsome se formerait dans le noyau. Dans notre étude, qui révèle que la formation nucléaire de l'IRESome se fait dans le paraspeckle sous contrôle de l'ARN non-codant Neat1, il est remarquable que l'IRES de l'ARN viral EMCV n'ait pas été impacté par la déplétion de NEAT1 et des composants du paraspeckles. Cette information est capitale, car on sait que l'ARNm de l'EMCV est synthétisé dans le cytoplasme et donc ne nécessite pas d'évènement nucléaire pour être activé.

Le paraspeckle jusqu'ici décrit comme étant exclusivement nucléaire pourraient-il être exporté dans le cytoplasme, où est-ce que cela concerne seulement certains composants? Outre le fait que plusieurs des composants du paraspeckle sont déjà connus pour faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, nous avons également retrouvé l'ARN de NEAT1 associé aux polysomes (Hantelys 2019). De plus, dans notre expérience de fluidigm, nous observons qu'en hypoxie, l'ARN de NEAT1 est plus associé aux polysomes qu'en normoxie, ce qui étaye notre hypothèse d'export de la plateforme. Dans

les expériences de FISH et de smiFISH, nous avons également détecté la présence de l'ARN NEAT1 dans le cytoplasme (figure S6).

Dans une récente étude, il a aussi été montré qu'un modificateur d'histone du nom d'ASXL1 pouvait contribuer à la formation des paraspeckles dans les cellules hématopoïétiques. ASXL1 possède une région IDR (permet la séparation en phase liquide-liquide) qui favorise l'interaction entre $p54^{nrb}$ et NEAT1. Cette protéine induit l'expression de NEAT1 et la formation des paraspeckles. Lorsqu'il est muté au niveau de sa région IDR, on perd la formation des paraspeckles et un export de l'isoforme NEAT1_2 vers le cytoplasme est détecté (Yamamoto et al., 2021). Enfin, très récemment, une autre étude a mis en évidence la présence de l'isoforme NEAT1_2 essentielle à la formation des paraspeckles dans le cytoplasme en réponse à l'hypoxie (Ma et al., 2022). Ici, les auteurs montrent que NEAT1_2 est régulé positivement dans des cellules épithéliales rénales TEC (*Renal* tubular epithelial cells). Une lésion ischémique a été induite chez des souris et une reperfusion effectuée 20 à 40 min après la lésion et le long ARN non codant NEAT1 a été identifié comme étant surexprimé, dans les tissus post-ischémie, majoritairement l'isoforme NEAT1_2. L'hypoxie induite sur des cellules d'origine humaines ou murine de TEC montre que les cellules contiennent davantage de NEAT1_2 dans le cytoplasme après le stress. Les auteurs ont découvert que NEAT1_2 est libéré du noyau après le stress et favorise l'expression de caspases pro-apoptotique en épongeant le miARN-129-5-p, ce qui favorise l'apoptose des TEC après une exposition ischémique. La localisation cytoplasmique de la petite isoforme NEAT1_1 a également été mis en évidence (Yan et al., 2021). Toutes ces illustrations nous poussent à considérer la présence des paraspeckles dans le cytoplasme. Afin de le confirmer, il sera nécessaire de visualiser une colocalisation entre les protéines du paraspeckle et NEAT1_2 dans le cytoplasme, par fluorescence ou bien immunoprécipitation.

Le rôle de NEAT1 dans le contrôle de la traduction ?

NEAT1 n'est pas le premier ARN non codant à avoir été identifié comme régulateur de la traduction IRES-dépendante. Comme mentionné en introduction, TRMP a été décrit comme ITAF négatif de p27 (Yang et al., 2018b). Ici nous démontrons un rôle de régulateur positif puissant exercé par NEAT1 sur un vaste catalogue de messagers pourvus d'IRES. A l'appui de ce rôle de régulateur positif de la traduction, une étude a déjà mis en évidence le rôle d'enhancer traductionnel de la triple-hélice portée par NEAT1 et MALAT. Les auteurs ont montré que la triple hélice, en plus de conférer une stabilité à l'ARN, induit la traduction de manière équivalente à la queue poly(A) (Wilusz et al., 2012).

Nos données sur le rôle activateur de NEAT1 dans la traduction des ARNm des facteurs de croissance via leur IRES contraste avec l'étude de Shen et al, dans laquelle les auteurs avaient montré

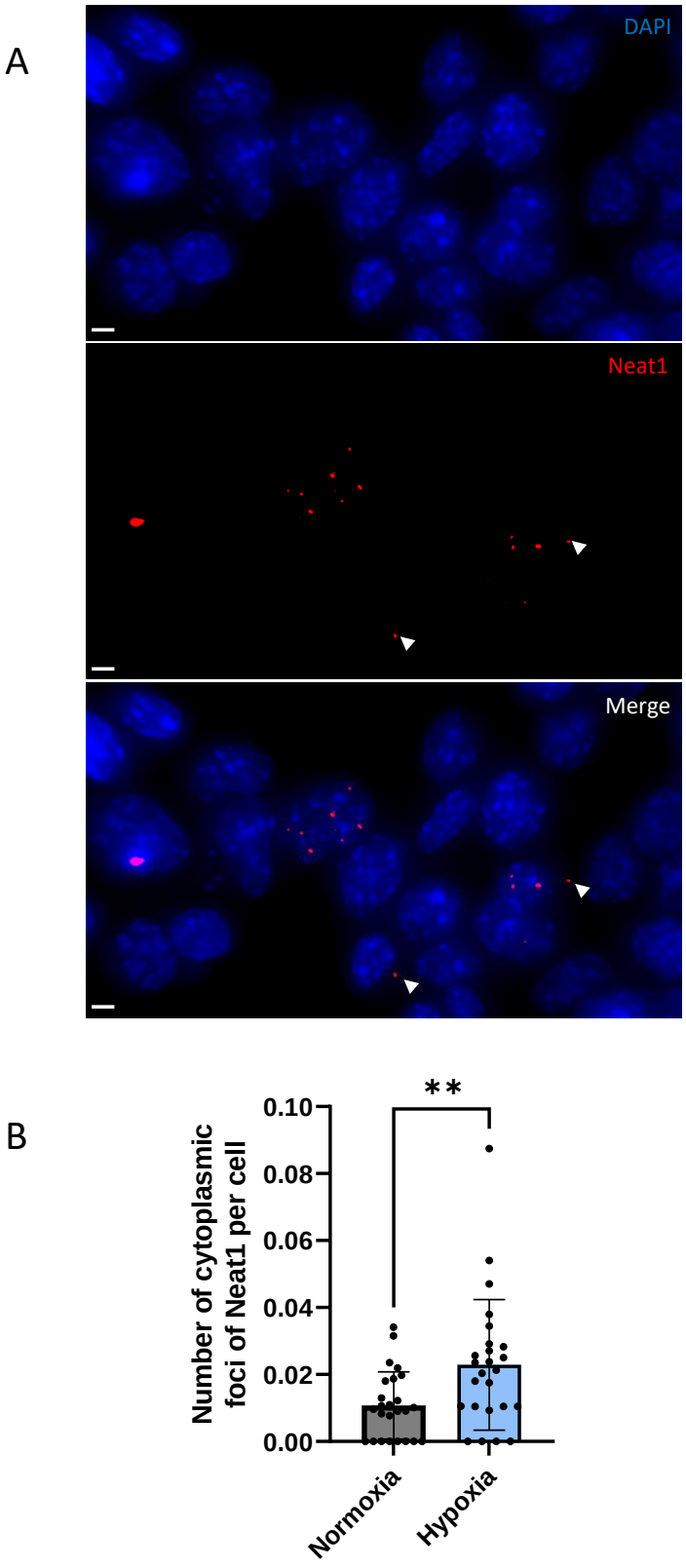


Figure S6: Cytoplasmic foci of Neat1. Cells were subjected or not to 4 hr hypoxia. SmiFISH experiments were performed. (A) SmiFISH images showing *Neat1* RNA (red) in hypoxia condition. A representative image is showed. Scale bars are 5 µm. The arrows show the cytoplasmic foci (B) Quantification of cytoplasmic foci of Neat1 per cell. Unpaired two-tailed Student T-test was performed with Welch's correction.

que la déplétion de NEAT1 entraine un relargage de p54^{nrb} et SFPQ des paraspeckles pour favoriser la traduction de c-myc. Ceci dit, nos études sont différentes sur de nombreux aspects, premièrement les modèles cellulaires utilisés ne sont pas les mêmes, les auteurs ont utilisé des HeLa et des MCF7 tandis que nous avons travaillé sur des cardiomyocytes HL1 et des 67NR, or il est connu que l'activité des IRES n'est pas la même d'un type cellulaire à un autre. En outre, nous avons travaillé sur un modèle de cellules murine et eux sur un modèle de cellule humaines, et il est connu que l'expression de MYC n'est pas la même dans ces deux modèles. De plus, dans cette étude, les auteurs ont étudié les niveaux de la protéine c-myc mais n'ont absolument pas vérifié si cette augmentation était due à une augmentation de la traduction par son IRES. Les auteurs se sont simplement concentrés sur la liaison de p54^{nrb} et SFPQ à l'ARNm de c-myc. Aucune expérience ne certifie que l'élévation des niveaux de c-myc provient d'une augmentation de sa traduction IRES-dépendante et non tout simplement de sa traduction par le mécanisme canonique. L'ensemble de ces différences expérimentales peuvent expliquer la différence sur l'effet que nous avons observé. Dans notre cas, il est évident que NEAT1 à un impact positif sur la traduction IRES-dépendante.

Quelle est l'implication de chaque isoforme de NEAT1 ?

De façon étonnante, au vu des résultats obtenus en fluidigm dans lesquels on voit que la déplétion de NEAT1_2 impacte davantage le recrutement aux polysomes que la déplétion des deux isoformes, nous aurions pu penser que l'isoforme NEAT1_2 serait principalement responsable du contrôle de la traduction IRES-dépendante. Cependant, la déplétion de l'isoforme NEAT1_2 seule n'a pas permis de confirmer cette hypothèse. Néanmoins, bien que l'isoforme NEAT1_2 semble donc être majoritairement requise pour la formation des paraspeckles, une étude a tout de même montré que la surexpression de NEAT1_1 favorise la formation des paraspeckles en présence de NEAT1_2 (Naganuma et al., 2012). A ce stade, nous ne pouvons que conclure que les deux isoformes sont impliquer dans la régulation observée.

Les hélicases : des protéines associées aux ribosomes qui participent au contrôle de la traduction en réponse au stress ?

Dans notre étude, nous avons identifié la protéine hélicase DDX17 dans l'interactome de la p54^{nrb}. Nos premiers résultats nous avaient laissé penser que cette dernière pouvait réguler négativement la traduction IRES-dépendante. Il est intéressant de noter que DDX17 a tout récemment été inclus dans la liste des composants du paraspeckles (An et al., 2019). De plus, j'ai également identifié cette ARN hélicase dans un second volet de mes travaux sur les cellules endothéliales lymphatiques : DDX17 ainsi que DHX9 sont surreprésentées dans les polysomes en réponse au stress

génotoxique. L'hélicase DHX9 a déjà été identifiée comme un ITAF permettant de réguler positivement la traduction IRES dépendante de la p53 (Halaby et al., 2015a, 2015c, p. 8). Et de façon intéressante, les premiers résultats observés lors de mon étude indiquent qu'elle régule négativement la traduction IRES-dépendante du messager FGF1. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour confirmer ces résultats. Toutefois, DHX9 pourrait très bien être un régulateur négatif de l'IRES du FGF1 en réponse au stress. Plusieurs ITAF ont déjà été identifié comme des régulateurs négatif ou positif en fonction du contexte. Notre équipe a mis en évidence que la vasohibine régule de manière positive l'IRES de l'ARNm du VEGFD en condition de normoxie et de façon positive l'IRES du FGF1 en hypoxie (Hantelys et al., 2019). La déplétion de DDX17 cependant n'a pas donné de résultats concluants sur l'activité des IRES, contrairement à nos données préliminaires sur les HL-1. Les hélicases pourraient fournir un nouveau niveau de régulation de la traduction en s'associant aux ribosomes en traduction et en favorisant la traduction de messagers à IRES. Plusieurs membres de la famille des hélicases ont été associés à une régulation de l'activité d'IRES viraux et cellulaires, c'est le cas de la DHX9 premièrement, mais aussi de DDX6 qui a été identifiée comme ITAF de l'ARNm du VEGFA en réponse à l'hypoxie (de Vries et al., 2013). DDX6 est un modulateur négatif de l'activité de l'IRES du VEGFA. En effet, en normoxie, cette dernière va réguler à la baisser l'activité de l'IRES tandis que lorsque les cellules sont soumises à un stress hypoxique, DDX6 étant moins exprimé ne sera plus en mesure de réprimer l'activité de l'IRES. Ceci va de pair avec son rôle de régulateur négatif de l'IRES du facteur HIF-1α (Saito et al., 2011). DDX6 a également été identifiée comme un modulateur négatif de L'IRES du messager c-myc (Matsui et al., 2006). Dans ces études, il apparait que l'hélicase « déroulerait » l'IRES du VEGFA et le rendrait non fonctionnel en normoxie. Afin de savoir si la protéine DHX9 interagit avec la machinerie de traduction, nous avons réalisé des expériences de PLA, et pu observer qu'en absence ou en présence de stress, DHX9 co-localise avec la protéine RPS6. Afin de confirmer la co-localiation indépendamment de l'ARNm, des expériences d'immunoprécipitations en présence de RNase seront à réaliser. Plusieurs études suggèrent que les hélicases interagissent directement avec les composants du ribosome pour participer à réguler la traduction. L'hélicase DDX3 par exemple, favorise la traduction de l'IRES du virus de l'hépatite C, cette dernière se lie à la sous-unité 40S et participe à la formation du 80S (Geissler et al., 2012). Récemment, une étude a montré que l'hélicase DDX3 pouvait interagir avec la protéine RPL13 pour favoriser l'infection par le virus FMDV (Han et al., 2020). Dans leur étude, les auteurs montrent que l'activité de l'IRES du FMDV dépend de DDX3 et de RPL13 et que l'hélicase sert de pont entre l'IRES et la RP. Les auteurs montrent que l'hélicase se trouve majoritairement dans les fractions libres et en petite quantité dans les 80S mais pas dans les polysomes, suggérant qu'ici DDX3 sert à la formation du 80S mais pas à l'élongation. Dans notre étude nous avons trouvé l'hélicase dans les polysomes,

mais nous n'avons hélas pas regardé sa présence dans les sous-unités libres et les monosomes, ce qui sera important pour décrypter son mécanisme d'action pour la suite.

Notre étude présente tout de même une limite quant à la certitude que les hélicases identifiées dans notre analyse protéomique soient associées à la machinerie de traduction. En effet, comme l'explique très bien l'étude de Simsek et al parue en 2017 sur le ribo-interactome de cellules souches embryonnaires, il est difficile de sélectionner uniquement les complexes ribosomiques lorsque l'on réalise une analyse sur des gradient de sucrose (Simsek et al., 2017). En effet, d'autres complexes peuvent co-migrer dans les fractions de gradient de sucrose en raison de propriétés de centrifugation similaires. Il est également difficile de garantir le maintien des faibles interactions à cause de la vitesse de centrifugation élevée, ce qui peut constituer une limite à la méthode. Il est possible de contourner ce problème de contaminant en utilisant une méthode de purification de ribosome tagué avant de faire l'analyse en spectrométrie de masse (Simsek et al., 2017). De plus, afin d'exclure que les protéines identifiées soient en réalité associées à l'ARNm et pas directement au ribosome, il est possible de réaliser un traitement à la RNase durant la procédure d'isolation des protéines ribosomique marqués. Il faut tenir compte du risque que la RNase perturbe l'intégrité des ARNr. Une autre difficulté à cette méthode est d'exclure que le signal MS des protéines identifiées ne provient pas des peptides naissants. Pour éviter cela, un traitement par la puromycine (analogue des ARNt qui entraîne la libération du peptide) peut être utilisée et de cette façon les peptides naissants éliminés ne sont pas détectés dans l'immunoprécipitation des protéines taguées. Cependant, selon l'étude de Simsek *et al,* il est tout de même rares que les peptides naissants soient identifié lors des analyse de la sorte (Simsek *et al.*, 2017),. Il est possible de vérifier l'hypothèse des peptides naissants en regardant la couverture des extrémités C et N terminales des peptides identifiés par MS. Dans leur étude, en ayant pris en compte de toutes ces limitations, les auteurs ont identifié de nombreuse Dead-Box Helicases dans l'interactome polysomique, ce qui conforte notre hypothèse d'une interaction directe de DHX9 avec le ribosome. Notre étude suggère donc fortement que l'hélicase DHX9 pourrait interagir avec le ribosome en réponse au stress et agir en « déroulant » les structures de l'IRES afin de réguler négativement la traduction de l'IRES du FGF1.

Des ribosomes spécialisés dans le contrôle de l'expression des facteurs de croissances en réponse au stress ?

Dans notre première étude sur les HL-1, l'interactome de $p54^{nrb}$, nous avons identifié différentes protéines enrichies dans le noyau et dans le cytoplasme en hypoxie. Deux des protéines

identifiées dans le noyau se trouvent être des ITAF : nucléoline et RPS2. La nucléoline a déjà montré son rôle d'ITAF précédemment, notamment en réponse au choc thermique sur l'IRES du VEGFD (Morfoisse et al., 2016). Le rôle de régulateur traductionnel de RPS2 n'a jusqu'alors jamais été mis en évidence et pourrait révéler son implication dans la spécialisation des ribosomes en réponse au stress. En effet, le concept émergent de ribosome spécialisé met en évidence le rôle de la composition différentielle des ribosomes dans des conditions physiologique ou physiopathologiques particulières (Genuth and Barna, 2018b). Ici RPS2 contrôle la traduction IRES-dépendante seulement en condition non stressée. Cela pourrait signifier qu'en réponse au stress, les ribosomes présenteraient une stœchiométrie différentielle de cette protéine et que ces ribosomes dépourvus de RPS2 seraient moins capables d'initier la traduction IRES-dépendante. Cette hypothèse est soutenue par la localisation très extérieure de la protéine RPS2 dans le ribosome humain. RPS2 n'est donc pas profondément enfouie dans le ribosome, ce qui suggère qu'elle pourrait facilement être apportée ou retirée du ribosome. En effet, nous avons réalisé ces expériences dans un contexte incluant une hypoxie précoce (4h), ce qui signifie que des variations de la stoechiométrie de protéines ne peuvent pas provenir d'un nouveau processus de biogenèse des ribosomes. Dans l'étude sur le rôle de DDX3 et RPL13 sur l'activité de l'IRES du FMDV, les auteurs ont mis l'accent sur RPL13, mais la protéine RPS2 a également été retrouvée en interaction avec le 5'UTR contenant l'IRES, ce qui suggère qu'elle pourrait également avoir un rôle dans l'initiation de la traduction IRES-dépendante de l'ARN viral (Han et al., 2020).

Dans notre étude protéomique de la composition des polysomes en réponse au traitement doxorubicine, nous avons identifié la protéine ribosomique RPL26 plus abondamment présente dans les polysomes en réponse au stress. Cette dernière a déjà fait l'objet d'un article concernant son rôle dans la régulation de la traduction en réponse aux dommages à l'ADN. En effet, en 2005, Takagi et ses collègues ont montré que RPL26 est capable de réguler la traduction de l'ARNm p53 en réponse aux dommages à l'ADN (Takagi et al., 2005a). RPL26, tout comme la nucléoline, est capable de lier le 5'UTR de p53. RPL26 se lie au 5'UTR de p53 préférentiellement en réponse aux dommages à l'ADN et est capable d'augmenter la présence de l'ARNm p53 dans les polysomes lourds. Les auteurs ont montré que l'augmentation d'expression de la protéine p53 par RPL26 est dépendante de sa liaison sur le 5'UTR. Bien que les auteurs n'aient pas fait de parallèle avec la présence d'IRES dans le 5'UTR de p53, ces résultats suggèrent fortement que la protéine RPL26 pourrait favoriser l'expression de la protéine p53 via une régulation positive sur son IRES. Par la suite il s'est avéré que la protéine ribosomique RPL26 a la capacité de s'attacher aux régions 5' et 3' non traduites (UTR) de l'ARNm de p53 et de stimuler la traduction de p53 (Chen and Kastan, 2010). Chen et Kastan ont montré que l'ajout du 3'UTR dans un rapporteur luciférase en plus du 5'UTR favorise grandement la traduction de

l'ARNm rapporteur. Elle montre que, par complémentarité, le 3'UTR et le 5'UTR peuvent interagir et former une boucle. L'étude montre que la perte des sites de complémentarité par la mutation de seulement trois bases atténue fortement la capacité de RPL26 à se lier à l'ARNm et à stimuler la traduction. Ces résultats suggèrent que l'augmentation l'expression de p53 observée dépendante de la RPL26 nécessite le rapprochement entre le 5'UTR et le 3'UTR de l'ARNm. Ce qui n'est absolument pas incompatible avec l'hypothèse d'une traduction IRES-dépendante. En effet, il a déjà été démontré que les ITAF peuvent lier à la fois le 5'UTR et le 3'UTR pour favoriser la traduction IRES dépendante, notamment dans le cas de l'IRES du FMDV dont le 3'UTR favorise l'initiation de son IRES se trouvant en 5'UTR (García-Nuñez et al., 2014). Cette régulation pourrait être due à la redistribution de la RPL26 dans le nucléoplasme après le stress, cependant une association préférentielle de RPL26 avec les ribosomes en réponse au stress n'est pas à exclure, d'autant que dans notre étude, nous la retrouvons associée aux polysomes.

Il est intéressant de noter que la nucléoline a des effets contraires sur la régulation de la traduction de l'ARNm p53 et que celle-ci a déjà été identifiée comme étant un ITAF de l'IRES du facteur lymphangiogénique VEGFD régulant son activité en réponse au choc thermique (Morfoisse et al., 2016). Cette dernière, nous la retrouvons sous-exprimée dans les polysomes dans notre spectrométrie de masse en réponse à la doxorubicine, ce qui concorde avec les données de la littérature sur son rôle d'ITAF négatif en réponse au stress génotoxique.

En tous cas, ces données concordent avec notre contexte de stress génotoxique dans lequel nous observons des niveaux plus élevés de p53. On sait que les ITAF peuvent réguler différents IRES, or le rôle déjà établi de RPL26 dans la traduction de p53 en réponse au stress génotoxique ainsi que celui de nucléoline en réponse à différents types de stress nous laisse fortement penser que L26 pourrait contribuer à réguler la traduction d'autres messagers qui comportent des IRES, et notamment les facteurs de croissances. Des expériences de déplétion et de surexpression de la RPL26 sont actuellement en cours au laboratoire afin d'étudier l'impact de cette protéine sur la traduction IRES-dépendante.

De façon intéressante, notre étude a permis de mettre en évidence une recomposition différente de l'interactome en réponse aux deux types de stress. Le stress du RE induit par la tunicamycine n'impacte pas la présence de RPL26 dans les polysomes, mais c'est une autre RP, RPL13A, qui est plus abondamment associée aux polysomes. La déplétion de RPL13A montre qu'elle joue un rôle sur le contrôle de la traduction IRES-dépendante, mais que cela ne concerne pas tous les IRES : sur les

deux IRES testés, seul celui de FGF1 est impacté. Les résultats de la surexpression sont surprenants : en effet, si on considère les deux cistrons séparément, il s'avère que RPL13A a un effet clairement activateur de l'IRES FGF1 après traitement tunicamycine. Ceci est cohérent avec le résultat de déplétion. Cependant, RPL13A a aussi un impact très important sur l'activité LucR, indiquant que sa surexpression active aussi la traduction dépendante de la coiffe. A ce stade il reste plusieurs inconnues. Nous ne connaissons pas le niveau de RPL13A-HA par rapport à la RPL13A endogène. De plus il serait intéressant de vérifier si c'est toute la traduction coiffe-dépendante qui est augmentée ou seulement celle de l'ARN bicistronique. Il a en effet déjà été montré que la présence d'un IRES peut impacter la traduction du premier cistron situé en amont (Conte 2008).

Dans notre analyse protéomique de la composition des polysomes, plusieurs protéines impliquées dans la 2'-O-méthylation des ARN ribosomiques ont été identifiées, notamment la nucléophosmine NPM1 et la RPL13A. Ces données nous ont poussé a étudier si les 2'-O-méthylations pouvaient être impactées par le stress dans les HDLEC (Basu et al., 2011b; Nachmani et al., 2019). Nous avons donc utilisé la technologie RiboMethSeq afin de quantifier les méthylations en position 2' du ribose sur les ARNr des HDLEC en réponse au stress. Afin de déceler si une différence de méthylation s'observe entre les particules ribosomiques libres, les monosomes et celles activement engagés dans la traduction, nous avons réalisé ces analyses sur les fractions libres, monosomales et polysomales séparément.

Qu'en est-il du profil de 2-O-méthylation dans les HDLEC ?

Nos données sur les profils de méthylation des ARNr des HDLEC concordent avec ce qui a été retrouvé dans la littérature, à savoir qu'environ deux tiers des sites sont méthylés dans plus de 90% des ribosomes. Nous trouvons ici qu'environ un tiers des sites sont hypométhylés (Methscore < 0,90) dans les HDLEC contre deux tiers des sites qui sont méthylés dans plus de 90% des ribosomes. Ces mêmes proportions de sites entièrement méthylés et de sites plus faiblement méthylés ont été décrites dans plusieurs études portant sur l'analyses des modifications au niveau des cellules ou de tissus humains : il s'agit des cellules HeLA, HCT116, ainsi que dans des pathologies telles que les lymphomes diffus à grandes cellules B et une variété de cancer du sein (Krogh et al., 2020, 2016; Marcel et al., 2020b). Il apparaît que les sites sous-méthylés sont les mêmes d'un type cellulaire à un autre. Parmi eux on retrouve les sites qui ne sont pas complétement méthylés, les sites 28S-Cm1868, 28S-Gm4588, 28S-Gm1303, 28S-Cm1272 qui sont hypométhylés, et à l'inverse les sites 28S-Gm2351 ou encore 18S-Am576 qui sont fortement méthylés. Lorsque l'on compare les signatures de 2'-O-me dans différentes lignées, l'on s'aperçoit alors qu'il existe des variations entre les niveaux de

méthylation sur de nombreux sites. L'existence de ces positions partiellement méthylées dans les HDLEC apporte une preuve de plus de l'hétérogénéité des ribosomes au sein d'une population cellulaire. De plus les variations différentielles entre les différents types de cellules montrent que les profils de méthylation diffèrent d'un type de cellule à un autre, sans doute pour répondre aux exigences traductionnelles spécifiques de chaque type cellulaire.

Les sites de méthylation des ARNr humain peuvent être classés comme constitutifs ou variables. Les modifications constitutives présentent un niveau stable de méthylation alors que le groupe variable présente un niveau de variation important. Les modifications constitutives sont très conservées entre les modèles cellulaires et les espèces. Elles sont vraisemblablement impliquées dans des fonctions importantes, se localisant dans des régions fonctionnelles d'une haute importance pour le ribosome : centre peptidyltransferase, tunnel de sortie ou encore centre de décodage (Motorin et al., n.d.). Les sites variables sont moins conservés et souvent retrouvés en périphérie du ribosome. Ils sont régulés de façon dynamique dans divers contextes. Par exemple, ils sont sensibles à l'hypoxie, à l'expression de MYC, à la perte de la FBL ou encore de NPM1 et également de p53 (Jansson et al., 2021; Kunchala et al., 2018; Metge et al., 2020; Sharma et al., 2017). La proposition faite par la communauté au vu des récents rapports est que les sites variables pourraient constituer un moyen de réguler finement la fonction du ribosome.

Dans notre étude, en plus de mettre en évidence le profil de 2'-O-méthylation des cellules endothéliales lymphatiques, nous réalisons pour la première fois une étude comparative des 2'-O-méthylations présentes dans différentes populations de ribosomes, la population libre, la population de monosome ainsi que les polysomes. De façon intéressante, pour certains sites variables, les scores de méthylations ne sont pas les mêmes en fonction de la fraction dans laquelle on se trouve. Notons les sites 18S-Cm1272, 28S-Am2388, 28S-Cm1868 et 18s-Cm174 qui sont plus fortement méthylés dans la fraction monosomale que dans les deux autres. Ces sites sont naturellement très variables, c'est pourquoi il faut être prudent avec l'interprétation de leur véritable impact. Néanmoins certains sites comme le 18S-Cm1272, 28S-Cm1868,28S-Am4560, 28S-Gm3723, 18S-Cm174, 18S-Um428 observent des variations significativement différentes. Cela pourrait signifier que les ribosomes dans différents états varient dans leur composition en modifications. Ici la tendance observée sur les sites les plus variables est que les sous-unités monosomales présentent des niveaux plus important de méthylation par rapport aux sous-unité libres et polysomes. Ces données sont à mettre en relation avec celles démontrant des variations de la stoechiométrie des protéines ribosomiques entre les fractions monosomales et polysomales retrouvées dans les cellules souches embryonnaire de souris (Slavov et

al., 2015). Dans cette études les auteurs montrent des différences dans la stoechiométrie des RP en fonction de la fraction dans laquelle on se trouve et ils trouvent également des différences de stœchiométrie à mesure que les ribosomes avancent le long de l'ARNm.

Le stress cellulaire, capable d'induire des ribosomes différentiellement 2'-O-méthylés

Le but de notre projet était d'étudier l'impact du stress sur le profil de 2'-O-Me des ribosomes de HDLEC. Les cellules ont été soumises à deux stress différents : le stress génotoxique induit par une chimiothérapie : la doxorubicine et le stress du RE induit par un perturbateur de l'homéostasie du RE : la tunicamycine. Les cellules ont été stressées durant 6h et également soumises à une récupération de 24h après le stress.

La comparaison des sites a permis de déterminer que près de la moitié des sites statistiquement variables en condition de stress appartenaient à la catégorie des sites partiellement méthylés, ce qui signifie que la méthylation partielle rend les sites plus sensibles en cas de variation induit par le stress. Cela a déjà été abordé par l'étude de Erales et collaborateurs en 2017, qui montre la déplétion de la fibrillarine n'induit de fortes baisses de la méthylation surtout sur les sites partiellement méthylés (Erales 2017). Les comparaisons des profils de 2-O-me n'ont pas permis de déterminer de signature pour chacun des stress. En effet, à l'aide d'outils de regroupement, nous avons tenté de visualiser des comportements similaires des sites de méthylation en réponse au stress mais nous n'avons pas réussi à dégager de profils clairs à l'échelle globale. Il apparaît tout de même que certains sites ont des comportements similaires vis-à-vis du sens de variation des méthylations. En effet, nous avons observé pour le traitement à la doxorubicine une augmentation des scores de méthylations dans les fractions libres et en corrélation inverse une diminution du score dans les monosomes et dans les polysomes. Cela pourrait signifier qu'il se produit un « switch » au moment du stress, les ribosomes en cours de traduction, a priori plus méthylés, basculeraient dans les sous-unités libres qui ne traduisent pas, alors qu'à l'inverse, les ribosomes présents sur les ARNm présenteraient des méthylations amoindries allant de pair avec une baisse de la traduction.

Ici nous montrons donc que le stress cellulaire et notamment le stress génotoxique est capable de moduler l'expression de sites spécifiques. La relation entre cette modulation et l'activité des messagers à IRES que nous avons observés reste encore à élucider, cependant nous avons de bonnes raisons de penser que ces modifications peuvent impacter la traduction IRES-dépendante. En effet, l'étude de Metge et al a mis en évidence la présence de ribosomes de composition en protéines et en modifications 2'-O-me différentielle sur l'IRES du VEGFC (Metge et al., 2021). Dans ce cas, comme dans notre étude, les auteurs ont observé une baisse de la méthylation à certains sites (8S-Um1804, 28S-Am389, 28S-Gm1612, 28S-Cm2848, 28S-Gm4506) et une augmentation sur d'autres (28S-

Am1858 et 28S- Cm4426). Ces données démontrent que l'activité IRES ne va pas seulement de pair avec une augmention des 2'-O-me.

Comment des modifications précoces des ARNr peuvent survenir ?

Le renouvellement des ribosomes et des ARNr est un processus lent : en moyenne, il faut 20h au minimum pour obtenir un nombre assez important de ribosomes issus d'un nouveau processus de biogenèse. Cette information est capitale, car elle signifie que les modifications observées après 6h de stress ne proviennent pas d'un renouvellement du pool de ribosome. De plus, à ce jour, aucune enzyme capable « d'effacer » les 2'-O-me des ARNr n'a été identifiée. D'où proviennent ces baisses de méthylation des ARNr après 6h de traitement ?

L'une des seule études qui fait mention d'un tel phénomène est une ancienne étude sur le traitement des hépatocytes au tétrachlorure de carbone, où un traitement de 1,5 h suffisait à entrainer une baisse de 2'-O-méthylation sur les ARNr ("Early hypomethylation of 2'-O-ribose moieties in hepatocyte cytoplasmic ribosomal RNA underlies the protein synthetic defect produced by CCl4," 1987)

Evidemment, la première hypothèse que l'on peut faire est qu'il existe des enzymes capables de déméthyler les ARNr qui n'ont tout simplement pas encore été identifiées. Concernant les sites variables, ces derniers se trouvent en surface du ribosome et donc seraient accessibles pour que de tel enzymes leur ôtent leur modification. Ceci étant dit, certains sites comme le 28S-Cm1868 sont plus ancrés dans la particule ribosomique et donc peu accessibles pour d'éventuelles enzymes.

Une autre explication élégante pourrait provenir de l'existence d'un réservoir de ribosomes différentiellement méthylés latents prêts à intervenir en cas de stress.

Est-ce que la modification d'un seul site peut affecter la fonction du ribosome ?

Plusieurs études montrent que la modulation du score de méthylation d'un site unique via l'extinction d'un snoARN entraine des changements phénotypiques.

Dans une étude récente, il a été mis en évidence que la modulation du site de méthylation 18S-U116 pouvait impacter la traduction de plusieurs ARNm codant des protéines de la machinerie de traduction et d'autres protéines (Pauli et al., 2020). Dans des cellules de leucémie humaine où le SNORD42A est considérablement surexprimé, la répression de ce SNORD a induit une baisse de la méthylation à son site cible 18S-U116. Cela s'accompagne d'une baisse de la traduction de plusieurs ARNm de protéines ribosomiques mais également de l'augmentation de la traduction d'ARNm codant des protéines du réticulum endoplasmatique ou du lysosome. Sur le plan fonctionnel, la perte du SNORD42A induit une baisse de la prolifération cellulaire ainsi qu'une diminution du pouvoir

clonogénique des cellules. Cette étude montre que la modulation d'un seul site peut avoir un impact sur la fonction du ribosome. Dans l'étude de Hafner en 2023, les auteurs montent que la perte de méthylation au niveau du site 28S-U3904 modifie l'identité cellulaire des cellules souches embryonnaires et les dirigent vers un destin neuronal. L'hypométhylation à ce site permet d'induire sélectivement la traduction d'ARNm impliqués dans la voie WNT (Häfner et al., 2022). Dans cette étude, la perte de méthylation au niveau du site U3904 s'accompagne d'une baisse du nombre de ribosomes.

D'autres études ont même montré l'impact de la perte de méthylation au niveau d'un seul site sur la traduction dépendante des IRES. La délétion du SNORD71 qui abroge la méthylation sur le site 5.8S-Um14 induit une activation de la traduction via les IRES des ARN du CrPV, HCV et de p53 dans les chondrocytes. Cela compromet également l'élongation de la traduction (Chabronova et al., 2023).

Il est intéressant de noter que dans les études employant des méthodes « drastiques » pour amenuiser le taux de méthylation à plusieurs sites telles que la déplétion de la fibrillarine ou l'altération de la biogenèse des SnoRNP C/D (Khoshnevis et al., 2022; Marcel et al., 2013), la traduction IRES-dépendante est diminuée alors que l'ajustement à un nombre de sites spécifiques restreints, comme c'est le cas dans notre étude ou encore dans celle de Chabronova ou Metge, montre que la modulation de sites restreints, qu'il s'agissent d'une élévation ou d'une diminution du niveau de méthylation, peut entrainer une augmentation de l'activité des IRES (Chabronova et al., 2023; Metge et al., 2021). Dans une récente étude, il a été montré que l'altération des méthylations au site 18S-U116 inhibe la traduction d'ARNm possédant des IRES (Pauli et al., 2020).

Une considération très importante à prendre en compte est le rôle extra-ribosomique des SNORD. En effet, ces derniers interviennent également dans l'épissage alternatif (Falaleeva et al., 2016). Le ciblage d'un SNORD ne va donc pas moduler seulement le niveau de méthylation du site. C'est pourquoi il faut rester prudent avec les conclusions que l'on tire sur le niveau d'expression des SNORD et l'impact fonctionnel sur le ribosome. Un bon moyen de s'assurer que seule la fonction de guidage des méthylations du SNORD est inhibée serait d'utiliser l'édition du génome pour déléter le SNORD et de réintroduire soit un snoARN sauvage, soit un snoARN où on a intégré une mutation ponctuelle au niveau du site de méthylation pour bloquer son activité.

Nous avons cherché une corrélation entre le niveau de méthylation des sites et l'expression des snoARN. Le traitement doxorubicine a montré une corrélation positive sur de nombreux sites, notamment après une récupération de 30h. Cependant, ce n'est pas le cas pour nombre d'entre eux après 6h de stress, une régulation de la méthylation par les SNORD n'est donc certainement pas la

cause des variations à 6h. Plusieurs études ont déjà fait ce constat : dans l'étude de Krogh de 2016, où les auteurs ont regardé si l'expression des SNORD était corrélée avec le profil de méthylation obtenu dans les cellules HeLa et HCT116, aucune corrélation n'a été retrouvée entre les scores de méthylation et l'expression des SNORD, ce qui suggère que le profil global n'en est pas la conséquence directe (Krogh et al., 2016; Sharma et al., 2017). En revanche, il est possible que quelques sites soient régulés par la disponibilité des SNORD. Mes résultats montrant que l'expression des SNORD est en relation avec le niveau de méthylation des sites variables confortent cette hypothèse. Il serait intéressant d'étudier l'effet de la déplétion de ces snoARN sur l'activité des IRES en réponse au stress. Bien sûr, ces expériences n'excluront pas la possibilité d'un effet extra-ribosomique du snoARN. La meilleure approche sera de réaliser une délétion-surexpression comme mentionné plus haut.

Des sites différentiellement modifiés qui contrôlent les IRES des ARNm de facteurs de croissance ?

Le stress génotoxique et le stress du RE sont tous deux capables de modifier le translatome des cellules en bloquant d'une part la traduction globale et en induisant la traduction de messagers sélectifs. En effet, en condition basale, la traduction d'ARNm eucaryotes est majoritairement initiée par les ribosomes par la reconnaissance de la structure de la coiffe 5'. Cependant, en réponse à de nombreux types de stress et dans de nombreuses situations physiopathologiques, la liaison du ribosome à certains ARNm est indépendante de la coiffe et peut se faire sur l'IRES (Holcik and Sonenberg, 2005b). Le stress génotoxique et le stress du réticulum sont tous deux capables d'induire une initiation de la traduction indépendante de la coiffe via des sites d'entrée interne des ribosomes. Pour la plupart des IRES, les déterminants moléculaires précis de l'entrée interne du ribosome sont inconnus. Dans le chapitre précédent de mes travaux, nous avons observé une augmentation de l'activité des IRES du VEGFC et du FGF1 en réponse au stress génotoxique et au stress du RE. Plusieurs études ont montré que les variations de méthylation des ARNr contribuent à réguler la traduction IRES-dépendante. Nous avons émis l'hypothèse que le stress fournirait un nouveau pool d'ARNr susceptible de subir des modifications distinctes pour la reconnaissance de messagers à IRES. Dans plusieurs de ces études, la régulation de la traduction IRES-dépendante est diminuée lorsque la méthylation des sites diminue (Erales et al., 2017; Marcel et al., 2013). Pourtant, nos données montrent que de manière générale et notamment en réponse au traitement génotoxique, les scores de méthylation diminuent là où l'activité des IRES augmente. En fait, nos données ont montré des variations sur un petit nombre de sites spécifiques et non pas sur la globalité des sites comme le montrent ces études. Il n'est pas impossible que des variations à la baisse sur des sites spécifiques participent à réguler positivement la traduction IRES-dépendante. Dans une récente étude menée sur les méthylations des ARNr en réponse à

l'hypoxie, l'équipe de Samant a montré qu'en réponse à l'hypoxie, les ribosomes liés à l'IRES du VEGFC présentaient des scores de méthylations plus faible sur 9 des 14 sites qu'ils ont analysés (Metge et al., 2020). Parmi eux les sites 28S-1612, 28S-1858, 28S-4506, 18S-1326. Il est intéressant de constater que les sites qui diminuent dans leur étude, ne sont pas du tout impactés par les stress utilisés dans notre étude, ce qui confirme notre observation en comparant le stress du RE et le stress génotoxique que le changement dans le profil de méthylation est stress-dépendant.

Dans l'ensemble, ces travaux ont permis de mieux comprendre la manière dont la traduction pouvait être reprogrammée en réponse au stress. L'implication de NEAT1 et probablement des paraspeckles dans le mécanisme d'initiation IRES-dépendant de la traduction des ARNm des facteurs de croissances (lymph)angiogénique méritera d'être étudiée dans d'autres modèles cellulaires afin de voir si ce phénomène est généralisable à toutes les cellules de l'organisme. Concernant les modifications du ribosome, qu'il s'agisse de la modification protéique ou ARN, nous ajoutons une pierre à l'édifice du royaume de l'hétérogénéité ribosomique, l'impact fonctionnel de ces changements est d'ores et déjà une piste que nous sommes impatients de poursuivre.

Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Les cellules endothéliales lymphatiques (HDLEC, PromoCell, ref C-12216) ont été cultivées dans du ECGM-MV2 (Endothelial Cell Growth Medium MV2, PromoCell ref C-22121) complémenté avec 5% de serum de veau fœtal, EGF 5ng/mL, IGF 0.5ng/mL, 10 ng/ mL FGF, 0.5ng/mL VEGF, 1ug/mL d'acide ascorbique, 0.2ug/ mL d'hydrocortisone, 100U/ mL de peniciline et 0.1mg/ mL de streptomycine (Sigma Aldrich). Les cellules ont été manipulées à des passages allant de 3 et 6. Les HEK-293FT ont été cultivées dans du DMEM-GlutaMAX (Dubecco's Modified Eagle Medium Gibco) complété avec du pyruvate et 10% de serum fœtal bovin (FBS) ainsi que des acides aminés essentiels et non essentiels (Sigma Aldrich). Les HDLEC et les HEK-293FT ont été cultivées dans une chambre humide à 37°C avec 5% DE CO2 et le milieu des cellules a été changé tous les 2 jours. Les passages ont été effectués tous les 4 jours. Pour l'induction du stress du réticulum endoplasmique et du stress génotoxique, le milieu a été remplacé par du milieu contenant 2µg/ml de tunicamycine (Sigma Aldrich SML1287) ou 10µM de doxorubicine hydrochloride (Sigma Aldrich D1515).

Clonage et séquençage

Pour la construction des vecteurs shARN et des vecteurs de surexpression, les clonages ont été réalisés avec des bactéries Top 10 Escherichia coli (InVitrogen, thermofisher scientific ref C404003). Les shARN ont été commandés sous forme d'oligonucléotides chez IDT (séquences Table methode) et introduits dans des plasmides lentivecteurs pLKO.1 puro. Les séquences pour la surexpression ont été commandées chez IDT et introduites dans un plasmide lentivecteur pTRIP. Les bactéries ont été transformées par choc thermique (selon le protocole du fournisseur) suivi d'une heure et demie d'expression phénotypique. Elles ont été cultivées dans des boîtes d'agarose/LB avec 100 µM de carbénicilline et incubées une nuit à 37°C. Les colonies qui ont poussé ont été cultivées dans du LB medium à 37°C pour l'amplification des plasmides et la purification. Les plasmides ont été purifiés en utilisant le kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit (Bio Basic) ou ZymoPURE II Plasmid Midiprep and Maxiprep Kit (ref D4200-A et D4202) en suivant les instructions du fournisseur. La quantification des plasmides a été effectuée en utilisant un Nanodrop spectrophotomètre (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) et un séquençage de Sanger a été réalisé par Eurofins Genomics en suivant les instructions à l'aide des amorces pCMV ou U6.

Production des lentivecteurs

Les lentivecteurs ont été produits en utilisant la méthode CaCl2 basée sur la tri-transfection avec les plasmides pCMV-dR8.91 et pCMV-VSVG, CaCl2 et Hepes Buffered Saline (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), dans des cellules HEK-293FT. Les surnageants viraux ont été récoltés 48 heures après la transfection, passés à travers des filtres PVDF de 0,45 µm (Dominique Dutscher SAS, Brumath, France), et conservés en aliquots à -80 °C jusqu'à utilisation. Les productions virales ont été titrées en transduisant les HEK-293FT avec plusieurs dilutions de lentivecteur et la quantité de cellules ayant intégré le lentivecteur a été mesurée par ddPCR. La titration des lentivecteurs par ddPCR a été réalisée à l'aide du système Bio-Rad.

Transduction

Pour la transduction des lentivecteurs bicistroniques, les cellules ont été ensemencées dans une boîte de 10 cm de diamètre et transduites pendant une nuit dans 6 mL de milieu de transduction (OptiMEM-GlutaMAX, Life Technologies SAS) contenant 5 µg/mL de sulfate de protamine en présence de lentivecteur. Les cellules HDLEC 1 ont été transduites avec une efficacité de 80-90% en moyenne. Pour la déplétion ou la surexpression, les cellules ont été transduites en plaques 6 puits ou de 24 puits. Les lentivecteurs contenant les shARN ont été transduits avec une MOI 10 et incubés pendant 72h. Les lentivecteurs contenant les vecteurs de surexpression ont été introduits à une MOI de 10 et incubés durant 48h.

Transfection

Les cellules ont été ensemencées en plaques de 6 puits et traitées pendant 48 h ou 72 h avec 20 ou 40 nM de siARN (Dharmacon) ciblant respectivement DDX17 et DHX9 en utilisant INTERFERin (Polyplus Transfection) selon les recommandations du fabricant, dans un milieu MV2 sans pénicilline-streptomycine. Le milieu a été changé 6 heures après la transfection.

Mesure d'activité des IRES

Pour les lentivecteurs rapporteurs, les activités des luciférases ont été mesurées *in vitro* en utilisant le kit Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega). Les cellules ont été extraites avec du Passive Lysis Buffer (Promega France) et la quantification de la luminescence a été effectuée au luminomètre (Centro, Berthold, Thoiry, France). Les données ont été recueillies à l'aide du logiciel MicroWin 2010.

Extraction ARN- reverse transcription- PCR quantitative

L'extraction des ARN totaux des cellules a été réalisée en utilisant le réactif TRI (Molecular Research Center Inc, USA) en suivant les instructions du fabricant. La qualité et la quantité des ARN a été mesurée au spectrophotomètre Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). 750 ng ont été utilisés pour synthétiser l'ADNc à l'aide d'un kit de transcription inverse d'ADNc à haute capacité (Applied Biosystems, France). Des contrôles appropriés sans transcriptase inverse et sans ADNc matrice ont été inclus dans la plaque de test qPCR pour surveiller les contaminations potentielles par les réactif ou par l'ADN génomique, respectivement. Les ADNc ont été dilués au 5ème dans de l'eau sans nucléase. La quantification de l'ARN a été réalisée par qPCR à partir de 2.5 µL d'ADNc a été réalisée en utilisant ONEGreen FAST qPCR Premix (Ozyme) à l'aide des oligoucléotides présentés dans le Tableau d'amorces du matériels et méthodes. La qPCR a été réalisée sur un appareil QS5 (Applied Biosystem). Toutes les réactions de qPCR ont été réalisées en triplicats.

Extraction de protéines et dosage

Les cellules ont été lavées dans du PBS froid et collectées dans du tampon RIPA Biobasic complété par un inhibiteur de protéase (Sigma) et un inhibiteur de phosphatase (Roche). La concentration en protéines a été mesurée à l'aide du kit de dosage protéines BCA (Interchim).

Western Blot

Des quantités équivalentes de protéines ont été dénaturées à l'aide de DTT et soumises à une chauffe de 5 min à 95°C. Les protéines dénaturées ont ensuite été soumises à un SDS-PAGE (TGX Stin Free FastCast Acrylamid, 12 %, Bio-Rad, 161-0185) et transférées sur une membrane de nitrocellulose (Transblot Turbo , Bio-Rad, 1704271). Les membranes ont été lavées dans une solution saline tamponnée Tris additionnée de 0,05 % de Tween-20, saturées dans une solution saline tamponnée Tris additionnée de 0,05 % de Tween-20 avec 5 % de BSA, puis incubées pendant la nuit avec des anticorps primaires (Table methode) dans une solution saline tamponnée Tris additionnée de 0,05 % de Tween-20 avec 5% de BSA ou de lait. Les membranes ont été lavées et incubées 1 h avec l'anticorps secondaire, puis lavées et révélées avec le substrat Clarity Western ECL (Bio-Rad, 170-5060).

Western capillaire

Le lysat protéique a été dilué et préparé en utilisant les réactifs de JESS (Protein Simple) en suivant les instructions de Protein Simple. Les protéines ont été dénaturées dans du « master mix » et chauffées durant 5 min à 95°C. Trois microlitres de mélange de protéines (concentration maximale de 1 mg/mL) contenant le réactif de normalisation des protéines ont été déposés ainsi que le réactif de blocage, le tampon de lavage, l'anticorps primaire cible, les anticorps secondaires et le réactif de

chimiluminescence (fournis par Protein Simple) dans la plaque de JESS. La plaque a ensuite été déposée dans la machine Jess de Protein Simple et les protéines ont été aspirées dans des capillaires individuels sur une cassette de 25 capillaires (12 à 230 kDa) (SM-SW004). Le réactif de normalisation permet de détecter les protéines totales dans le capillaire.

Proximity ligation assay

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre et fixées dans de la PFA 4% pendant 15 minutes. Les lamelles ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS et ont été perméabilisées par une incubation de 5 minute dans du PBS-Triton 0,1 %. Le kit Duolink In situ Green Starter kit Mouse/ Rabbit (Sigma, DUO94102) a été utilisé. Les lamelles ont été lavées trois fois et incubées dans une solution de blocage (Duolink Sigma) pendant 1 heure à 37°C en chambre humide. Les anticorps ont été dilués dans la solution de diluant pour anticorps du kit: (Rabbit-DHX9 dilué 1 :100 (Abcam, ab26271), souris anti-RPS6 dilué 1 :150 (Santa Cruz, sc-74459), avant d'être ajoutés sur une lamelle pendant 1 heure à 37°C en chambre humide. Les lamelles ont été lavées trois fois dans le tampon A 1x et incubées avec les sondes PLA PLUS et MINUS diluées à 1:5 dans le diluant d'anticorps Duolink pendant 1 heure à 37°C dans une chambre humide. Les lamelles ont été lavées trois fois dans le tampon de lavage A 1x et incubées avec le tampon de ligature Duolink 1x contenant la ligase diluée à 1:40 pendant 30 minutes à 37°C dans la chambre humide. Les lamelles ont été lavées trois fois dans le tampon de lavage A 1x et incubées dans le tampon d'amplification 1x contenant de la polymérase diluée à 1:80 pendant 100 minutes à 37°C dans la chambre humide. Les lamelles ont été lavées trois fois dans le tampon de lavage B 0,01x avant d'être montées sur Duolink PLA Mounting Medium avec Dapi déposé sur les lammes de microscopes. Les acquisitions ont été réalisées sur un microscope confocal Carl Zeiss LSM900 - Airyscan2, avec le mode Airyscan SR et un objectif 63x/1.4 N.A.

Fractionnement sur gradient de sucrose

Avant de débuter le fractionnement, de nombreuses solutions ont été préparées : un Buffer A (hypotonique) contenant 10mM HEPES KOH Ph 7.9, 10mM de KCL ET 1.5mM de MgCL2. Pour la lyse : 1 mM de DTT, 0.5 U/µL de RNAsin et de l'inhibiteur de protéase au 100X ont été ajoutés au Buffer A. Une solution de cycloheximide (Sigma) à 50 mg/mL a été préparée avec de l'éthanol 100%. Les cellules ont été cultivées dans deux boîtes de 150 mm de diamètres. Les cellules ont été traitées avec 40 µL de la solution de cycloheximide (50 µg/mL) durant 10 min à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS contenant de la cycloheximide et récoltées en utilisant de la trypsine. Les cellules ont ensuite été centrifugées durant 5 min à 800 rpm à 4°C et le culot a été lavé deux fois en utilisant du PBS-cycloheximide. Le culot a ensuite été re-suspendu en utilisant le tampon hypotonique

(BufferA) et de la cycloheximide. Les cellules ont été centrifugés 5 min à 800 rpm et le culot a été resuspendu dans le tampon de lyse et laissées en glace durant 20 min. Les cellules ont ensuite été lysées mécaniquement à l'aide d'un Dounce (60 allers-retours). La suspension homogenénéisée a ensuite été clarifiée en deux centrifugations : une première à 1000g durant 10 min à 4°C afin de séparer les noyaux et une seconde de 15min à 10 000g pour ôter les membranes et les organites. Le surnageant a été collecté et l'absorbance de chaque échantillon a été mesuré à 260 nm sur un NanoDrop. Des quantités égales d'ARN ont été chargées sur des tubes avec un gradient croissant de sucrose (10% à 50%) puis centrifugé à 39 000 rpm pendant 2h30 à 4°C dans une ultracentrifugeuse réglée à l'accélération maximale sans frein pendant la décélération. Les fractions ont été collectées à l'aide d'un collecteur Foxy Jr (Teledyne ISCO).

Purification des protéines à partir du gradient de sucrose

Les fractions correspondantes aux polysomes (12-19) ont été regroupées, 13 µl de glycogène bleu et du TCA à une concentration finale de 15% ont été ajoutés. Après une homogénéisation douce, les échantillons ont été incubés sur glace durant 1 h 15 min puis centrifugés 20 min à 13 000 rpm. Le surnageant a été éliminé et 15 mL d'acétone ont été ajoutés. Les échantillons ont été centrifugés pendant 10 min à 10 000 rpm et l'acétone a été enlevée. Les culots ont été séchés et resuspendus dans 20 uL de tampon contenant 50 mM de Tris-Hcl pH 6.8, 2% SDS, 10% de glycerol et 100mM de DTT.

Digestion trypsique des protéines et analyse par spectrométrie de masse

Les protéines extraites des polysomes dans 20 µl de tampon 50 mM tris-HCl pH 6.8, 2% SDS,10% glycerol, 100 mM DTT sont d'abord réduites pendant 10 minutes à 95°C sous agitation puis alkylées avec de l'iodoacetamide à 60 mM final pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité. Un volume équivalent de 10% SDS est ajouté aux échantillons réduits/alkylés afin d'avoir une concentration finale de 5% SDS préconisée pour une meilleure fixation des protéines sur les microcolonnes « S-Trap™ Mini Spin Column » (PROTIFI) utilisées pour réaliser la digestion trypsique. L'acide phosphorique aqueux 12% est ensuite ajouté aux échantillons protéiques réduits/alkylés (1:10 final), puis 7:1 v:v de tampon S-Trap™ (90% MeOH, 100 mM final TEAB, pH 7.1) et le mélange est transféré dans la microcolonne S-Trap™. La microcolonne S-Trap™ est centrifugée à 4000g jusqu'à ce que tout l'échantillon passe à travers. L'échantillon protéique piégé sur la microcolonne est lavé en ajoutant 400µl de tampon S-Trap™ puis centrifugé 1 minute à 4000g. Ce lavage est répété 6 fois. Les protéines sont ensuite digérées par ajout de 125µl de trypsine porcine (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega) à 8 ng/µl (0.75µg final) préparée dans 50 mM ammonium bicarbonate, puis laissées à incuber toute la nuit à 37°C. Les peptides sont élués par ajout

de 80 µl de 50 mM ammonium bicarbonate suivi d'une centrifugation de 1 minute à 1000g, puis par ajout de 80 µl de 0.2% acide formique suivi d'une centrifugation de 1 minute à 1000g puis enfin par ajout de 80 µl de 50% acetonitrile/0.2% acide formique suivi d'une centrifugation de 1 minute à 1000g. Les extraits peptidiques rassemblés sont séchés au speed vacuum, repris avec 17µl d'une solution à 2% acétonitrile, 0.05% TFA avant l'analyse par spectrométrie de masse.Les peptides sont alors analysés sur système nanoLC -Ultimate 3000 RSLC (Dionex Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) couplé à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). 1 µL de chaque échantillon est injecté deux fois et chargé sur une précolonne C_{18} (300 µm ID x 5 mm, Dionex) à 20 µL/min dans 2% acétonitrile, 0.05% TFA. Après 3 min de dessalage, les peptides sont séparés en ligne sur une colonne 75 µm ID x 50 cm Reprosil C18 (colonne faite-maison, équilibration en 95% de solvant A (0.2% formic acid)) avec un gradient 10 à 30% de solvant B (80% acétonitrile, 0.2% formic acid) pendant 100 min puis de 30% à 45% pendant 20 min à un débit de 300 nL/min (Run de 150 min, gradient de 120 min). Les acquisitions sur le spectromètre de masse sont réalisées en mode DDA (Data-Dependent Acquisition) TopSpeed 3s. Le Survey scan MS est détecté dans l'analyseur Orbitrap sur une plage de masse de 3500 – 1400 m/z et une résolution de 120 000. Les précurseurs les plus intenses de chaque « survey scan » MS sont sélectionnés pour la fragmentation HCD avec une énergie de collision de 28% et les fragments résultants sont détectés dans l'analyseur Orbitrap avec une résolution de 30 000. Un temps d'exclusion dynamique de 60 secondes avec une tolérance de masse de 10 ppm est utilisé pour éviter les sélections répétitives d'un même précurseur. Une calibration interne est réalisée avec l'ion à m/z 445.120025.

Analyse bioinformatique des données MS et MS/MS pour l'identification des protéines et leur quantification relative sans marquage

Toutes les données MS et MS/MS contenues dans les fichiers bruts (.raw) ont été converties au format mzDB (Bouyssié D, Dubois M, Nasso S, Gonzalez de Peredo A, Burlet-Schiltz O, Aebersold R, Monsarrat B. mzDB: a file format using multiple indexing strategies for the efficient analysis of large LC-MS/MS and SWATH-MS data sets. Mol Cell Proteomics. 2015 Mar;14(3):771-81. doi: 10.1074/mcp.O114.039115) avant d'être traitées dans le logiciel MS Angel pour l'interrogation en banques de données protéiques avec le moteur de recherche Mascot (Mascot server v2.6.1; http://www.matrixscience.com). La banque de données UniProtKB/Swiss-Prot avec la taxonomie *Homo sapiens* (Uniprot_human 20190920.fasta ; 173,344 sequences) a été utilisée pour la recherche en banque de données, complétée par les séquences des contaminants les plus fréquemment observés et concaténée avec les séquences inverses de tous les peptides de la banque (banque peptidique aléatoire « decoy »), pour le calcul du taux de faux positifs (FDR). Brièvement, la trypsine/P est utilisée

comme enzyme et deux clivages manqués sont autorisés. La carbamidomethylation des Cysteine (Carbamidomethyl [C]) a été définie comme modification fixe, l'acétylation en N-term des protéines (Acetyl [N-term]), l'oxydation des Methionine, Proline, Arginine, Histidine et Tryptophane (Oxidation [M] ; [P]; [R] ; [HW]), la phosphorylation sur Serine et Threonine (Phospho [ST]), la méthylation des Lysine (Methyl [K]) et l'ubiquitinylation des Lysine (GG [K]) ont été définies comme étant des modifications variables. La déviation en masse autorisée a été fixée à 10 ppm pour les ions précurseurs (MS) et à 20 mmu pour les fragments MS/MS (fragmentation HCD, détection Orbitrap). Le logiciel Proline version 1.6 (Bouyssié, D. et al. Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. Bioinformatics 36, 3148–3155 (2020) a été utilisé pour la validation et la quantification relative des protéines identifiées dans chaque échantillon. Les résultats de l'identification Mascot ont été importés dans Proline pour être validés à la fois au niveau des PSM (Peptide-Spectrum Matches) et des protéines avec 1 % de FDR. La quantification relative a été réalisée pour toutes les protéines identifiées : les peptides ont été quantifiés par extraction des signaux MS dans les fichiers bruts correspondants, et des étapes de post-traitement ont été appliquées pour filtrer, normaliser, calculer les intensités des protéines (la somme des intensités des peptides spécifiques de chaque protéine) et imputer les valeurs manquantes. Après transformation en log2 des données, les valeurs des deux injections ont été moyennées pour chaque échantillon. Seules les protéines identifiées avec plus de 4 MS/MS dans au moins une des deux conditions comparées et quantifiées dans au moins deux répétitions biologiques avant le remplacement des valeurs manquantes ont été soumises à l'analyse statistique. Pour chaque comparaison par paire, un test t de Student bilatéral non apparié avec une variance égale a été appliquée. Les protéines ont été considérées comme significativement variantes lorsque la valeur absolue de leur log2 (Fold Change) était supérieur à 1 et leur p-value inférieure à 0.05. Des volcano plots ont été représentés, -log10 (p-value) en fonction du log2 (Fold Change), pour visualiser les variations significatives de l'abondance des protéines entre les deux conditions comparées.

Purification des ARN à partir du gradient de sucrose

Les fractions de polysomes, de monosomes et des sous-unités libres ont été regroupées de la manière suivante : polysomes (fractions 13-20), monosomes (fractions 10-11-12) et fractions libres (7-8-9). Pour les fractions libres : 1.5 mL de GTC, 4 µL de glycogène bleu ainsi que 2.25 mL de NaAC à 100 mM ont été ajoutés. Par la suite 3.4 mL d'aquaphenol et 3.4 mL de chloroforme ont été ajoutés et mélangés rapidement 1min à 4°C. Les échantillons ont été incubés 5 min à 65°C et centrifugés 5 min

à 4000 rpm (rotor swinging). La phase aqueuse a été extraite et 3 mL de phénol + 3 mL de chloroforme ont été ajoutés. Les échantillons ont été centrifugés 5 min à 4000 rpm (rotor swinging) et la phase aqueuse a été récupérée puis 13 mL d'éthanol 100% ont été ajoutés. Après mélange par inversion, une précipitation à -20°C sur la nuit a été réalisée. Le lendemain, les échantillons ont été centrifugés 20 min à 10 000 rpm (centrifugeuse angle fixe) et le surnageant a été enlevé. De l'éthanol 100% a ensuite été ajouté et les échantillons ont été centrifugés 10 min à 4000 rpm (rotor swinging). Le surnageant a été retiré et les culot ont été séchés. Les échantillons ont été re-suspendus dans 15 µL d'H2O ultra pure. Le même procédé avec les volumes adaptés a été réalisé pour extraire l'ARN des fractions monosomes et polysomes.

RiboMethSeq

L'analyse RiboMethSeq est basée sur la protection que confère la méthylation aux liaisons phosphodiester contre l'hydrolyse alcaline. Le nucléotide 3' en aval est donc absent à l'extrémité 5' dans la collection de séquençage de l'ARN. Une hydrolyse partielle des échantillons d'ARN issus des fractions libres, monosomes et polysomes a été réalisée et suivie d'un séquençage qui permet de comptabiliser les nucléotides se trouvant en 5' des fragments. Le Methscore calculé représente le niveau de méthylation d'un nucléotide donné dans les ARNr. Tout d'abord les ARN sont fragmentés, 1-250ng d'ARN sont soumis à une hydrolyse alcaline dans un tampon contenant 50M de bicarbonate pH 9.2 pendant 4-10 min à 95°C. La réaction a ensuite été arrêtée par une précipitation à l'éthanol en utilisant 0.3 M Na-OAc pH 5.2 et du glycobleu. Les échantillons ont ensuite été centrifugés, le culot a été lavé avec de l'éthanol 80% et resuspendu dans de l'eau sans nucléase. La taille des fragments d'ARN (30-200 nt) générés a été évaluée par électrophorèse capillaire à l'aide d'une puce PicoRNA sur Bioanalyzer 2100 (Agilent). Les ARN fragmentés ont été déphosphorylésà l'extrémité 3' en utilisant 5U de phosphatase antartique (New England Biolabs) pendant 30 min à 37°C. La phosphatase a ensuite été désactivée pendant 5 min à 70°C et l'ARN a été phosphorylé à l'extrémité 5' avec une T4 PNK et 1 mM d'ATP pendant 1 h à 37°C. L'ARN a ensuite été purifié à l'aide du kit RNeasy MinElute Clean-un ki (Qiagen), puis élué dans 10 µl d'H2O sans nucléases Les ARN ont été convertis en librairie en utilisant le kit NEBNext Small RNA library kit (New England Biolabs) et la qualité de la librairie a été analysée en utilisant le Bioanalyzer 2100 puis quantifiée à l'aide du fluoromètre Qubit de Invitrogen. Les librairies ont ensuite été séquencées en utilisant la méthode Illumina NovaSeq. L'analyse bioinformatique pour déterminer les scores de méthylations est détaillée dans l'article de Paraqindes 2023 (Paraqindes et al., 2023). Les scores de méthylation sont donnés en Annexe. L'analyse des

données RiboMethSeq a été réalisée à l'aide du logiciel R, les packages ggplot2 et pheatmap ont été utilisés pour la visualisation. L'analyse structurelle a été réalisée à l'aide du logiciel Pymol.

Statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de test de Student avec la correction de Welch ou du test non paramétrique de comparaison des rangs de Mann-Whitney, à l'aide du logiciel GraphPad Prism en fonction du nombre de n obtenus et de la configuration de l'expérience. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- erreur standard de la moyenne, *p<0,05, **p<0,01,***<0,001, ****<0,0001.

Anticorps

Antibody used	Brand	Ref	Dilution	Species
eIF2α	Cell Signaling Technology	9721	1/50e	Rabbit
eIF2α-P	Cell Signaling Technology	2103	1/50e	Mouse
VEGFC	R&D	AF752	1/25e	Goat
Dhx9	Abcam	ab26271	1/25e	Rabbit
p53	R&D Systems	AF1355	1/100e	Goat
RPL13A	Novus	NBP1-32710	1/1000e	Rabbit
RPL26	abcam	ab59567	1/1000e	Rabbit
RPS6	Santa Cruz	Santa Cruz	1/150	Mouse
RPS2	bethyl laboratory	A303-794A	1/150	Rabbit
GRP78	Novus Biological	NB100-56411	1/250	Rabbit

Table shRNA		
shRNA RPL13A	Sense oligo	CCG GTG CAT CAA CAT TTC TGG CAA TTT TCA AGA GAA ATT GCC AGA AAT GTT GAT GCT TTT TTG
	Antisense oligo	AAT TCA AAA AAG CAT CAA CAT TTC TGG CAA TTT CTC TTG AAA ATT GCC AGA AAT GTT GAT GCA
shRNA RPL26	Sense oligo	CCG GTC CAG GTT TAC AGG AAG AAA TAT TCA AGA GAT ATT TCT TCC TGT AAA CCT GGT TTT TTG
	Antisense oligo	AAT TCA AAA AAC CAG GTT TAC AGG AAG AAA TAT CTC TTG AAT ATT TCT TCC TGT AAA CCT GGA
shRNA DHX9	Sense oligo	CCG GTT CGA GGA ATC AGT CAT GTA ATT TCA AGA GAA TTA CAT GAC TGA TTC CTC GAT TTT TTG
	Antisense oligo	AAT TCA AAA AAT CGA GGA ATC AGT CAT GTA ATT CTC TTG AAA TTA CAT GAC TGA TTC CTC GAA
shRNA Ctrl	Sense oligo	CCG GTC AAC AAG ATG AAG AGC ACC AAT TCA AGA GAT TGG TGC TCT TCA TCT TGT TGT TTT TTG
	Antisense oligo	AAT TCA AAA AAC AAC AAG ATG AAG AGC ACC AAT CTC TTG AAT TGG TGC TCT TCA TCT TGT TGA
Table siARN		
siARN DHX9 SMART pool Dharmacon	1	GGAUUAAACUGAAAUAUC
	2	GCUUUGGUUGUUGAAGUA
	3	CAAACAACCUCUAUCAUC
	4	GUAAAUGAACGUAUGCUGA
siARN DDX17 SMART pool Dharmacon	1	CAAGGAUGGUGGCCGGAGA
	2	CGAUAGAGCUGGUUAUGCU
	3	CAAAUGCAGUGUAGAGCUA
	4	GGAGUGCAUUUGAUAGUUA
siARN non-targeting SMART pool Dharmacon	1	UGGUUUACAUGUCGACUAA
	2	UGGUUUACAUGUUGUGUGA
	3	UGGUUUACAUGUUUUCUGA
	4	UGGUUUACAUGUUUUCCUA

Amorces qPCR

RPL13A	F	TAAACAGGTACTGCTGGGCCG
RPL13A	R	CTCGGGAAGGGTTGGTGTTC
RPL26	F	TCTTCCCTTTTGCGGCCATC
RPL26	R	TCGGTCGGAAGTCACAAAGG
Fluc	F	GTGTTGTTCCATTCCATCA
Fluc	R	TTGGCGAAGAAGGAGAATA
Rluc	F	GCCTGATATTGAAGAAGATATTG
Rluc	R	CCTTTCTCTTTGAATGGTTC
DHX9	F	GGAAGCGAAGGCTGATCTGA
DHX9	R	TTTGCCACACCAGGCATACA
HPRT	F	TGGCCATCTGCCTAGTAAAGC
HPRT	R	GGACGCAGCAACTGACATTTC
SNORD66	F	CCTCTGATGACTTCCTGTTAGTGCC
SNORD66	R	CCTCAGATCCTCAGTTCCATCATGG
SNORD45C	F	GATGAGTTGGCATGTATTCTG
SNORD45C	R	GGTCTCAGAGTAATTCTAGAGC
SNORD61	F	GCTATGATGAATTTGATTGCATTGATCG
SNORD61	R	AAGCTCAGAACTTCTTAGAGGACAAAAA
SNORD68	F	CGCGTGATGACATTCTCCGGAAT
SNORD68	R	AATCAGATGGAAAAGGGTTCAAATGTGC
SNORD119	F	CCTTAGCTGGATTAATGATGAGATATAACC
SNORD119	R	CCACGCTGGATCTCAGAGTAAT
28S-1868	F	CTAGCTACATGATGCTTGCAGAGC
28S-1868	R	CACAGCTGTCAGGTTGTCAAGG
SNORD30	F	GTTTGTGATGACTTACATGGAATCTCG
SNORD30	R	GAAAATCAGATTTCAGAGTCTCAACAGC
SNORD79	F	CTGTTAGTGATGATTTTAAAATTAAAGCAG
SNORD79	R	TGTTTCAGTTTAAGATTAATCTCCATTTTC
SNORD69	F	GCAAATGATGATAAACTGGATCTGACTGAC
SNORD69	R	CATGAAGCTCAGGGTTGGATTGAAC
SNORD91A	F	TATTCATATCGTCTGAACCTGTCTGAAGC
SNORD91A	R	GGAGAAGTCTCAGAACCACACAGAG
SNORD143	F	ATGTCCAATGATTAAATTTTTTCCACTGCT
SNORD143	R	ATGTCCTCATCCACATACATTAATCACAA
FBL	F	CATCGGCATGAGGGTGTCTT
FBL	R	GTTCCAGGCTCGGTACTCAA
XBP1	F	CTGGAACAGCAAGTGGTAGA
XBP1	R	CTCCTCCAGGCTGGCAGG
VEGFC	F	AAAGAAGTTCCACCACCAAAC
VEGFC	R	AGGGACACAACGACACACTTC
FGF1	F	GCTGAAGGGGAAATCACCAC
FGF1	R	CCCGTTGCTACAGTAGAGGAG
Amorces clonage		
hU6 promoter/PLO.1 5'	F	GACTATCATATGCTTACCGT
pCMV F	F	AACAACTCCGCCCCATTGACG

Annexes

- Table 1 : Activités IRES en réponse au traitement à la tunicamycine
- Table 2 : Activités IRES en réponse au traitement à la doxorubicine
- Table 3 : Activités IRES en réponse au shARN RPL13A
- Table 4 : Activité IRES en réponse à la surexpression RPL13A
- Table 5 : Activitéss IRES en réponse au siDHX9
- Table 6 : Activités IRES en réponse au siDDX17
- Table 7 : Scores de méthylations SSU et LSU HDLEC
- Table 8 : Scores de méthylations en réponse aux différents traitements
- ” Circular RNA, the key for translation” *Int J Mol Sci, 2020*
- “ Translational control by long non-coding RNAs” *Biochimie., 2023*
- “ Rôle de l’ARN non codant NEAT1dans le contrôle de la traduction des ARN messagers par le noyau cellulaire » *MedSci, 2023*

FGF1 IRES
LucR

Renilla	Time	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD
	0h	1	36 714	49 519	50 111	45 447,89	7569,67	75 408,76	27 591,74
		2	70 195	70 780	83 759	74 911,06	7667,79		
		3	91 465	118 994	107 143	105 867,33	13808,78		
		4							
	2h	1	32 530	35 990	32 016	33 512,00	2161,50	60 313,22	37 980,48
		2	54 668	49 398	36 970	47 011,94	9087,31		
		3	119 978	120 956		120 466,97	691,20		
		4							
	4h	1	56 459	50 762	49 675	52 298,22	3643,72	71 352,08	21 445,59
		2	77 119	64 995	67 860	69 991,39	6336,44		
		3	93 535	110 413		101 973,89	11935,02		
		4							
	6h	1	79 825	63 907	70 169	71 300,33	8019,05	85 553,56	20 210,23
		2	101 734	83 725	62 980	82 813,17	19393,07		
		3	115 885	106 203		111 043,97	6845,85		
		4							
	8h	1	57 400	46 073	45 385	49 619,00	6746,93	85 279,89	25 791,55
		2	99 082	95 683	96 011	96 925,56	1874,83		
		3	119 400	99 232	70 579	96 403,67	24533,39		
		4	106 758	102 477		104 617,06	3027,12		
	16h	1	33 026	25 943	59 564	39 510,89	17723,84	79 416,56	56 353,01
		2	131 185	147 366		139 275,06	11441,69		
		3							
		4							
	24h	1	21 149	22 322	21 705	21 725,00	586,93	50 854,76	38 216,84
		2	42 834	44 662	33 712	40 402,78	5865,93		
		3	99 490	120 965		110 227,39	15185,59		
Ctrl		4							
	2h	1	29 266	23 990	27 153	26 802,89	2655,36	53 279,85	36 790,66
		2	46 572	29 281	48 068	41 307,11	10441,35		
		3	105 621	116 288		110 954,39	7542,71		
		4							
	4h	1	87 056	17 553	16 786	40 464,78	40350,91	58 508,49	35 924,27
		2	44 049	35 341	60 623	46 671,11	12843,54		
		3	99 299	107 362		103 330,14	5701,52		
		4							
	6h	1	20 858	17 288	15 405	17 850,22	2769,44	36 786,85	28 606,20
		2	37 491	22 360	17 658	25 836,44	10363,11		
		3	76 981	86 254		81 617,39	6557,47		
		4							
	8h	1	17 028	10 250	9 796	12 358,00	4050,32	32 345,22	21 130,70
		2	26 647	64 878	27 256	39 594,00	21898,80		
		3	37 033	17 129	22 411	25 524,67	10310,58		
		4	57 027	66 340		61 683,72	6585,29		
	16h	1	19 943	16 078		18 010,22	2732,73	20 529,39	3 326,62
		2	22 632	23 465		23 048,56	588,78		
		3							
		4							
	24h	1	20 825	17 411	16 119	18 118,33	2431,06	27 879,85	13 933,40
		2	24 284	24 518	19 983	22 928,44	2553,70		
		3	49 406	50 492		49 949,22	767,92		
Tm		4							

Table 1: Activité IRES en réponse au traitement à la tunicamycine

FGF1 IRES
LucF

Firefly	Time	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD
	0h	1	5 941,78	8 048,78	6 442,44	6 811,00	1 100,79	6 531,57	1 225,26
		2	7 317,78	4 398,78	8 066,94	6 594,50	1 938,09		
		3	5 600,89	5 791,56	7 175,22	6 189,22	859,21		
		4							
	2h	1	6 483,44	3 929,44	9 989,11	6 800,67	3 042,26	8 068,20	3 357,55
		2	13 843,44	11 540,44	6 550,44	10 644,78	3 728,09		
		3	5 824,56	6 384,72		6 104,64	396,10		
		4							
	4h	1	5 601,44	4 091,44	4 865,11	4 852,67	755,08	8 550,56	6 066,99
		2	11 836,44	22 343,78	6 240,78	13 473,67	8 175,39		
		3	7 797,89	5 627,56		6 712,72	1 534,66		
		4							
	6h	1	6 637,11	5 244,44	4 343,78	5 408,44	1 155,43	7 392,35	2 681,09
		2	12 848,11	9 337,44	7 572,44	9 919,33	2 685,54		
		3	5 895,22	7 260,22		6 577,72	965,20		
		4							
	8h	1	3 679,11	4 116,44	4 569,78	4 121,78	445,36	8 736,62	5 283,60
		2	7 217,44	12 450,44	21 566,78	13 744,89	7 261,72		
		3	13 416,44	7 945,44	7 547,44	9 636,44	3 279,62		
		4	7 957,89	5 635,56		6 796,72	1 642,14		
	16h	1	4 641,44	7 297,78	3 105,11	5 014,78	2 121,12	6 265,02	2 409,01
		2	9 256,56	7 024,22		8 140,39	1 578,50		
		3							
		4							
	24h	1	6 610,44	3 111,11	7 459,78	5 727,11	2 304,98	6 514,64	1 980,56
		2	6 820,44	4 764,11	9 935,78	7 173,44	2 603,84		
		3	6 575,22	6 840,22		6 707,72	187,38		
Ctrl		4							
	2h	1	7 880,44	2 793,11	7 878,44	6 184,00	2 936,60	6 490,14	1 770,93
		2	6 173,11	5 990,78	5 677,11	5 947,00	250,88		
		3	8 054,22	7 473,89		7 764,06	410,36		
		4							
	4h	1	6 139,11	6 733,78	8 034,44	6 969,11	969,33	8 929,08	2 930,34
		2	7 506,78	10 848,44	15 184,78	11 180,00	3 849,72		
		3	7 631,56	9 353,72		8 492,64	1 217,76		
		4							
	6h	1	7 874,11	3 186,44	7 560,44	6 207,00	2 620,58	7 428,47	2 543,38
		2	12 245,44	5 699,44	8 212,11	8 719,00	3 302,31		
		3	6 976,89	7 672,89		7 324,89	492,15		
		4							
	8h	1	3 831,11	6 637,44	3 279,44	4 582,67	1 800,74	8 275,83	4 075,58
		2	11 145,78	12 895,44	14 912,11	12 984,44	1 884,74		
		3	13 039,11	4 064,44	7 170,44	8 091,33	4 557,65		
		4	6 624,22	7 434,56		7 029,39	572,99		
	16h	1	3 402,44	2 056,78		2 729,61	951,53	3 582,17	1 192,16
		2	4 909,56	3 959,89		4 434,72	671,52		
		3							
		4							
	24h	1	3 342,44	5 601,44	3 379,78	4 107,89	1 293,59	5 241,08	1 627,93
		2	8 331,11	6 368,11	5 422,78	6 707,33	1 483,54		
		3	4 766,22	4 716,72		4 741,47	35,00		
Tm		4							

Table 1: Activité IRES en réponse au traitement à la tunicamycine

FGF1 IRES
LucF/LucR

Ratio	Time	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	p-value
	0h	1	0,1618	0,1625	0,1286	0,15	0,019	0,10	0,04	
		2	0,1042	0,0621	0,0963	0,09	0,022			
		3	0,0612	0,0487	0,0670	0,06	0,009			
		4								
	2h	1	0,1993	0,1092	0,3120	0,21	0,102	0,17	0,10	
		2	0,2532	0,2336	0,1772	0,22	0,039			
		3	0,0485	0,0528		0,05	0,003			
		4								
	4h	1	0,0992	0,0806	0,0979	0,09	0,010	0,13	0,09	
		2	0,1535	0,3438	0,0920	0,20	0,131			
		3	0,0834	0,0510		0,07	0,023			
		4								
	6h	1	0,0831	0,0821	0,0619	0,08	0,012	0,09	0,03	
		2	0,1263	0,1115	0,1202	0,12	0,007			
		3	0,0509	0,0684		0,06	0,012			
		4								
	8h	1	0,0641	0,0893	0,1007	0,08	0,019	0,10	0,05	
		2	0,0728	0,1301	0,2246	0,14	0,077			
		3	0,1124	0,0801	0,1069	0,10	0,017			
		4	0,0745	0,0550		0,06	0,014			
	16h	1	0,0657	0,0824	0,0607	0,07	0,011	0,07	0,01	
		2	0,0706	0,0477		0,06	0,016			
		3								
		4								
	24h	1	0,3126	0,1394	0,3437	0,27	0,110	0,18	0,12	
		2	0,1592	0,1067	0,2947	0,19	0,097			
		3	0,0661	0,0565		0,06	0,007			
Ctrl		4								
	2h	1	0,2693	0,1164	0,2902	0,23	0,095	0,16	0,09	1,00
		2	0,1325	0,2046	0,1181	0,15	0,046			
		3	0,0763	0,0643		0,07	0,008			
		4								
	4h	1	0,0700	0,3836	0,4787	0,31	0,214	0,23	0,15	0,3282
		2	0,1704	0,3070	0,2505	0,24	0,069			
		3	0,0769	0,0871		0,08	0,007			
		4								
	6h	1	0,3775	0,1843	0,4908	0,35	0,155	0,28	0,16	0,0047
		2	0,3266	0,2549	0,4651	0,35	0,107			
		3	0,0906	0,0890		0,09	0,001			
		4								
	8h	1	0,2250	0,6475	0,3348	0,40	0,219	0,32	0,17	
		2	0,4183	0,1988	0,5471	0,39	0,176			
		3	0,3521	0,2373	0,3199	0,30	0,059			
		4	0,1162	0,1121		0,11	0,003			0,0001
	16h	1	0,1706	0,1279		0,15	0,030	0,17	0,04	
		2	0,2169	0,1688		0,19	0,034			
		3								
		4								0,0015
	24h	1	0,1605	0,3217	0,2097	0,23	0,083	0,22	0,09609214	
		2	0,3431	0,2597	0,2714	0,29	0,045			
		3	0,0965	0,0934		0,09	0,002			
Tm		4				#DIV/0!	#DIV/0!			0,5737

Table 1: Activité IRES en réponse au traitement à la tunicamycine

VEGFC IRES
LucR

Renilla	Time		A	B	C	Mean	SD	Mean	SD
		1	58940,89	45254,56	55390,22	53195,22	7102,28		
		2	101559,67	71686,33	89214,67	87486,89	15011,43		
	0h	3	58983,22	51455,22	52683,56	54374,00	4038,68	58514,82	31039,15
		4	70589,11	73428,11	114842,11	86286,44	24770,64		
		5	10330,22	11815,56	11548,89	11231,56	791,88		
		1	38491,22	33789,56	36493,56	36258,11	2359,66		
		2	88796,67	99053,00	78439,00	88762,89	10307,04		
	2h	3	66833,89	50726,89	58074,56	58545,11	8063,80	51756,39	27054,18
		4	70113,11	39123,78	46853,11	52030,00	16130,25		
		5	8525,22	9275,89		8900,56	530,80		
		1	28345,22	43674,89	33169,89	35063,33	7838,27		
		2	99972,00	78708,00	79157,33	85945,78	12149,14		
	4h	3	64360,22	65065,89	65884,22	65103,44	762,69	56660,70	27257,72
		4	46409,78	84626,11	77122,78	69386,22	20248,77		
		5	13953,56	12799,89		13376,72	815,77		
		1	47575,50	51920,17	46186,83	48560,83	2990,98		
		2	146924,67			146924,67	#DIV/0!		
	6h	3	101839,56	100395,89	107794,89	103343,44	3922,06	72791,11	41066,43
		4	91512,78	63392,78	93471,78	82792,44	16829,13		
		5	10502,89	11975,56		11239,22	1041,33		
		1	51352,17	64490,83	81320,17	65721,06	15021,83		
		2	109329,67	97842,33	111301,33	106157,78	7268,55		
	8h	3	51149,56	55293,22	64138,56	56860,44	6634,81	76567,96	40997,95
		4	114781,11	94347,44	156618,61	121915,72	31742,74		
		5	12457,89	7528,56		9993,22	3485,57		
		1	76766,67	68237,33	70420,00	71808,00	4430,83		
		2	43144,89	40634,22	44880,56	42886,56	2134,92		
	16h	3	8777,56	7788,89		8283,22	699,09	45081,26	26496,54
		4				#DIV/0!	#DIV/0!		
		5				#DIV/0!	#DIV/0!		
		1	22359,22	25731,22	20153,56	22748,00	2809,08		
		2	88654,11	67395,11	77112,61	77720,61	10642,53		
	24h	3	4841,72	5510,22		5175,97	472,70	38969,72	33425,60
		4				#DIV/0!	#DIV/0!		
Ctrl		5				#DIV/0!	#DIV/0!		
		1	24419,22	29407,89	21286,56	25037,89	4095,86		
		2	81438,00	67163,00	93887,67	80829,56	13372,72		
	2h	3	47370,89	39401,56	46449,89	44407,44	4359,62	43510,84	25477,52
		4	51127,11	33240,44	57023,78	47130,44	12385,14		
		5	9651,56	7284,22		8467,89	1673,96		
		1	27366,89	35481,89	16964,89	26604,56	9282,01		
		2	56810,00	73352,00	86991,33	72384,44	15113,91		
	4h	3	31501,56	37704,89	31651,56	33619,33	3538,99	37748,01	21386,62
		4	37287,78	30354,11	36311,11	34651,00	3753,12		
		5	16613,89	10080,22		13347,06	4620,00		
		1	36221,50	18079,50	16731,83	23677,61	10884,20		
		2	66079,33	51689,67	62683,50	60150,83	7521,73		
	6h	3	29720,89	28252,22	35721,22	31231,44	3957,00	30948,19	18779,74
		4	24313,61	18729,44	33839,44	25627,50	7640,21		
		5	5374,56	5837,89		5606,22	327,63		
		1	18188,17	12545,17	17396,17	16043,17	3055,13		
		2	37701,33	40645,00	63068,33	47138,22	13874,17		
	8h	3	13845,89	13353,56	13290,22	13496,56	304,18	22957,16	16242,64
		4	20093,78	27605,44	34856,78	27518,67	7381,88		
		5	4307,89	4502,56		4405,22	137,65		
		1	41492,00	49808,00	51002,00	47434,00	5180,44		
		2	28358,89	33864,89		31111,89	3893,33		
	16h	3	6646,56	6008,22		6327,39	451,37	31025,79	18693,85
		4				#DIV/0!	#DIV/0!		
		5				#DIV/0!	#DIV/0!		
		1	30424,89	32706,22	25651,22	29594,11	3600,13		
		2	53456,44	44479,44	55827,78	51254,56	5986,02		
	24h	3	4023,72			4023,72	#DIV/0!	35224,25	17967,87
		4				#DIV/0!	#DIV/0!		
Tm		5				#DIV/0!	#DIV/0!		

Table 1: Activité IRES en réponse au traitement à la tunicamycine

VEGFC IRES
LucF

Firefly	Time	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD
	0h	1	3 540,78	4 227,78	3 542,78	3 770,44	396,06	3 275,33	2 324,72
		2	1 563,33	1 789,00	2 638,00	1 996,78	566,66		
		3	3 183,11	4 618,78	2 756,11	3 519,33	975,79		
		4	5 042,78	9 857,44	4 212,11	6 370,78	3 047,97		
		5	689,89	901,22	566,89	719,33	169,10		
	2h	1	3 805,11	4 539,78	3 503,78	3 949,56	532,89	3 108,79	1 464,81
		2	1 419,67	2 656,33	2 308,00	2 128,00	637,68		
		3	4 401,11	2 475,11	3 708,11	3 528,11	975,54		
		4	4 577,44	4 070,78	4 895,44	4 514,56	415,91		
		5	472,56	689,89		581,22	153,68		
	4h	1	3 450,44	5 046,44	2 359,11	3 618,67	1 351,54	3 204,34	1 749,38
		2	4 613,67	1 682,33	1 308,67	2 534,89	1 809,94		
		3	2 257,78	3 344,78	3 270,78	2 957,78	607,35		
		4	4 278,11	5 324,11	6 308,78	5 303,67	1 015,49		
		5	685,89	929,89		807,89	172,53		
	6h	1	3 377,50	3 988,83	2 563,17	3 309,83	715,24	3 518,75	1 762,96
		2	2 613,33			2 613,33	#DIV/0!		
		3	4 604,44	3 069,78	4 151,11	3 941,78	788,46		
		4	4 991,44	4 776,44	6 749,78	5 505,89	1 082,59		
		5	733,22	605,89		669,56	90,04		
	8h	1	3 002,17	4 181,50	3 379,83	3 521,17	602,24	3 722,73	1 747,74
		2	5 784,33	3 415,00	2 990,67	4 063,33	1 505,46		
		3	2 302,78	5 453,78	4 276,11	4 010,89	1 592,15		
		4	5 512,94	4 770,11	5 875,94	5 386,33	563,68		
		5	749,56	423,56		586,56	230,52		
	16h	1	3 702,67	2 351,00	2 861,67	2 971,78	682,53	2 416,01	1 103,71
		2	2 835,78	3 346,78	2 723,11	2 968,56	332,36		
		3	706,22	800,89		753,56	66,94		
		4				#DIV/0!	#DIV/0!		
		5				#DIV/0!	#DIV/0!		
	24h	1	2 028,11	2 711,11	2 341,78	2 360,33	341,88	2 948,43	1 437,20
		2	4 081,94	4 491,11	4 897,44	4 490,17	407,75		
		3	614,72	2 421,22		1 517,97	1 277,39		
		4				#DIV/0!	#DIV/0!		
Ctrl		5				#DIV/0!	#DIV/0!		
	2h	1	2 851,78	2 773,44	1 914,11	2 513,11	520,23	2 728,48	1 400,45
		2	1 715,00	1 647,33	2 375,33	1 912,56	402,20		
		3	3 193,11	2 811,44	4 263,78	3 422,78	752,91		
		4	4 100,44	4 072,78	5 348,78	4 507,33	728,84		
		5	515,56	615,89		565,72	70,95		
	4h	1	2 389,78	1 770,44	2 100,78	2 087,00	309,90	2 516,79	1 590,09
		2	1 308,67	652,67	2 765,33	1 575,56	1 081,32		
		3	2 846,44	2 934,78	2 354,11	2 711,78	312,88		
		4	6 649,11	4 195,78	3 614,44	4 819,78	1 610,69		
		5	855,89	796,89		826,39	41,72		
	6h	1	2 132,50	1 750,83	1 835,17	1 906,17	200,49	2 516,96	1 133,69
		2	2 943,33	2 783,00	2 334,67	2 687,00	315,48		
		3	2 844,44	2 128,44	3 385,78	2 786,22	630,69		
		4	4 078,94	3 042,78	4 659,11	3 926,94	818,82		
		5	694,22	624,22		659,22	49,50		
	8h	1	2 384,83	1 972,50	1 492,50	1 949,94	446,59	2 182,73	1 116,71
		2	2 342,00	1 610,00	2 387,67	2 113,22	436,40		
		3	2 099,78	2 147,11	1 433,11	1 893,33	399,27		
		4	3 523,11	3 637,78	4 478,78	3 879,89	521,81		
		5	523,56	525,56		524,56	1,41		
	16h	1	2 432,67	2 712,00	3 313,00	2 819,22	449,85	2 096,05	968,08
		2	2 360,44	2 308,78		2 334,61	36,53		
		3	898,89	646,56		772,72	178,43		
		4				#DIV/0!	#DIV/0!		
		5				#DIV/0!	#DIV/0!		
	24h	1	2 965,44	3 714,11	2 122,11	2 933,89	796,47	3 048,58	1 396,37
		2	3 920,44	3 371,11	4 764,11	4 018,56	701,66		
		3	482,72			482,72	#DIV/0!		
		4				#DIV/0!	#DIV/0!		
Tm		5				#DIV/0!	#DIV/0!		

Table 1: Activité IRES en réponse au traitement à la tunicamycine

VEGFC IRES
LucF/LucR

Ratio	Time	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	p-value
	0h	1	0,0601	0,0934	0,0640	0,07	0,02	0,1	0,0303006	
		2	0,0154	0,0250	0,0296	0,02	0,01			
		3	0,0540	0,0898	0,0523	0,07	0,02			
		4	0,0714	0,1342	0,0367	0,08	0,05			
		5	0,0668	0,0763	0,0491	0,06	0,01			
	2h	1	0,0989	0,1344	0,0960	0,11	0,02	0,1	0,0341774	
		2	0,0160	0,0268	0,0294	0,02	0,01			
		3	0,0659	0,0488	0,0639	0,06	0,01			
		4	0,0653	0,1040	0,1045	0,09	0,02			
		5	0,0554	0,0744		0,06	0,01			
	4h	1	0,1217	0,1155	0,0711	0,10	0,03	0,1	0,03166185	
		2	0,0461	0,0214	0,0165	0,03	0,02			
		3	0,0351	0,0514	0,0496	0,05	0,01			
		4	0,0922	0,0629	0,0818	0,08	0,01			
		5	0,0492	0,0726		0,06	0,02			
	6h	1	0,0710	0,0768	0,0555	0,07	0,01	0,1	0,01914138	
		2	0,0178			0,02	#DIV/0!			
		3	0,0452	0,0306	0,0385	0,04	0,01			
		4	0,0545	0,0753	0,0722	0,07	0,01			
		5	0,0698	0,0506		0,06	0,01			
	8h	1	0,0585	0,0648	0,0416	0,05	0,01	0,1	0,0174894	
		2	0,0529	0,0349	0,0269	0,04	0,01			
		3	0,0450	0,0986	0,0667	0,07	0,03			
		4	0,0480	0,0506	0,0375	0,05	0,01			
		5	0,0602	0,0563		0,06	0,00			
	16h	1	0,0482	0,0345	0,0406	0,04	0,01	0,1	0,02328543	
		2	0,0657	0,0824	0,0607	0,07	0,01			
		3	0,0805	0,1028		0,09	0,02			
		4				#DIV/0!	#DIV/0!			
		5				#DIV/0!	#DIV/0!			
	24h	1	0,0907	0,1054	0,1162	0,10	0,01	0,1	0,1273574	
		2	0,0460	0,0666	0,0635	0,06	0,01			
		3	0,1270	0,4394		0,28	0,22			
		4				#DIV/0!	#DIV/0!			
Ctrl		5				#DIV/0!	#DIV/0!			
	2h	1	0,1168	0,0943	0,0899	0,10	0,01	0,1	0,03258782	0,95
		2	0,0211	0,0245	0,0253	0,02	0,00			
		3	0,0674	0,0714	0,0918	0,08	0,01			
		4	0,0802	0,1225	0,0938	0,10	0,02			
		5	0,0534	0,0846		0,07	0,02			
	4h	1	0,0873	0,0499	0,1238	0,09	0,04	0,1	0,04632486	
		2	0,0230	0,0089	0,0318	0,02	0,01			
		3	0,0904	0,0778	0,0744	0,08	0,01			
		4	0,1783	0,1382	0,0995	0,14	0,04			
		5	0,0515	0,0791		0,07	0,02			0,26
	6h	1	0,0589	0,0968	0,1097	0,09	0,03	0,1	0,04145856	
		2	0,0445	0,0538	0,0372	0,05	0,01			
		3	0,0957	0,0753	0,0948	0,09	0,01			
		4	0,1678	0,1625	0,1377	0,16	0,02			
		5	0,1292	0,1069		0,12	0,02			0,0067
	8h	1	0,1311	0,1572	0,0858	0,12	0,04	0,1	0,04382432	
		2	0,0621	0,0396	0,0379	0,05	0,01			
		3	0,1517	0,1608	0,1078	0,14	0,03			
		4	0,1753	0,1318	0,1285	0,15	0,03			
		5	0,1215	0,1167		0,12	0,00			0,0005
	16h	1	0,0586	0,0544	0,0650	0,06	0,01	0,1	0,02966045	
		2	0,0832	0,0682		0,08	0,01			
		3	0,1352	0,1076		0,12	0,02			
		4				#DIV/0!	#DIV/0!			
		5				#DIV/0!	#DIV/0!			0,28
	24h	1	0,0975	0,1136	0,0827	0,10	0,02	0,1	0,01832948	
		2	0,0733	0,0758	0,0853	0,08	0,01			
		3	0,1200			0,12	#DIV/0!			
		4				#DIV/0!	#DIV/0!			
Tm		5				#DIV/0!	#DIV/0!			0,95

Table 1: Activité IRES en réponse au traitement à la tunicamycine

Hairpin LucR

Renilla	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD
	1	5638491,33	6292092,67	5499981,33	5810188,44	423048,48		
	2	119038,83	136401,50	50468,17	101969,50	45438,49		
	3	260267,00	147535,33	158961,33	188921,22	62050,81		
	4	103990,67	138895,33	143964,00	128950,00	21763,48		
Ctrl	5	127299,50	87573,83	70983,50	95285,61	28939,19	1265062,96	2358220,98
	1	1640172,33	1595919,00	1488710,00	1574933,78	77881,28		
	2	74413,83	58070,17	106019,83	79501,28	24376,30		
	3	75957,00	74125,00	62746,67	70942,89	7157,00		
	4	37340,67	101601,50	47590,50	62177,56	34524,63		
Tm	5	64738,17	47561,17	70899,00	61066,11	12094,49	369724,32	624714,32

Hairpin LucF

Firefly	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD
	1	68300,33	71169,33	56978,33	65482,67	7503,37		
	2	1602,33	2294,00	2900,33	2265,56	649,47		
	3	6687,00	6986,00	6633,67	6768,89	189,91		
	4	3362,50	4688,17	3936,17	3995,61	664,83		
Ctrl	5	3896,83	2789,33	4446,33	3710,83	844,01	16444,71	25586,54
	1	64146,67	74193,33	68656,33	68998,78	5032,08		
	2	3288,67	1723,33	3949,83	2987,28	1143,44		
	3	6334,67	5446,00	5640,00	5806,89	467,25		
	4	3031,50	4766,17	4196,17	3997,94	884,16		
Tm	5	2393,67	2003,33	2633,83	2343,61	318,22	16826,90	27101,85

Hairpin LucF/LucR

Ratio	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	p-value
	1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00			
	2	0,01	0,02	0,06	0,03	0,02			
	3	0,03	0,05	0,04	0,04	0,01			
	4	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00			
Ctrl	5	0,03	0,03	0,06	0,04	0,02	0,03	0,02	
	1	0,04	0,05	0,05	0,04	0,00			
	2	0,04	0,03	0,04	0,04	0,01			
	3	0,08	0,07	0,09	0,08	0,01			
	4	0,08	0,05	0,09	0,07	0,02			
Tm	5	0,04	0,04	0,04	0,04	0,00	0,05	0,02	0,0017

Table 1: Activité IRES en réponse au traitement à la tunicamycine.

FGF1 IRES
LucR

Renilla	Time	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD
	0h	1	47615	58165	ND	52 889,50	7459,98	51 408,67	7847,63746
		2	49662	51106	42015	47 594,33	4885,68		
		3	52331	66374	44002	54 235,78	11306,99		
	2h	1	55467	75142	ND	65 304,33	13911,85	56 551,63	12083,6161
		2	70448	42848	49758	54 351,67	14361,71		
		3	64711	46970	47069	52 916,44	10214,12		
	4h	1	73465	95643	ND	84 553,83	15681,74	75 021,50	10846,57
		2	67818	65478	84643	72 646,56	10455,32		
		3	69460	64448	79217	71 041,56	7510,68		
	6h	1	108833	70305	ND	89 568,50	27243,41	90 216,83	17405,90
		2	110012	94468	105971	103 483,72	8065,09		
		3	76440	88438	67269	77 382,17	10616,16		
	8h	1	51982	50413	ND	51 197,00	1109,45	86 675,38	27609,56
		2	115424	117479	116578	116 493,67	1030,12		
		3	75796	83343	82389	80 509,33	4109,72		
	16h	1	25914	ND	ND	25 913,50	ND	32 476,17	7792,78
		2	44894	29551	37136	37 193,89	7671,99		
		3	38343	28181	23315	29 946,00	7668,14		
	24h	1	30089	31314	ND	30 701,25	865,85	29 326,35	6474,55
		2	31471	30568	41526	34 521,89	6082,90		
Ctrl		3	26751	22689	20203	23 214,22	3305,25		
	2h	1	50281	53832	ND	52 056,67	2510,94	40 078,79	10839,86
		2	45520	44802	42946	44 422,78	1328,50		
		3	25612	30586	27050	27 749,56	2559,68		
	4h	1	60093	50523	ND	55 307,83	6766,54	34 100,75	13922,05
		2	24925	33298	28550	28 924,44	4199,22		
		3	28433	27887	19097	25 139,00	5239,73		
	6h	1	41899	31475	ND	36 686,50	7370,88	29 460,25	9594,10
		2	26699	30665	44281	33 881,78	9222,06		
		3	20849	19637	20178	20 221,22	607,49		
	8h	1	28003	22144	ND	25 073,50	4142,94	22 963,31	3393,98
		2	25218	26288	20328	23 944,72	3177,43		
		3	22275	21966	17485	20 575,11	2680,68		
	16h	1	ND	20228	ND	20 227,50	ND	9 343,21	5020,98
		2	6561	5678	6100	6 113,33	441,65		
		3	8412	9532	8892	8 945,00	561,89		
	24h	1	10286	22212	ND	16 248,75	8433,31	9 565,60	5995,79
		2	5605	5413	8457	6 491,78	1704,75		
Dox		3	14002	4752	5798	8 184,00	5065,22		

Table 2: Activité IRES en réponse au traitement à la doxorubicine

FGF1 IRES
LucF

Firefly	Time	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD
	0h	1	1032,00	1368,33	ND	1 200,17	237,82	5 897,21	3 932,03
		2	5829,56	5123,89	5525,89	5 493,11	353,97		
		3	8091,11	13502,44	6704,44	9 432,67	3592,08		
	2h	1	9604,33	10127,33	ND	9 865,83	369,82	9 934,08	2 286,22
		2	8143,89	13628,39	11901,56	11 224,61	2804,22		
		3	9235,78	10719,94	6111,44	8 689,06	2352,39		
	4h	1	10027,00	11194,33	ND	10 610,67	825,43	9 505,04	1 320,95
		2	10077,89	7751,89	10894,56	9 574,78	1630,62		
		3	8485,11	7873,44	9736,11	8 698,22	949,44		
	6h	1	11653,33	12854,00	ND	12 253,67	849,00	11 324,58	3 808,06
		2	19503,89	11923,39	8135,56	13 187,61	5788,65		
		3	7471,44	9931,94	9123,11	8 842,17	1254,08		
	8h	1	7297,17	6195,17	ND	6 746,17	779,23	9 121,50	1 943,37
		2	8365,22	9087,56	8812,22	8 755,00	364,55		
		3	10119,44	12292,11	10803,11	11 071,56	1110,93		
	16h	1	3924,67	ND	ND	3 924,67	#DIV/0!	5 714,38	1 117,96
		2	7409,22	6748,89	5745,56	6 634,56	837,71		
		3	5422,11	5510,44	5239,78	5 390,78	138,03		
	24h	1	5204,17	4709,17		4 956,67	350,02	7 162,33	3 630,85
		2	8414,56	12334,56	12956,22	11 235,11	2462,37		
Ctrl		3	4940,11	4427,44	4312,44	4 560,00	334,17		
	2h	1	11506,00	10827,00	ND	11 166,50	480,13	8 761,25	2 888,68
		2	11040,22	7981,89	11813,56	10 278,56	2026,21		
		3	4533,78	6661,44	5726,11	5 640,44	1066,42		
	4h	1	12453,67	12486,67	ND	12 470,17	23,33	9 596,88	2 748,98
		2	8769,22	10434,89	7758,22	8 987,44	1351,61		
		3	7051,11	12388,78	5432,44	8 290,78	3640,09		
	6h	1	10869,17	12045,33	ND	11 457,25	831,68	9 113,85	2 241,56
		2	10541,56	7279,89	7339,56	8 387,00	1866,14		
		3	10054,11	5375,11	9406,11	8 278,44	2535,15		
	8h	1	4432,17	5108,67	ND	4 770,42	478,36	6 414,10	1 682,42
		2	5749,89	8104,89	6344,56	6 733,11	1224,64		
		3	7233,44	9298,44	5040,78	7 190,89	2129,15		
	16h	1	ND	2890,67	ND	2 890,67	#DIV/0!	4 194,31	1 100,48
		2	3899,22	5110,89	4818,56	4 609,56	632,29		
		3	5896,44	3393,94	3350,44	4 213,61	1457,54		
	24h	1	2976,67	3345,67	ND	3 161,17	260,92	4 012,92	1 739,68
		2	3478,89	4284,89	6478,22	4 747,33	1552,22		
Dox		3	3219,44	1654,11	6665,44	3 846,33	2563,81		

Table 2: Activité IRES en réponse au traitement à la doxorubicine

FGF1 IRES
LucF/LucR

Ratio	Time	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	p-value
	0h	1	0,0217	0,0235	ND	0,02	0,00	0,11	0,06	
		2	0,1174	0,1003	0,1315	0,12	0,02			
		3	0,1546	0,2034	0,1524	0,17	0,03			
	2h	1	0,1732	0,1348	ND	0,15	0,03	0,19	0,07	
		2	0,1156	0,3181	0,2392	0,22	0,10			
		3	0,1427	0,2282	0,1298	0,17	0,05			
	4h	1	0,1365	0,1170	ND	0,13	0,01	0,13	0,01	
		2	0,1486	0,1184	0,1287	0,13	0,02			
		3	0,1222	0,1222	0,1229	0,12	0,00			
	6h	1	0,1071	0,1828	ND	0,14	0,05	0,13	0,04	
		2	0,1773	0,1262	0,0768	0,13	0,05			
		3	0,0977	0,1123	0,1356	0,12	0,02			
	8h	1	0,1404	0,1229	ND	0,13	0,01	0,11	0,03	
		2	0,0725	0,0774	0,0756	0,08	0,00			
		3	0,1335	0,1475	0,1311	0,14	0,01			
	16h	1	0,1515	ND	ND	0,15	ND	0,18	0,04	
		2	0,1650	0,2284	0,1547	0,18	0,04			
		3	0,1414	0,1955	0,2247	0,19	0,04			
	24h	1	0,1730	0,1504	ND	0,16	0,02	0,24	0,09	
		2	0,2674	0,4035	0,3120	0,33	0,07			
Ctrl		3	0,1847	0,1951	0,2135	0,20	0,01			
	2h	1	0,2288	0,2011	ND	0,21	0,02	0,22	0,03	0,19
		2	0,2425	0,1782	0,2751	0,23	0,05			
		3	0,1770	0,2178	0,2117	0,20	0,02			
	4h	1	0,2072	0,2471	ND	0,23	0,03	0,30	0,07	0,0002
		2	0,3518	0,3134	0,2717	0,31	0,04			
		3	0,2480	0,4442	0,2845	0,33	0,10			
	6h	1	0,2594	0,3827	ND	0,32	0,09	0,33	0,11	0,0006
		2	0,3948	0,2374	0,1657	0,27	0,12			
		3	0,4822	0,2737	0,4662	0,41	0,12			
	8h	1	0,1583	0,2307	ND	0,19	0,05	0,28	0,08	0,0002
		2	0,2280	0,3083	0,3121	0,28	0,05			
		3	0,3247	0,4233	0,2883	0,35	0,07			
	16h	1	ND	0,1429	ND	0,14	ND	0,55	0,27	0,0176
		2	0,5943	0,9001	0,7899	0,76	0,15			
		3	0,7010	0,3561	0,3768	0,48	0,19			
	24h	1	0,2894	0,1506	ND	0,22	0,10	0,54	0,35	0,0499
		2	0,6206	0,7916	0,7660	0,73	0,09			
Dox		3	0,2299	0,3481	1,1496	0,58	0,50			

Table 2: Activité IRES en réponse au traitement à la doxorubicine

VEGFC IRES
LucR

Renilla	Time	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD
	0h	1	87616	92578	ND	90 096,67	#NOM?	125 285,15	35633,7798
		2	95251	118954	114758	109 654,28	12649,01		
		3	146805	160923	185398	164 375,00	19526,60		
	2h	1	68419	84227	ND	76 322,83	11177,94	121 334,42	31768,2017
		2	138062	104053	133122	125 079,33	18376,00		
		3	139884	153865	149043	147 597,22	7101,62		
	4h	1	91100	113655	ND	102 377,33	15949,26	136 855,13	28478,0946
		2	121411	159326	173825	151 521,00	27064,59		
		3	136197	132251	167076	145 174,44	19069,84		
	6h	1	96251	97598	ND	96 924,25	952,12	185 403,15	56730,4963
		2	227537	217899	237876	227 770,89	9990,21		
		3	191089	219279	195696	202 021,33	15121,67		
	8h	1	94128	87743	ND	90 935,25	4514,52	198 701,67	74644,1542
		2	283018	258370	263520	268 302,72	13001,24		
		3	188629	189200	225006	200 944,89	20839,68		
	16h	1	43560	53188	ND	48 374,00	6808,02	86 607,19	33833,3502
		2	122084	115564	132811	123 486,44	8708,27		
		3	76740	88918	59992	75 216,72	14522,95		
	24h	1	39767	42739	ND	41 252,50	2101,52	67 871,08	28521,745
		2	96619	91985	111859	100 154,67	10398,11		
Ctrl		3	63589	39894	56518	53 333,22	12164,22		
	2h	1	80844	64933	ND	72 888,58	11250,89	103 589,27	21944,4736
		2	112531	96998	123810	111 113,11	13461,80		
		3	116178	103978	129443	116 532,56	12736,21		
	4h	1	86756	72292	ND	79 523,83	10227,59	81 011,63	9608,38641
		2	86867	76793	74621	79 426,89	6534,30		
		3	68990	83653	98123	83 588,22	14566,61		
	6h	1	61121	43081	ND	52 100,83	12755,73	71 227,25	14923,2956
		2	67443	69861	72504	69 936,06	2531,24		
		3	79364	87015	89429	85 269,39	5254,71		
	8h	1	38745	27431	ND	33 087,50	8000,21	63 870,69	22096,3771
		2	74830	58474	82179	71 827,83	12134,09		
		3	67589	94699	67020	76 435,67	15818,97		
	16h	1	14578	15621	ND	15 099,50	737,51	19 811,00	5356,33853
		2	16371	16197	21148	17 905,28	2809,73		
		3	27698	18927	27949	24 857,72	5138,07		
	24h	1	17021	12307	ND	14 663,50	3333,30	22 914,27	9027,21132
		2	19969	42445	25528	29 314,17	11706,75		
Dox		3	22224	25354	18468	22 014,89	3447,74		

Table 2: Activité IRES en réponse au traitement à la doxorubicine

VEGFC IRES
LucF

Firefly	Time	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD
	0h	1	1276	533	ND	904,50	525,38	6 666,15	3 735,04
		2	9 139	9 746	6652	8 512,17	1638,96		
		3	8 025	10 171	7787	8 661,22	1312,99		
	2h	1	4226	8335	ND	6 280,17	2905,50	8 897,46	2 756,63
		2	10123	6774	10447	9 114,67	2033,92		
		3	12871	11027	7377	10 425,11	2795,93		
	4h	1	6213	6801	ND	6 506,92	415,43	7 879,77	1 174,11
		2	7067	8671	8410	8 049,33	860,75		
		3	8018	7949	9908	8 625,44	1111,65		
	6h	1	5475	5580	ND	5 527,42	73,89	9 100,10	3 363,22
		2	9118	6234	8708	8 020,00	1560,36		
		3	10516	14818	12351	12 562,00	2158,88		
	8h	1	3755	3897	ND	3 825,67	100,41	7 702,46	2 563,40
		2	8572	8343	7976	8 296,83	301,03		
		3	8803	9238	11037	9 692,61	1184,24		
	16h	1	3235	3282	ND	3 258,42	32,88	5 384,73	1 673,47
		2	6121	7421	7662	7 068,06	829,04		
		3	4706	5655	4995	5 118,94	486,16		
	24h	1	3543	2688	ND	3 115,17	604,58	6 019,69	2 941,73
		2	7979	10335	9209	9 174,28	1178,23		
Ctrl		3	6640	3112	4652	4 801,44	1768,50		
	2h	1	5838	6109	ND	5 973,75	191,51	7 542,56	1 446,60
		2	6 759	9 223	7196	7 725,67	1314,60		
		3	8670	6895	9650	8 405,33	1396,34		
	4h	1	6214	6472	ND	6 342,83	182,67	7 136,33	1 798,04
		2	7496	10567	5276	7 779,33	2656,72		
		3	5258	7106	8702	7 022,33	1723,71		
	6h	1	6211	3535	ND	4 873,00	1892,69	6 373,88	1 488,99
		2	5763	6572	8772	7 035,72	1556,72		
		3	7295	5964	6879	6 712,61	680,80		
	8h	1	3528	2795	ND	3 161,42	517,96	4 940,67	1 175,69
		2	5274	5391	4960	5 208,22	222,88		
		3	6058	5467	6052	5 859,28	339,35		
	16h	1	1777	1318	ND	1 547,42	324,21	2 920,58	892,59
		2	3194	3227	3582	3 334,11	214,93		
		3	3889	3108	3270	3 422,50	412,03		
	24h	1	1589	1525	ND	1 556,67	45,25	2 736,94	939,44
		2	3173	4101	3086	3 453,22	562,31		
Dox		3	2105	2677	3640	2 807,50	775,64		

Table 2: Activité IRES en réponse au traitement à la doxorubicine

VEGFC IRES
LucF/LucR

Ratio	Time	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	p-value
	0h	1	0,01	0,01	ND	0,01	0,01	0,05	0,03	
		2	0,10	0,08	0,06	0,08	0,02			
		3	0,05	0,06	0,04	0,05	0,01			
	2h	1	0,06	0,10	ND	0,08	0,03	0,07	0,02	
		2	0,07	0,07	0,08	0,07	0,01			
		3	0,09	0,07	0,05	0,07	0,02			
	4h	1	0,07	0,06	ND	0,06	0,01	0,06	0,01	
		2	0,06	0,05	0,05	0,05	0,00			
		3	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00			
	6h	1	0,06	0,06	ND	0,06	0,00	0,05	0,01	
		2	0,04	0,03	0,04	0,04	0,01			
		3	0,06	0,07	0,06	0,06	0,01			
	8h	1	0,04	0,04	ND	0,04	0,00	0,04	0,01	
		2	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00			
		3	0,05	0,05	0,05	0,05	0,00			
	16h	1	0,07	0,06	ND	0,07	0,01	0,06	0,01	
		2	0,05	0,06	0,06	0,06	0,01			
		3	0,06	0,06	0,08	0,07	0,01			
	24h	1	0,09	0,06	ND	0,08	0,02	0,09	0,02	
		2	0,08	0,11	0,08	0,09	0,02			
Ctrl		3	0,10	0,08	0,08	0,09	0,01			
	2h	1	0,07	0,09	ND	0,08	0,02	0,07	0,01	0,96
		2	0,06	0,10	0,06	0,07	0,02			
		3	0,07	0,07	0,07	0,07	0,00			
	4h	1	0,07	0,09	ND	0,08	0,01	0,09	0,02	0,0002
		2	0,09	0,14	0,07	0,10	0,04			
		3	0,08	0,08	0,09	0,08	0,01			
	6h	1	0,10	0,08	ND	0,09	0,01	0,09	0,02	0,0002
		2	0,09	0,09	0,12	0,10	0,02			
		3	0,09	0,07	0,08	0,08	0,01			
	8h	1	0,09	0,10	ND	0,10	0,01	0,08	0,02	0,0002
		2	0,07	0,09	0,06	0,07	0,02			
		3	0,09	0,06	0,09	0,08	0,02			
	16h	1	0,12	0,08	ND	0,10	0,03	0,15	0,04	0,0002
		2	0,20	0,20	0,17	0,19	0,02			
		3	0,14	0,16	0,12	0,14	0,02			
	24h	1	0,09	0,12	ND	0,11	0,02	0,12	0,04	0,007
		2	0,16	0,10	0,12	0,13	0,03			
Dox		3	0,09	0,11	0,20	0,13	0,06			

Table 2: Activité IRES en réponse au traitement à la doxorubicine

Hairpin
LucR

Renilla	Experiment	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	Mean	SD
	1	204540,000	165560,667					185050,333	27562,551		
	2	5638491,333	6292092,667	5499981,333				5810188,444	423048,478		
Ctrl	3	164045,667	354380,667	153656,333				224027,556	113008,560	2309093,583	2908678,093
	1	30591,667	28637,667					29614,667	1381,687		
	2	1083145,333	1256628,000	1331130,333	1481554,000	1416856,667	1216950,333	1297710,778	143777,129		
Dox	3	105349,333	115785,667	93653,333				104929,444	11072,140	741843,848	647229,121

Hairpin
LucF

Firefly	Experiment	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	Mean	SD
	1	8743,667	5636,333					7190,000	2197,216		
	2	68300,333	71169,333	56978,333				65482,667	7503,370		
Ctrl	3	2801,000	15753,333	5705,000				8086,444	6796,631	29385,917	30390,467
	1	5190,333	9693,333					7441,833	3184,102		
	2	28002,667	32767,000	41151,000	44384,667	31473,333	29902,667	34613,556	6593,631		
Dox	3	4726,000	4720,333	5632,667				5026,333	525,108	21604,000	15713,536

Hairpin
LucF/LucR

Ratio	Experiment	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	Mean	SD	p-value
	1	0,043	0,034					0,038	0,006			
	2	0,012	0,011	0,010				0,011	0,001			
Ctrl	3	0,017	0,044	0,037				0,033	0,014	0,026	0,015	
	1	0,170	0,338					0,254	0,119			
	2	0,026	0,026	0,031	0,030	0,022	0,025	0,027	0,003			
Dox	3	0,045	0,041	0,060				0,049	0,010	0,074	0,097	0,1518

Table 2: Activité IRES en réponse au traitement à la doxorubicine.

FGF1 IRES LucR

	Renilla	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	Statistique
Ctrl	shCtrl	1	97695,50	38441,50	49063,83	61733,61	31593,54	46632,75	26182,67	
		2	35269,33	34256,00	25070,33	31531,89	5618,76			
	shRPL13A	1	144239,17	137349,83	75074,17	118887,72	38099,69	78392,14	50681,29	0,31
		2	45337,67	31227,67	37124,33	37896,56	7086,63			
Tm	shCtrl	1	39852,17	33224,83	31495,58	34857,53	4411,05	29754,99	8172,42	
		2	33477,00	16923,33	23557,00	24652,44	8331,02			
	shRPL13A	1	45970,83	109706,50	59131,50	71602,94	33648,35	50293,31	32375,96	0,24
		2	29775,67	17384,00	39791,33	28983,67	11224,64			

FGF1 IRES LucF

	Firefly	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	Statistique
Ctrl	shCtrl	1	16600,67	5430,00	7595,67	9875,44	5924,02	7947,69	5114,28	
		2	10961,83	2637,83	4460,17	6019,94	4375,72			
	shRPL13A	1	16048,33	9150,00	7174,67	10791,00	4658,88	7461,42	4746,66	0,82
		2	5373,83	3056,50	3965,17	4131,83	1167,62			
Tm	shCtrl	1	22876,33	9174,33	11780,33	14610,33	7276,19	11609,47	5831,06	
		2	6305,50	8727,50	10792,83	8608,61	2246,03			
	shRPL13A	1	6941,08	10647,00	10935,00	9507,69	2227,41	8919,99	4511,63	0,48
		2	4648,83	4282,17	16065,83	8332,28	6699,96			

FGF1 IRES LucF/LucR

	Ratio	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	Statistique
Ctrl	shCtrl	1	0,17	0,14	0,15	0,16	0,01	0,17	0,08	
		2	0,31	0,08	0,18	0,19	0,12			
	shRPL13A	1	0,11	0,07	0,10	0,09	0,02	0,10	0,02	0,04
		2	0,12	0,10	0,11	0,11	0,01			
Tm	shCtrl	1	0,57	0,28	0,37	0,41	0,15	0,40	0,15	
		2	0,19	0,52	0,46	0,39	0,17			
	shRPL13A	1	0,15	0,10	0,18	0,14	0,04	0,21	0,11	0,03
		2	0,16	0,25	0,40	0,27	0,13			

Table 3: Activité IRES en réponse au shARN RPL13A.

VEGFC IRES LucR

	Renilla	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	Statistique
		1	182455,333	119691,500	158743,833	153630,222	31692,845			
		2	139498,333	102909,667	159200,833	133869,611	28564,589	129 857,22	34361,4857	
	shCtrl	3	113718,000	68485,000	124012,500	102071,833	29538,969			
		1	184007,833	149450,167	97587,500	143681,833	43497,974			
		2	269299,667	140729,667	118842,333	176290,556	81288,283	172 473,71	65419,6342	0,2359
Ctrl	shRPL13A	3	1311906,333	271665,000	148207,500	577259,611	639210,289			
		1	36888,500	44673,167	108231,333	63264,333	39136,601			
		2	67751,667	47596,667	50359,333	55235,889	10926,646	57 674,76	20766,3465	
	shCtrl	3	52453,000	55629,667	55489,500	54524,056	1794,955			
		1	78130,500	59177,333	73312,167	70206,667	9850,824			
		2	52725,667	61554,333	54072,000	56117,333	4756,457	75 964,04	27588,3991	0,0315
Tm	shRPL13A	3	82540,667	78998,000	143165,667	101568,111	36068,062			

VEGFC IRES LucF

	Firefly	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	Statistique
		1	4907,667	2283,333	4023,000	3738,000	1335,178			
		2	8073,167	5358,000	6230,167	6553,778	1386,209	5 903,70	2274,89754	
	shCtrl	3	9890,667	5043,167	7324,167	7419,333	2425,151			
		1	5080,667	4262,000	4161,333	4501,333	504,236			
		2	5082,333	4872,000	3294,000	4416,111	977,451	6 364,10	4324,12511	0,673
Ctrl	shRPL13A	3	69618,167	16625,833	7534,667	31259,556	33529,086			
		1	3006,333	3558,333	4089,667	3551,444	541,700			
		2	3821,333	5048,333	4972,667	4614,111	687,607	4 500,04	909,265443	
	shCtrl	3	5005,167	5285,833	5712,667	5334,556	356,258			
		1	4748,833	3040,333	9066,000	5618,389	3105,521			
		2	4303,333	4748,667	4663,333	4571,778	236,363	7 084,70	3829,62766	0,2973
Tm	shRPL13A	3	9366,167	8695,167	15130,500	11063,944	3537,685			

VEGFC IRES LucF/LucR

	Ratio	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	Statistique
		1	0,027	0,019	0,025	0,024	0,004			
		2	0,058	0,052	0,039	0,050	0,010	0,05	0,02312828	
	shCtrl	3	0,087	0,074	0,059	0,073	0,014			
		1	0,028	0,029	0,043	0,033	0,008			
		2	0,019	0,035	0,028	0,027	0,008	0,04	0,01428028	0,48
Ctrl	shRPL13A	3	0,053	0,061	0,051	0,055	0,005			
		1	0,081	0,080	0,038	0,066	0,025			
		2	0,056	0,106	0,099	0,087	0,027	0,08	0,02301372	
	shCtrl	3	0,095	0,095	0,103	0,098	0,004			
		1	0,061	0,051	0,124	0,079	0,039			
		2	0,082	0,077	0,086	0,082	0,005	0,09	0,02481957	0,54
Tm	shRPL13A	3	0,113	0,110	0,106	0,110	0,004			

Table 3: Activité IRES en réponse au shARN RPL13A.

Hairpin LucR

	Renilla	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	Statistique
		1	116954,83	50136,83	125333,17	97474,94	41209,49			
		2	163357,67		217175,00	190266,33	38054,60	115801,81	56409,88	
	shCtrl	3	82274,33	51073,67	120109,00	84485,67	34570,75			
		1	99960,33	70694,33	69941,17	80198,61	17118,30			
		2	83435,00	149743,00	221695,33	151624,44	69149,37	112627,35	51227,03	1,00
Ctrl	shRPL13A	3	134452,00	115200,33	90349,33	113333,89	22110,50			
		1	60096,17	40531,33	46927,33	49184,94	9975,89			
		2	87520,67	98433,00	91584,67	92512,78	5515,05	59550,02	26935,87	
	shCtrl	3	49561,00	20847,67	40448,33	36952,33	14672,44			
		1	31581,83	20999,83	130073,50	60885,06	60152,10			
		2	134610,33	104512,00	109074,33	116065,56	16221,45	75076,31	45643,32	0,55
Tm	shRPL13A	3	25832,00	72711,33	46291,67	48278,33	23502,73			

Hairpin LucF

	Firefly	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	Statistique
		1	2619,33	768,33	2481,00	1956,22	1031,06			
		2	6430,33		5966,00	190266,33	38054,60	3598,48	1879,73	
	shCtrl	3	3076,50	4265,50	3180,83	3507,61	658,42			
		1	2738,33	1782,83	2403,67	2308,28	484,84			
		2	2634,33	4533,67	6239,00	151624,44	69149,37	4050,90	2375,39	0,74
Ctrl	shRPL13A	3	4452,83	3299,50	8775,83	5509,39	2887,00			
		1	1818,67	1521,33	11566,33	4968,78	5715,58			
		2	5563,00	5399,00	6014,33	92512,78	5515,05	4567,61	3121,34	
	shCtrl	3	3688,17	2025,83	3511,83	3075,28	913,11			
		1	1216,33	2099,67	5712,00	3009,33	2381,88			
		2	8049,00	6784,33	6465,17	116065,56	16221,45	4708,93	2305,05	0,60
Tm	shRPL13A	3	2763,17	4370,17	4920,50	4017,94	1120,97			

Hairpin LucF/LucR

	Ratio	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Mean	SD	Statistique
		1	0,022	0,015	0,020	0,019	0,004			
		2	0,039		0,027	6198,167	328,333	0,034	0,022	
	shCtrl	3	0,037	0,084	0,026	0,049	0,030			
		1	0,027	0,025	0,034	0,029	0,005			
		2	0,032	0,030	0,028	4469,000	1803,203	0,037	0,023	0,423
Ctrl	shRPL13A	3	0,033	0,029	0,097	0,053	0,038			
		1	0,030	0,038	0,246	0,105	0,123			
		2	0,064	0,055	0,066	5658,778	318,652	0,084	0,065	
	shCtrl	3	0,074	0,097	0,087	0,086	0,011			
		1	0,039	0,100	0,044	0,061	0,034			
		2	0,060	0,065	0,059	7099,500	837,633	0,071	0,026	0,990
Tm	shRPL13A	3	0,107	0,060	0,106	0,091	0,027			

Table 3: Activité IRES en réponse au shARN RPL13A.

FGF1 IRES
LucR

	Renilla	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Statistique
Ctrl	Ctrl	1	112650,83	104346,83	140588,00	119195,22	18986,24	0,0005
	RPL13A	2	513291,50	443092,00	479487,17	478623,56	35107,72	
Tm	Ctrl	1	63865,83	53651,00	76063,17	64526,67	11220,69	0,2311
	RPL13A	2	173530,50	309794,50	1553833,50	679052,83	760639,78	

FGF1 IRES
LucF

	Firefly	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Statistique
Ctrl	Ctrl	1	11200,33	12423,67	5958,33	9860,78	3434,52	0,0436
	RPL13A	2	19235,33	17744,33	18460,00	18479,89	745,70	
Tm	Ctrl	1	9206,67	8616,83	14615,00	10812,83	3305,95	0,1688
	RPL13A	2	34269,83	53529,33	167533,00	85110,72	72026,43	

FGF1 IRES
LucF/LucR

	Ratio	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Statistique
Ctrl	Ctrl	1	0,10	0,12	0,04	0,09	0,04	0,1705
	RPL13A	2	0,04	0,04	0,04	0,04	0,00	
Tm	Ctrl	1	0,14	0,16	0,19	0,17	0,02	0,8488
	RPL13A	2	0,20	0,17	0,11	0,16	0,05	

Table 4: Activité IRES en réponse à la surexpression RPL13A

VEGFC IRES
LucR

	Renilla	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Statistique
Ctrl	Ctrl	1	148406,50	224088,83	185842,50	186112,61	37841,89	0,0227
	RPL13A	2	532837,00	572774,17	381468,50	495693,22	100916,85	
Tm	Ctrl	1	74226,00	120959,83	72627,83	89271,22	27454,77	0,002
	RPL13A	2	258862,50	260522,83	216035,00	245140,11	25219,43	

VEGFC IRES
LucF

	Firefly	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Statistique
Ctrl	Ctrl	1	3222,333333	3469,333333	5105	3 932,22	1023,136373	0,9575
	RPL13A	2	3219,333333	4032,666667	4425,833333	3 892,61	615,3228677	
Tm	Ctrl	1	2892,833333	3491	2329	2 904,28	581,0845304	0,001
	RPL13A	2	6403,666667	7336	6608,833333	6 782,83	489,9166879	

VEGFC IRES
LucF/LucR

	Ratio	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Statistique
Ctrl	Ctrl	1	0,022	0,015	0,027	0,022	0,006	0,0426
	RPL13A	2	0,006	0,007	0,012	0,008	0,003	
Tm	Ctrl	1	0,039	0,029	0,032	0,033	0,005	0,2043
	RPL13A	2	0,025	0,028	0,031	0,028	0,003	

Table 4: Activité IRES en réponse à la surexpression RPL13A

Hairpin
LucR

	Renilla	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Statistique
Ctrl	Ctrl	1	127299,50	87573,83	70983,50	95285,61	28939,19	0,0689
	RPL13A	2	167767,50	155424,17	254312,17	192501,28	53884,40	
Tm	Ctrl	1	64738,17	47561,17	70899,00	61066,11	12094,49	0,0558
	RPL13A	2	122589,50	90179,50	148320,83	120363,28	29134,53	

Hairpin
LucF

	Firefly	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Statistique
Ctrl	Ctrl	1	3896,83	2789,33	4446,33	3710,83	844,01	0,0801
	RPL13A	2	1886,00	2278,67	2629,00	2264,56	371,70	
Tm	Ctrl	1	2393,67	2003,33	2633,83	2343,61	318,22	0,0468
	RPL13A	2	4187,33	3932,00	5766,67	4628,67	993,77	

Hairpin
LucF/LucR

	Ratio	Experiment	A	B	C	Mean	SD	Statistique
Ctrl	Ctrl	1	0,031	0,032	0,063	0,042	0,018	0,1034
	RPL13A	2	0,011	0,015	0,010	0,012	0,002	
Tm	Ctrl	1	0,037	0,042	0,037	0,039	0,003	0,9696
	RPL13A	2	0,034	0,044	0,039	0,039	0,005	

Table 4: Activité IRES en réponse à la surexpression RPL13A

FGF1 IRES LucR

Renilla	Time	A	B	C	Mean	SD	p value
Ctrl	siCtrl	615912	691292	694883	667362	44593	0,336
	siDhx9	695874	575532	564502	611969	72873	
Dox	siCtrl	244 390,93	246 662,27	230597	240550	8694	0,023
	siDhx9	203058,267	187231,933	215633	201974	14231	

FGF1 IRES LucF

Firefly	Time	A	B	C	Mean	SD	p value
Ctrl	siCtrl	50626,7333	44870,4	63237,4	52912	9394	0,619
	siDhx9	34290,0667	55475,7333	54694,0667	48153	12012	
Dox	siCtrl	24966,7333	28338,7333	17843	23716	5358	0,153
	siDhx9	33326,7333	25891,7333	33012	30743	4205	

FGF1 IRES LucF/LucR

Ratio	Time	A	B	C	Mean	SD	p value
Ctrl	siCtrl	0,08	0,06	0,09	0,08	0,01	0,938
	siDhx9	0,05	0,10	0,10	0,08	0,03	
Dox	siCtrl	0,10	0,11	0,08	0,10	0,02	0,019
	siDhx9	0,16	0,14	0,15	0,15	0,01	

Table 5: Activité IRES en réponse au siDHX9

FGF1 IRES
LucR

	Renilla	Experiment	A	B	C	D	Mean	SD	Mean	SD	Statistique
		1	578029,78	814860,78	609539,11	352575,11	588751,19	189254,48	1032553,01	1166837,45	
		2	2187536,33	3940419,67	1777842,33		2635266,11	1148708,69			
		3	366773,00	449416,00			408094,50	58437,43			
	si-	4	142380,33	138710,67			140545,50	2594,85			
		1	599552,78	824219,11	684339,44	831829,11	734985,11	112913,49	1119085,04	1052094,93	
		2	2613016,67	3062796,00	2436611,67		2704141,44	322884,65			
		3	418091,33	521189,33			469640,33	72901,29			
Ctrl	siDDX17	4	119797,33	198492,67			159145,00	55646,00			0,56
		1	221809,44	213761,78	289169,11	261105,28	246461,40	35191,74	387347,43	333013,67	
		2	1034488,00	807905,33	776904,33		873099,22	140623,68			
		3	244899,67	352987,50			298943,58	76429,64			
	si-	4	26840,00	30951,33			28895,67	2907,15			
		1	289161,78	289349,78	271376,44	256525,11	276603,28	15818,15	417970,01	358474,36	
		2	839103,33	1106754,00	880695,67		942184,33	144030,77			
		3	278468,00	341729,00			310098,50	44732,28			
Dox	siDDX17	4	23124,33	21382,67			22253,50	1231,54			0,65

FGF1 IRES
LucF

	Firefly	Experiment	A	B	C	D	Mean	SD	Mean	SD	Statistique
		1	35202,11	35961,44	39418,44	30010,78	35148,19	3885,54	77039,49	70541,77	
		2	144211,33	253286,67	123520,00		173672,67	69719,61			
		3	51677,33	63553,33			57615,33	8397,60			
	si-	4	17255,33	53337,67			35296,50	25514,06			
		1	47393,78	39290,11	61267,44	31324,44	44818,94	12778,27	81746,46	66116,89	
		2	172661,33	208987,67	151337,33		177662,11	29148,69			
		3	88304,00	61365,00			74834,50	19048,75			
Ctrl	siDDX17	4	13739,67	23540,33			18640,00	6930,12			0,85
		1	23659,11	45349,44	25634,78	44740,61	34845,99	11807,04	53467,19	37475,74	
		2	132469,67	90434,33	86924,00		103276,00	25343,31			
		3	54351,33	60654,83			57503,08	4457,25			
	si-	4	14580,00	9341,00			11960,50	3704,53			
		1	59311,11	32785,44	41441,11	25767,78	39826,36	14485,41	57708,92	36970,41	
		2	106842,33	105994,00	112616,00		108484,11	3603,37			
		3	62374,67	61291,00			61832,83	766,27			
Dox	siDDX17	4	12860,00	13514,67			13187,33	462,92			0,70

FGF1 IRES
LucF/LucR

	Ratio	Experiment	A	B	C	D	Mean	SD	Mean	SD	Statistique
		1	0,06	0,04	0,06	0,09	0,06	0,02	0,11	0,10	
		2	0,07	0,06	0,07		0,07	0,00			
		3	0,14	0,14			0,14	0,00			
	si-	4	0,12	0,38			0,25	0,19			
		1	0,08	0,05	0,09	0,04	0,06	0,02	0,09	0,05	
		2	0,07	0,07	0,06		0,07	0,00			
		3	0,21	0,12			0,16	0,07			
Ctrl	siDDX17	4	0,11	0,12			0,12	0,00			0,85
		1	0,11	0,21	0,09	0,17	0,14	0,06	0,20	0,13	
		2	0,13	0,11	0,11		0,12	0,01			
		3	0,22	0,17			0,20	0,04			
	si-	4	0,54	0,30			0,42	0,17			
		1	0,21	0,11	0,15	0,10	0,14	0,05	0,23	0,19	
		2	0,13	0,10	0,13		0,12	0,02			
		3	0,22	0,18			0,20	0,03			
Dox	siDDX17	4	0,56	0,63			0,59	0,05			0,85

Table 6: Activité IRES en réponse au siDDX17

SSU

	Libre			80s			polysomes			Libre		80S		polysomes				
site	NT Libre_R1	NT Libre_R2	NT Libre_R3	NT 80s_R1	NT 80s_R2	NT 80s_R3	NT Polysomes_ R1	NT Polysome s_R2	NT Polysomes_R3	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	p-value Libre vs 80S	p-value Libre vs polysome	p-value 80S vs polysome
18S_Am27	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,003	0,98	0,003	0,98	0,003	0,384	0,068	0,353
18S_Am99	0,94	0,92	0,94	0,95	0,94	0,95	0,94	0,94	0,94	0,94	0,012	0,95	0,004	0,94	0,004	0,069	0,323	0,025
18S_Um116	0,87	0,86	0,87	0,88	0,87	0,88	0,87	0,88	0,88	0,87	0,007	0,88	0,005	0,88	0,009	0,047	0,238	0,463
18S_Um121	0,97	0,96	0,97	0,96	0,97	0,97	0,95	0,96	0,96	0,96	0,003	0,96	0,003	0,96	0,008	0,416	0,069	0,053
18S_Am159	0,94	0,92	0,93	0,95	0,93	0,96	0,93	0,94	0,93	0,93	0,007	0,95	0,014	0,93	0,008	0,059	0,380	0,174
18S_Am166	0,98	0,99	0,98	0,99	0,98	0,99	0,98	0,98	0,99	0,98	0,001	0,99	0,004	0,98	0,003	0,400	0,158	0,156
18S_Um172	0,88	0,85	0,87	0,89	0,89	0,92	0,88	0,90	0,87	0,86	0,014	0,90	0,018	0,88	0,012	0,028	0,175	0,198
18S_Cm174	0,53	0,52	0,49	0,73	0,58	0,77	0,00	0,67	0,62	0,51	0,018	0,69	0,097	0,43	0,375	0,050	0,377	0,200
18S_Um354	0,88	0,85	0,86	0,83	0,89	0,86	0,86	0,87	0,88	0,86	0,013	0,86	0,031	0,87	0,007	0,482	0,278	0,313
18S_Um428	0,79	0,71	0,79	0,85	0,81	0,85	0,77	0,82	0,77	0,76	0,047	0,83	0,021	0,79	0,028	0,018	0,296	0,115
18S_Gm436	0,91	0,91	0,92	0,89	0,89	0,91	0,91	0,88	0,89	0,91	0,004	0,90	0,013	0,90	0,016	0,079	0,115	0,380
18S_Cm462	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,96	0,95	0,93	0,94	0,95	0,001	0,95	0,004	0,94	0,009	0,271	0,104	0,064
18S_Am468	0,96	0,96	0,96	0,96	0,97	0,96	0,95	0,97	0,96	0,96	0,001	0,96	0,005	0,96	0,008	0,424	0,242	0,266
18S_Am484	0,96	0,95	0,95	0,97	0,96	0,97	0,95	0,96	0,96	0,96	0,005	0,97	0,006	0,96	0,005	0,013	0,385	0,133
18S_Gm509	0,85	0,85	0,86	0,88	0,87	0,87	0,86	0,85	0,86	0,85	0,009	0,87	0,003	0,86	0,002	0,057	0,317	0,014
18S_Am512	0,89	0,85	0,90	0,91	0,88	0,93	0,88	0,90	0,90	0,88	0,024	0,90	0,026	0,89	0,014	0,010	0,319	0,299
18S_Cm517	0,97	0,98	0,97	0,97	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,004	0,97	0,003	0,97	0,001	0,202	0,434	0,413
18S_Am576	0,94	0,94	0,95	0,96	0,95	0,96	0,95	0,96	0,95	0,94	0,009	0,96	0,008	0,95	0,009	0,048	0,218	0,306
18S_Am590	0,94	0,89	0,93	0,95	0,94	0,96	0,94	0,94	0,93	0,92	0,029	0,95	0,009	0,94	0,005	0,068	0,186	0,145
18S_Gm601	0,93	0,90	0,94	0,95	0,95	0,96	0,92	0,95	0,93	0,92	0,022	0,96	0,005	0,94	0,015	0,042	0,288	0,083
18S_Cm621	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000			
18S_Um627	0,95	0,95	0,95	0,95	0,97	0,95	0,96	0,95	0,96	0,95	0,003	0,96	0,008	0,96	0,004	0,241	0,127	0,367
18S_Gm644	0,92	0,92	0,93	0,94	0,93	0,94	0,93	0,93	0,92	0,92	0,005	0,94	0,004	0,93	0,007	0,002	0,205	0,112
18S_Am668	0,95	0,95	0,95	0,96	0,96	0,96	0,95	0,96	0,95	0,95	0,001	0,96	0,002	0,95	0,007	0,037	0,360	0,208
18S_Gm683	0,92	0,90	0,90	0,90	0,91	0,90	0,91	0,88	0,91	0,91	0,010	0,90	0,006	0,90	0,016	0,321	0,256	0,465
18S_Cm797	0,86	0,84	0,87	0,90	0,88	0,90	0,86	0,90	0,87	0,86	0,017	0,90	0,011	0,87	0,019	0,009	0,225	0,162
18S_Um799	0,88	0,87	0,89	0,91	0,91	0,88	0,91	0,90	0,88	0,88	0,011	0,90	0,016	0,90	0,013	0,141	0,135	0,243
18S_Gm867	0,75	0,62	0,70	0,70	0,73	0,76	0,68	0,71	0,68	0,69	0,068	0,73	0,031	0,69	0,015	0,242	0,480	0,080
18S_Am1031	0,97	0,96	0,97	0,97	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,004	0,97	0,001	0,97	0,002	0,084	0,099	0,166
18S_Cm1272	0,21	0,00	0,20	0,47	0,31	0,35	0,23	0,40	0,20	0,14	0,121	0,38	0,080	0,27	0,109	0,020	0,209	0,197
18S_Um1288	0,91	0,90	0,91	0,91	0,88	0,92	0,90	0,93	0,91	0,91	0,007	0,90	0,020	0,91	0,013	0,474	0,284	0,350
18S_Um1326	0,97	0,96	0,96	0,97	0,96	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,006	0,97	0,006	0,97	0,003	0,352	0,294	0,314
18S_Gm1328	0,95	0,94	0,94	0,96	0,94	0,95	0,94	0,93	0,95	0,95	0,006	0,95	0,011	0,94	0,011	0,142	0,157	0,032
18S_Am1383	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,001	0,98	0,001	0,98	0,002	0,128	0,217	0,456
18S_Cm1391	0,91	0,91	0,90	0,92	0,92	0,93	0,90	0,91	0,91	0,91	0,005	0,92	0,006	0,91	0,005	0,068	0,462	0,031
18S_Um1442	0,75	0,64	0,71	0,78	0,76	0,80	0,77	0,78	0,73	0,70	0,053	0,78	0,023	0,76	0,031	0,037	0,138	0,275
18S_Gm1447	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,01	0,017	0,00	0,000	0,211		0,211
18S_Gm1490	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,001	0,98	0,002	0,98	0,005	0,242	0,270	0,224
18S_Um1668	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000			
18S_Am1678	0,96	0,92	0,95	0,96	0,95	0,97	0,94	0,95	0,95	0,94	0,021	0,96	0,014	0,94	0,003	0,063	0,490	0,087
18S_Cm1703	0,98	0,97	0,97	0,98	0,97	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,003	0,98	0,003	0,98	0,007	0,029	0,280	0,394
18S_Um1804	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,002	0,96	0,003	0,96	0,002	0,390	0,230	0,338

Table 7: MethScore SSU HDLEC

LSU

	Libre			80s			polysomes			Libre		80S		polysomes				
site	NT Libre_R1	NT Libre_R2	NT Libre_R3	NT 80s_R1	NT 80s_R2	NT 80s_R3	NT Polysomes_ R1	NT Polysome s_R2	NT Polysomes_R3	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	p-value Libre vs 80S	p-value Libre vs polysome	p-value 80S vs polysome
28S_Am389	0,96	0,96	0,96	0,97	0,96	0,97	0,95	0,97	0,96	0,96	0,001	0,96	0,008	0,96	0,009	0,201	0,239	0,437
28S_Am391	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,99	0,98	0,99	0,98	0,98	0,004	0,98	0,004	0,98	0,004	0,269	0,006	0,355
28S_Gm1303	0,48	0,42	0,49	0,51	0,48	0,56	0,46	0,54	0,43	0,46	0,038	0,52	0,043	0,48	0,055	0,020	0,410	0,267
28S_Am1310	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
28S_Am1313	0,95	0,96	0,94	0,93	0,95	0,95	0,93	0,95	0,94	0,95	0,006	0,95	0,011	0,94	0,010	0,458	0,184	0,089
28S_Cm1327	0,87	0,83	0,83	0,85	0,85	0,86	0,88	0,87	0,83	0,84	0,022	0,85	0,007	0,86	0,029	0,317	0,185	0,402
28S_Gm1509	0,86	0,86	0,87	0,88	0,87	0,88	0,88	0,87	0,86	0,86	0,006	0,88	0,004	0,87	0,007	0,006	0,212	0,125
28S_Am1511	0,97	0,97	0,98	0,97	0,97	0,98	0,97	0,98	0,97	0,97	0,002	0,97	0,004	0,97	0,001	0,368	0,397	0,287
28S_Am1521	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,001	0,99	0,002	0,99	0,001	0,398	0,091	0,035
28S_Gm1612	0,99	0,99	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,002	0,98	0,002	0,98	0,000	0,172	0,147	0,308
28S_Gm1747	0,91	0,84	0,88	0,92	0,91	0,91	0,90	0,90	0,88	0,88	0,037	0,91	0,005	0,89	0,012	0,095	0,303	0,049
28S_Um1760	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000			
28S_Am1858	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,97	0,98	0,98	0,98	0,003	0,98	0,000	0,98	0,009	0,483	0,446	0,423
28S_Cm1868	0,16	0,00	0,14	0,36	0,25	0,38	0,05	0,35	0,11	0,10	0,087	0,33	0,069	0,17	0,161	0,002	0,332	0,178
28S_Cm2338	0,87	0,86	0,85	0,87	0,87	0,89	0,87	0,85	0,87	0,86	0,008	0,88	0,008	0,87	0,011	0,069	0,195	0,073
28S_Am2350	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98	0,000	0,98	0,001	0,99	0,003	0,274	0,165	0,125
28S_Gm2351	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,000	0,99	0,001	0,99	0,001	0,206	0,473	0,176
28S_Cm2352	0,93	0,90	0,93	0,95	0,94	0,96	0,91	0,95	0,93	0,92	0,017	0,95	0,007	0,93	0,024	0,019	0,397	0,171
28S_Am2388	0,62	0,25	0,61	0,71	0,62	0,78	0,58	0,72	0,57	0,50	0,209	0,70	0,081	0,62	0,084	0,061	0,264	0,237
28S_Um2402	0,59	0,02	0,61	0,62	0,61	0,89	0,61	0,64	0,59	0,41	0,333	0,71	0,156	0,62	0,026	0,101	0,210	0,229
28S_Cm2409	0,94	0,94	0,95	0,96	0,95	0,97	0,94	0,96	0,94	0,94	0,002	0,96	0,011	0,95	0,012	0,048	0,260	0,274
28S_Gm2411	0,91	0,90	0,90	0,87	0,91	0,94	0,91	0,89	0,91	0,90	0,007	0,91	0,034	0,90	0,008	0,458	0,329	0,431
28S_Am2774	0,86	0,86	0,87	0,89	0,85	0,90	0,88	0,88	0,86	0,86	0,008	0,88	0,023	0,87	0,008	0,112	0,173	0,355
28S_Cm2791	0,95	0,93	0,95	0,96	0,95	0,96	0,95	0,95	0,94	0,95	0,009	0,95	0,007	0,95	0,005	0,014	0,407	0,225
28S_Am2802	0,96	0,94	0,96	0,96	0,96	0,96	0,94	0,96	0,96	0,95	0,010	0,96	0,002	0,95	0,011	0,104	0,445	0,168
28S_Cm2811	0,89	0,81	0,87	0,90	0,89	0,92	0,83	0,90	0,87	0,86	0,039	0,90	0,011	0,87	0,037	0,070	0,410	0,135
28S_Um2824	0,89	0,89	0,88	0,86	0,90	0,88	0,88	0,90	0,90	0,89	0,004	0,88	0,021	0,90	0,010	0,260	0,150	0,068
28S_Cm2848	0,89	0,88	0,90	0,91	0,90	0,93	0,89	0,92	0,90	0,89	0,010	0,91	0,012	0,90	0,016	0,023	0,244	0,267
28S_Gm2863	0,77	0,71	0,77	0,80	0,78	0,84	0,75	0,80	0,76	0,75	0,038	0,81	0,027	0,77	0,028	0,028	0,326	0,153
28S_Gm3606	0,85	0,84	0,86	0,85	0,86	0,87	0,87	0,86	0,84	0,85	0,013	0,86	0,009	0,86	0,016	0,129	0,294	0,435
28S_Cm3680	0,86	0,86	0,86	0,85	0,85	0,85	0,79	0,87	0,87	0,86	0,001	0,85	0,004	0,84	0,047	0,120	0,354	0,406
28S_Am3697	0,90	0,90	0,90	0,92	0,91	0,92	0,87	0,92	0,90	0,90	0,004	0,92	0,009	0,90	0,024	0,011	0,428	0,182
28S_Am3703	0,96	0,96	0,96	0,96	0,97	0,97	0,95	0,97	0,96	0,96	0,001	0,97	0,003	0,96	0,011	0,020	0,347	0,127
28S_Gm3723	0,44	0,49	0,49	0,56	0,53	0,61	0,52	0,55	0,54	0,47	0,030	0,56	0,042	0,54	0,017	0,041	0,009	0,209
28S_Am3739	0,98	0,98	0,98	0,97	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,001	0,98	0,006	0,98	0,002	0,339	0,160	0,439
28S_Am3764	0,96	0,95	0,95	0,87	0,95	0,93	0,94	0,94	0,94	0,95	0,006	0,92	0,039	0,94	0,004	0,138	0,042	0,205
28S_Gm3771	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,001	0,99	0,003	0,99	0,002	0,421	0,035	0,027
28S_Cm3787	0,90	0,89	0,91	0,93	0,92	0,93	0,92	0,93	0,91	0,90	0,012	0,93	0,003	0,92	0,012	0,024	0,152	0,245
28S_Um3797	0,95	0,96	0,95	0,94	0,96	0,96	0,96	0,96	0,95	0,96	0,006	0,95	0,009	0,96	0,002	0,211	0,418	0,294
28S_Am3804	0,89	0,85	0,88	0,90	0,91	0,90	0,91	0,92	0,91	0,87	0,020	0,90	0,005	0,91	0,003	0,090	0,043	0,011
28S_Am3809	0,90	0,79	0,88	0,90	0,90	0,90	0,90	0,92	0,91	0,86	0,061	0,90	0,004	0,91	0,008	0,167	0,151	0,061
28S_Cm3820	0,98	0,97	0,98	0,95	0,97	0,96	0,97	0,97	0,97	0,98	0,005	0,96	0,007	0,97	0,001	0,057	0,058	0,091
28S_Am3846	0,94	0,93	0,93	0,94	0,93	0,94	0,94	0,94	0,92	0,94	0,004	0,94	0,006	0,93	0,009	0,457	0,440	0,442
28S_Cm3848	0,76	0,75	0,78	0,85	0,80	0,86	0,82	0,85	0,80	0,77	0,015	0,84	0,030	0,82	0,024	0,014	0,056	0,347
28S_Cm3866	0,90	0,95	0,94	0,91	0,94	0,93	0,95	0,94	0,94	0,93	0,023	0,93	0,014	0,95	0,008	0,405	0,244	0,165
28S_Gm3878	0,86	0,91	0,90	0,92	0,93	0,93	0,93	0,92	0,91	0,89	0,028	0,92	0,005	0,92	0,008	0,067	0,132	0,324
28S_Um3904	0,89	0,90	0,88	0,91	0,89	0,90	0,90	0,90	0,90	0,89	0,013	0,90	0,007	0,90	0,002	0,238	0,152	0,490
28S_Gm3923	0,81	0,76	0,80	0,80	0,79	0,81	0,77	0,81	0,78	0,79	0,026	0,80	0,007	0,78	0,018	0,344	0,404	0,217
28S_Gm4020	0,81	0,76	0,78	0,81	0,80	0,83	0,78	0,81	0,78	0,78	0,024	0,81	0,015	0,79	0,019	0,108	0,382	0,190
28S_Cm4032	0,92	0,94	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,95	0,93	0,93	0,005	0,93	0,002	0,94	0,012	0,316	0,138	0,180
28S_Gm4166	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95	0,97	0,94	0,95	0,95	0,95	0,003	0,96	0,008	0,95	0,006	0,242	0,217	0,046
28S_Um4197	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,002	0,97	0,003	0,97	0,002	0,284	0,380	0,184
28S_Gm4198	0,97	0,97	0,97	0,98	0,98	0,97	0,97	0,98	0,97	0,97	0,004	0,98	0,004	0,97	0,004	0,193	0,289	0,366
28S_Um4276	0,88	0,86	0,88	0,90	0,91	0,90	0,87	0,91	0,89	0,88	0,010	0,90	0,007	0,89	0,021	0,056	0,231	0,197
28S_Gm4340	0,92	0,92	0,94	0,93	0,93	0,93	0,94	0,93	0,92	0,93	0,008	0,93	0,001	0,93	0,007	0,327	0,351	0,395
28S_Gm4362	0,97	0,96	0,97	0,96	0,96	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	0,005	0,96	0,003	0,96	0,002	0,490	0,353	0,325
28S_Cm4426	0,96	0,95	0,95	0,97	0,95	0,95	0,96	0,97	0,96	0,95	0,005	0,96	0,012	0,96	0,005	0,132	0,099	0,397
28S_Gm4464	0,30	0,74	0,56	0,48	0,53	0,57	0,58	0,73	0,67	0,53	0,223	0,53	0,045	0,66	0,075	0,489	0,135	0,036
28S_Um4468	0,98	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,007	0,99	0,004	0,99	0,004	0,250	0,220	0,253
28S_Gm4469	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,98	0,98	0,005	0,99	0,001	0,99	0,006	0,053	0,275	0,262
28S_Am4493	0,97	0,89	0,93	0,93	0,97	0,86	0,88	0,97	0,94	0,93	0,039	0,92	0,058	0,93	0,043	0,436	0,493	0,409
28S_Cm4506	0,98	0,98	0,98	0,97	0,98	0,97	0,97	0,98	0,98	0,98	0,001	0,97	0,002	0,98	0,003	0,227	0,487	0,165
28S_Am4541	0,80	0,76	0,76	0,82	0,81	0,80	0,79	0,83	0,78	0,77	0,024	0,81	0,014	0,80	0,024	0,018	0,164	0,316
28S_Am4560	0,57	0,41	0,45	0,63	0,58	0,65	0,54	0,61	0,49	0,48	0,083	0,62	0,035	0,55	0,060	0,039	0,208	0,157
28S_Gm4588	0,40	0,35	0,37	0,41	0,44	0,52	0,39	0,49	0,43	0,37	0,028	0,46	0,057	0,44	0,050	0,091	0,144	0,322
28S_Um4590	0,61	0,61	0,62	0,61	0,60	0,63	0,60	0,57	0,60	0,61	0,004	0,62	0,015	0,59	0,015	0,300	0,050	0,015
28S_Gm4593	0,90	0,91	0,90	0,90	0,90	0,91	0,92	0,89	0,89	0,90	0,004	0,90	0,004	0,90	0,016	0,462	0,326	0,337
28S_Gm4607	0,65	0,64	0,64	0,66	0,66	0,68	0,63	0,64	0,63	0,64	0,003	0,67	0,014	0,63	0,007	0,056	0,088	0,032
5,8S_Um14	0,81	0,79	0,81	0,81	0,82	0,80	0,86	0,81	0,80	0,80	0,012	0,81	0,008	0,82	0,035	0,285	0,194	0,303
5,8S_Gm75	0,85	0,83	0,85	0,86	0,85	0,85	0,83	0,86	0,84	0,84	0,014	0,85	0,005	0,84	0,014	0,122	0,482	0,188

Table 7: MethScore LSU HDLEC

SSU free fraction

site	NT			Dox			Dox+arr			Tm			Tm+arr			p-value Dox 6h	p-value NT vs Dox 6h	p-value NT vs Dox 30h	p-value Doxéh vs Dox 30h	p-value NT vs Tm 6h	p-value NT vs Tm 30h	p-value Tméh vs Tm 30h
	NT Libre_R1	NT Libre_R2	NT Libre_R3	6h Dox Libre_R1	6h Dox Libre_R2	6h Dox Libre_R3	30h Dox Libre_R1	30h Dox Libre_R2	30h Dox Libre_R3	6h Tm Libre_R1	6h Tm Libre_R2	6h Tm Libre_R3	30h Tm Libre_R1	30h Tm Libre_R2	30h Tm Libre_R3	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD								
185_Am27	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.0093	0.938	0.0022	0.938	0.0063	0.938	0.0093	0.938	0.0088	0.41	0.41	0.34	0.48	0.34	0.34	0.31
185_Am99	0.94	0.92	0.94	0.93	0.99	0.95	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.95	0.93	0.94	0.0012	0.94	0.0013	0.94	0.0022	0.94	0.0006	0.94	0.0006	0.41	0.34	0.41	0.41	0.34	0.34	0.34
185_Um116	0.87	0.86	0.87	0.86	0.86	0.88	0.85	0.87	0.88	0.86	0.87	0.85	0.87	0.85	0.85	0.87	0.0007	0.87	0.0011	0.86	0.0011	0.86	0.0010	0.86	0.0010	0.28	0.40	0.48	0.22	0.04	0.41	0.41
185_Um121	0.97	0.96	0.97	0.96	0.95	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.97	0.96	0.96	0.97	0.96	0.96	0.0003	0.96	0.0005	0.96	0.0004	0.96	0.0005	0.97	0.0004	0.03	0.02	0.37	0.09	0.37	0.26	
185_Am159	0.94	0.92	0.93	0.94	0.92	0.94	0.93	0.94	0.93	0.94	0.92	0.93	0.93	0.92	0.93	0.93	0.0007	0.93	0.0012	0.93	0.0007	0.93	0.0010	0.93	0.0010	0.26	0.35	0.47	0.19	0.10	0.03	
185_Am166	0.98	0.99	0.98	0.99	0.98	0.99	0.98	0.98	0.98	0.99	0.98	0.99	0.99	0.98	0.98	0.98	0.0001	0.98	0.0004	0.98	0.0002	0.98	0.0002	0.98	0.0002	0.14	0.01	0.05	0.27	0.27	0.36	
185_Um172	0.88	0.85	0.87	0.88	0.87	0.90	0.89	0.89	0.89	0.88	0.86	0.87	0.88	0.86	0.86	0.86	0.0011	0.89	0.0002	0.87	0.0011	0.87	0.0013	0.87	0.0013	0.06	0.04	0.14	0.08	0.45	0.16	
185_Um174	0.53	0.52	0.49	0.62	0.71	0.70	0.69	0.33	0.58	0.76	0.49	0.61	0.54	0.54	0.22	0.22	0.0038	0.65	0.0048	0.53	0.0186	0.62	0.1337	0.43	0.1833	0.02	0.44	0.19	0.15	0.25	0.14	
185_Um344	0.88	0.85	0.86	0.91	0.95	0.94	0.85	0.89	0.86	0.85	0.87	0.83	0.89	0.89	0.83	0.85	0.0013	0.85	0.0047	0.87	0.0118	0.85	0.0032	0.85	0.0032	0.41	0.45	0.26	0.38	0.31	0.30	
185_Um358	0.71	0.71	0.79	0.92	0.77	0.84	0.91	0.91	0.89	0.92	0.77	0.82	0.91	0.91	0.79	0.79	0.0047	0.79	0.0037	0.79	0.0151	0.79	0.0024	0.79	0.0023	0.10	0.09	0.11	0.07	0.22	0.08	
185_Gm482	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.96	0.95	0.95	0.93	0.97	0.94	0.96	0.94	0.94	0.94	0.95	0.0001	0.95	0.0006	0.95	0.0003	0.95	0.0008	0.95	0.0008	0.18	0.17	0.12	0.26	0.49	0.12	
185_Am484	0.96	0.95	0.95	0.96	0.95	0.96	0.95	0.96	0.96	0.95	0.95	0.96	0.95	0.96	0.96	0.96	0.0001	0.96	0.0003	0.96	0.0004	0.96	0.0004	0.96	0.0004	0.28	0.35	0.40	0.39	0.38	0.46	
185_Gm509	0.85	0.85	0.86	0.85	0.84	0.86	0.84	0.85	0.86	0.84	0.84	0.85	0.86	0.85	0.86	0.85	0.0009	0.85	0.0010	0.85	0.0012	0.84	0.0009	0.87	0.0007	0.03	0.22	0.49	0.05	0.13	0.04	
185_Am512	0.89	0.85	0.90	0.91	0.90	0.91	0.90	0.89	0.88	0.91	0.85	0.89	0.89	0.91	0.87	0.87	0.0024	0.91	0.0008	0.89	0.0010	0.89	0.0029	0.89	0.0018	0.04	0.23	0.12	0.25	0.33	0.40	
185_Um517	0.97	0.98	0.97	0.96	0.97	0.97	0.97	0.98	0.97	0.97	0.96	0.94	0.97	0.97	0.97	0.97	0.0004	0.97	0.0006	0.97	0.0002	0.97	0.0004	0.97	0.0001	0.11	0.36	0.17	0.18	0.09	0.22	
185_Am576	0.94	0.94	0.95	0.95	0.95	0.96	0.93	0.95	0.97	0.96	0.94	0.94	0.95	0.91	0.95	0.94	0.0009	0.95	0.0004	0.95	0.0018	0.95	0.0015	0.94	0.0028	0.06	0.18	0.40	0.41	0.34	0.25	
185_Am590	0.94	0.89	0.93	0.93	0.92	0.96	0.94	0.94	0.95	0.93	0.93	0.94	0.94	0.93	0.92	0.93	0.0029	0.94	0.0023	0.94	0.0010	0.93	0.0006	0.92	0.0010	0.14	0.17	0.36	0.22	0.43	0.16	
185_Gm621	0.93	0.90	0.94	0.94	0.91	0.96	0.92	0.95	0.95	0.93	0.92	0.94	0.94	0.91	0.93	0.94	0.0022	0.94	0.0025	0.94	0.0015	0.93	0.0003	0.93	0.0014	0.02	0.18	0.28	0.24	0.28	0.44	
185_Gm641	0.92	0.93	0.93	0.94	0.93	0.93	0.93	0.94	0.93	0.93	0.93	0.96	0.95	0.94	0.93	0.93	0.0005	0.93	0.0005	0.93	0.0005	0.93	0.0005	0.93	0.0005	0.47	0.72	0.26	0.26	0.22	0.21	
185_Am648	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.96	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.0001	0.95	0.0003	0.95	0.0001	0.95	0.0001	0.95	0.0001	0.47	0.72	0.29	0.17	0.03	0.03	
185_Gm683	0.92	0.90	0.90	0.91	0.88	0.90	0.90	0.92	0.92	0.89	0.88	0.91	0.90	0.89	0.89	0.90	0.0010	0.90	0.0012	0.91	0.0009	0.89	0.0010	0.90	0.0009	0.04	0.23	0.31	0.13	0.05	0.21	
185_Gm797	0.86	0.84	0.87	0.87	0.84	0.88	0.88	0.87	0.90	0.87	0.85	0.87	0.87	0.82	0.84	0.86	0.0017	0.88	0.0024	0.88	0.0020	0.86	0.0013	0.85	0.0026	0.10	0.09	0.27	0.13	0.28	0.16	
185_Gm867	0.75	0.62	0.70	0.68	0.64	0.75	0.68	0.71	0.70	0.61	0.64	0.67	0.72	0.66	0.65	0.69	0.0068	0.69	0.0053	0.70	0.0013	0.64	0.0031	0.68	0.0041	0.49	0.44	0.43	0.21	0.34	0.24	
185_Am1083	0.97	0.96	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.98	0.98	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.0004	0.97	0.0002	0.97	0.0006	0.97	0.0002	0.97	0.0002	0.21	0.22	0.23	0.23	0.35	0.46	
185_Cm1272	0.21	0.00	0.20	0.29	0.21	0.30	0.18	0.27	0.30	0.33	0.22	0.28	0.22	0.11	0.22	0.14	0.1211	0.27	0.0511	0.25	0.0642	0.28	0.0555	0.18	0.0862	0.04	0.17	0.42	0.04	0.17	0.02	
185_Um1284	0.91	0.90	0.91	0.91	0.90	0.91	0.91	0.90	0.90	0.92	0.89	0.91	0.90	0.91	0.90	0.91	0.0067	0.91	0.0056	0.91	0.0066	0.91	0.0111	0.90	0.0004	0.09	0.30	0.47	0.43	0.16	0.37	
185_Um1326	0.97	0.96	0.96	0.95	0.97	0.98	0.97	0.97	0.97	0.96	0.97	0.97	0.96	0.96	0.97	0.97	0.0066	0.97	0.0012	0.97	0.0003	0.97	0.0004	0.96	0.0004	0.47	0.35	0.43	0.44	0.23	0.23	
185_Am1384	0.98	0.98	0.98	0.92	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.0006	0.98	0.0003	0.98	0.0001	0.98	0.0001	0.98	0.0001	0.32	0.10	0.13	0.38	0.34	0.47	
185_Um1443	0.75	0.64	0.71	0.75	0.70	0.77	0.70	0.78	0.75	0.74	0.69	0.72	0.75	0.70	0.74	0.74	0.0034	0.74	0.0053	0.74	0.0040	0.72	0.0029	0.74	0.0044	0.21	0.08	0.21	0.32	0.33	0.33	
185_Gm1447	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0001	0.00	0.0054	0.00	0.0000	0.00	0.0004	0.00	0.0000	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	
185_Gm1496	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.99	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.0001	0.98	0.0002	0.98	0.0001	0.99	0.0004	0.98	0.0003	0.43	0.32	0.22	0.22	0.36	0.24	
185_Um1664	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.00	0.0000	0.00	0.0000	0.00	0.0000	0.00	0.0000							
185_Am1674	0.96	0.96	0.96	0.96	0.93	0.96	0.95	0.95	0.95	0.92	0.92	0.94	0.96	0.87	0.96	0.94	0.0021	0.94	0.0007	0.95	0.0008	0.94	0.0012	0.93	0.0051	0.26	0.25	0.40	0.00	0.12	0.46	
185_Cm1708	0.98	0.97	0.97	0.98	0.97	0.98	0.96	0.98	0.97	0.97	0.97	0.98	0.98	0.98	0.98	0.97	0.0008	0.97	0.0006	0.97	0.0008	0.97	0.0009	0.98	0.0001	0.08	0.40	0.28	0.40	0.18	0.13	
185_Um1804	0.96	0.96	0.96	0.95	0.95	0.96	0.95	0.96	0.95	0.93	0.94	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.0002	0.95	0.0006	0.95	0.0006	0.94	0.0017	0.96	0.0006	0.24	0.12	0.49	0.14	0.37	0.19	

Table 8: MethScore SSU fraction libre en réponse aux différents traitements

LSU free fraction

site	NT			Dxo				Tm				Dxo and recovery				Tm and recovery				p-value NT vs Dxo 6h	p-value NT vs Dxo 30h	p-value Dxo6h vs Dxo 30h	p-value NT vs Tm 6h	p-value NT vs Tm 30h	p-value Tm6h vs Tm 30h
	NT Libre_R1	NT Libre_R2	NT Libre_R3	6h Dxo Libre_R1	6h Dxo Libre_R2	6h Dxo Libre_R3	30h Dxo Libre_R1	30h Dxo Libre_R2	30h Dxo Libre_R3	6h Tm Libre_R1	6h Tm Libre_R2	6h Tm Libre_R3	30h Tm Libre_R1	30h Tm Libre_R2	30h Tm Libre_R3	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD						
28S_Am389	0,96	0,96	0,96	0,92	0,96	0,97	0,95	0,96	0,94	0,95	0,95	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	0,001	0,95	0,025	0,96	0,013	0,003						
28S_Am391	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,98	0,004	0,98	0,003	0,98	0,021	0,006	0,50	0,08	0,14	0,48	0,31	0,38
28S_Am393	0,48	0,42	0,49	0,51	0,41	0,54	0,45	0,47	0,47	0,47	0,44	0,44	0,51	0,45	0,48	0,48	0,038	0,47	0,022	0,45	0,021	0,028	0,18	0,44	0,30	0,15	0,20	0,05
28S_Am1310	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	0,000	0,00	0,08	0,32	0,45	0,50	
28S_Am1313	0,95	0,96	0,94	0,95	0,95	0,95	0,95	0,96	0,96	0,90	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,006	0,93	0,029	0,93	0,027	0,027	0,23	0,39	0,29	0,23	0,20	0,45
28S_Am1304	0,87	0,83	0,88	0,88	0,85	0,88	0,85	0,85	0,88	0,88	0,83	0,84	0,88	0,84	0,84	0,87	0,022	0,85	0,017	0,85	0,022	0,026	0,08	0,26	0,12	0,20	0,00	0,18
28S_Am1536	0,86	0,86	0,87	0,87	0,86	0,87	0,88	0,88	0,88	0,88	0,87	0,87	0,86	0,86	0,87	0,87	0,006	0,87	0,006	0,86	0,011	0,008	0,00	0,03	0,09	0,31	0,06	0,40
28S_Am1511	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,96	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,95	0,96	0,97	0,97	0,002	0,97	0,005	0,97	0,005	0,010	0,42	0,13	0,26	0,19	0,07	0,11
28S_Am1624	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,002	0,98	0,002	0,98	0,003	0,002	0,12	0,13	0,48	0,38	0,28	0,19
28S_Am1617	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,002	0,99	0,002	0,99	0,002	0,002	0,14	0,49	0,28	0,24	0,33	0,41
28S_Am1742	0,91	0,94	0,88	0,90	0,91	0,94	0,87	0,91	0,94	0,91	0,92	0,94	0,87	0,91	0,94	0,92	0,015	0,90	0,015	0,91	0,007	0,008	0,07	0,12	0,45	0,24	0,37	0,41
28S_Am1762	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,001	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
28S_Am1858	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,003	0,98	0,003	0,98	0,002	0,002	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
28S_Cm1868	0,16	0,00	0,14	0,32	0,11	0,39	0,02	0,20	0,19	0,13	0,03	0,15	0,16	0,07	0,10	0,13	0,148	0,27	0,148	0,11	0,062	0,043	0,03	0,38	0,18	0,43	0,42	0,44
28S_Am2350	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,000	0,98	0,002	0,98	0,002	0,001	0,05	0,09	0,30	0,01	0,42	0,50
28S_Cm2382	0,93	0,90	0,93	0,94	0,93	0,95	0,92	0,93	0,94	0,92	0,92	0,92	0,92	0,93	0,92	0,92	0,010	0,94	0,010	0,93	0,002	0,005	0,04	0,41	0,07	0,04	0,43	0,04
28S_Am2351	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,000	0,99	0,002	0,99	0,002	0,000	0,05	0,30	0,41	0,08	0,22	0,01
28S_Am2388	0,62	0,25	0,61	0,64	0,56	0,74	0,21	0,63	0,66	0,50	0,45	0,57	0,63	0,45	0,56	0,56	0,209	0,65	0,088	0,50	0,251	0,088	0,11	0,49	0,21	0,46	0,28	0,23
28S_Um2402	0,59	0,02	0,61	0,75	0,58	0,81	0,20	0,64	0,59	0,55	0,25	0,57	0,61	0,31	0,57	0,44	0,333	0,71	0,123	0,48	0,241	0,166	0,07	0,42	0,16	0,32	0,23	0,10
28S_Cm2409	0,94	0,94	0,95	0,96	0,95	0,96	0,95	0,95	0,94	0,93	0,94	0,94	0,94	0,95	0,94	0,94	0,002	0,94	0,008	0,95	0,003	0,003	0,03	0,35	0,07	0,13	0,48	0,13
28S_Cm2411	0,91	0,90	0,90	0,90	0,91	0,92	0,89	0,91	0,89	0,89	0,90	0,91	0,91	0,90	0,91	0,90	0,007	0,90	0,008	0,90	0,014	0,009	0,03	0,27	0,09	0,31	0,17	0,18
28S_Am2774	0,86	0,86	0,87	0,90	0,87	0,91	0,87	0,85	0,86	0,86	0,82	0,87	0,90	0,89	0,86	0,86	0,017	0,85	0,026	0,88	0,019	0,008	0,03	0,27	0,09	0,31	0,17	0,30
28S_Cm2791	0,95	0,93	0,95	0,95	0,95	0,96	0,94	0,95	0,95	0,94	0,95	0,95	0,94	0,95	0,94	0,95	0,009	0,95	0,003	0,94	0,005	0,004	0,03	0,49	0,08	0,38	0,31	0,31
28S_Am2802	0,96	0,94	0,96	0,96	0,95	0,97	0,96	0,95	0,96	0,95	0,95	0,97	0,95	0,96	0,94	0,95	0,010	0,95	0,004	0,95	0,004	0,004	0,17	0,26	0,22	0,44	0,45	0,38
28S_Cm2811	0,89	0,91	0,89	0,90	0,89	0,90	0,89	0,89	0,89	0,87	0,87	0,87	0,86	0,85	0,86	0,88	0,023	0,88	0,014	0,86	0,014	0,008	0,10	0,27	0,39	0,45	0,47	0,44
28S_Cm2824	0,89	0,88	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,91	0,88	0,90	0,90	0,89	0,90	0,90	0,90	0,003	0,90	0,010	0,89	0,010	0,008	0,17	0,38	0,21	0,29	0,18	0,32
28S_Cm2834	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,002	0,97	0,003	0,97	0,003	0,002	0,07	0,23	0,13	0,19	0,30	0,48
28S_Cm3404	0,85	0,84	0,86	0,87	0,84	0,87	0,85	0,87	0,85	0,85	0,84	0,84	0,85	0,84	0,84	0,84	0,002	0,85	0,002	0,84	0,002	0,002	0,03	0,23	0,13	0,19	0,20	0,20
28S_Cm3480	0,86	0,86	0,86	0,88	0,85	0,88	0,84	0,85	0,86	0,84	0,84	0,87	0,85	0,86	0,86	0,86	0,001	0,87	0,019	0,86	0,016	0,019	0,20	0,46	0,26	0,47	0,28	0,36
28S_Cm3723	0,90	0,90	0,90	0,92	0,91	0,92	0,85	0,90	0,89	0,89	0,90	0,90	0,92	0,92	0,86	0,90	0,010	0,88	0,003	0,90	0,017	0,002	0,02	0,22	0,13	0,11	0,49	0,34
28S_Am3703	0,96	0,96	0,96	0,97	0,96	0,97	0,93	0,96	0,96	0,93	0,97	0,97	0,95	0,95	0,94	0,96	0,005	0,96	0,005	0,95	0,017	0,003	0,06	0,46	0,31	0,37	0,02	0,30
28S_Am3723	0,44	0,49	0,46	0,56	0,53	0,60	0,49	0,46	0,46	0,54	0,46	0,54	0,58	0,52	0,46	0,53	0,036	0,54	0,036	0,52	0,060	0,058	0,04	0,06	0,20	0,20	0,21	0,47
28S_Am3738	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,97	0,98	0,99	0,98	0,003	0,98	0,002	0,98	0,002	0,010	0,25	0,07	0,34	0,22	0,24	0,31
28S_Am3764	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,91	0,93	0,94	0,88	0,92	0,94	0,97	0,96	0,89	0,94	0,016	0,92	0,029	0,94	0,004	0,041	0,09	0,07	0,22	0,10	0,10	0,29
28S_Cm3771	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,004	0,99	0,004	0,99	0,007	0,008	0,17	0,36	0,10	0,41	0,10	0,40
28S_Cm3787	0,90	0,89	0,91	0,93	0,90	0,93	0,90	0,92	0,93	0,91	0,90	0,92	0,91	0,90	0,91	0,90	0,012	0,92	0,018	0,91	0,007	0,008	0,07	0,12	0,45	0,05	0,27	0,37
28S_Um3797	0,95	0,96	0,95	0,96	0,96	0,96	0,95	0,96	0,96	0,96	0,96	0,97	0,95	0,96	0,96	0,96	0,006	0,96	0,001	0,96	0,005	0,008	0,31	0,30	0,03	0,36	0,22	0,21
28S_Am3804	0,89	0,85	0,88	0,92	0,91	0,90	0,87	0,91	0,91	0,88	0,90	0,90	0,89	0,82	0,80	0,87	0,020	0,90	0,023	0,89	0,008	0,008	0,05	0,17	0,29	0,21	0,01	0,01
28S_Am3809	0,90	0,79	0,88	0,93	0,90	0,95	0,92	0,91	0,92	0,92	0,89	0,88	0,79	0,76	0,75	0,90	0,061	0,90	0,019	0,90	0,018	0,022	0,17	0,20	0,46	0,18	0,06	0,00
28S_Cm3820	0,98	0,97	0,98	0,98	0,97	0,98	0,97	0,96	0,97	0,97	0,97	0,97	0,95	0,98	0,97	0,97	0,005	0,98	0,007	0,97	0,003	0,014	0,31	0,01	0,07	0,08	0,20	0,28
28S_Am3844	0,94	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,92	0,94	0,94	0,94	0,93	0,93	0,94	0,94	0,94	0,94	0,004	0,94	0,010	0,93	0,005	0,002	0,46	0,28	0,02	0,03	0,05	0,03
28S_Cm3898	0,76	0,75	0,78	0,79	0,78	0,84	0,83	0,83	0,85	0,77	0,81	0,81	0,83	0,77	0,80	0,80	0,015	0,80	0,030	0,80	0,031	0,031	0,03	0,05	0,39	0,10	0,10	0,08
28S_Cm3896	0,80	0,55	0,84	0,94	0,84	0,94	0,85	0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,93	0,93	0,93	0,93	0,023	0,94	0,001	0,93	0,009	0,009	0,23	0,22	0,26	0,22	0,30	0,29
28S_Um3924	0,90	0,89	0,90	0,88	0,89	0,91	0,90	0,89	0,91	0,87	0,90	0,91	0,89	0,82	0,80	0,87	0,020	0,90	0,023	0,89	0,008	0,008	0,07	0,12	0,45	0,24	0,37	0,41
28S_Am3924	0,81	0,76	0,80	0,80	0,81	0,78	0,78	0,80	0,81	0,79	0,79	0,81	0,77	0,75	0,75	0,78	0,033	0,81	0,015	0,78	0,011	0,012	0,03	0,30	0,03	0,30	0,22	0,21
28S_Cm4002	0,92	0,94	0,93	0,93	0,93	0,91	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,93	0,93	0,94	0,93	0,93	0,004	0,92	0,004	0,92	0,006	0,004	0,34	0,16	0,31	0,21	0,09	0,14
28S_Cm4032	0,92	0,94	0,93	0,93	0,93	0,93	0,91	0,92	0,92	0,92	0,93	0,93	0,91	0,93	0,93	0,93	0,003	0,93	0,011	0,93	0,006	0,010	0,34	0,16	0,31	0,21	0,09	0,49
28S_Cm4166	0,96	0,95	0,95	0,94	0,95	0,96	0,95	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,94	0,92	0,96	0,95	0,003	0,95	0,004	0,94	0,005	0,018	0,14	0,41	0,02	0,28	0,22	0,28
28S_Cm4198	0,97	0,97	0,97	0,98	0,97	0,98	0,97	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,004	0,98	0,003	0,97	0,001	0,004	0,04	0,13	0,04	0,32	0,20	0,01
28S_Um4276	0,88	0,86	0,88	0,89	0,86	0,89	0,87	0,90	0,90	0,88	0,87	0,88	0,88	0,86	0,86	0,88	0,010	0,88	0,021	0,88	0,008	0,009	0,22	0,40	0,17	0,31	0,40	0,29
28S_Cm4340	0,92	0,92	0,94	0,94	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,92	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,007	0,93	0,007	0,93	0,002	0,004	0,27	0,40	0,17	0,42	0,45	0,14
28S_Cm4362	0,97	0,96	0,97	0,97	0,95	0,96	0,94	0,95	0,96	0,94	0,95	0,96	0,94	0,96	0,96	0,96	0,004	0,96	0,008	0,95	0,005	0,012	0,03	0,17	0,45	0,18	0,43	0,16
28S_Cm4464	0,30	0,74	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,005	0,96	0,005	0,96	0,005	0,003	0,17	0,35	0,43	0,42	0,14	0,06
28S_Um4468	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,002	0,99	0,002	0,99	0,002	0,005	0,04	0,07	0,13	0,11	0,01	0,08
28S_Am4493	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,002	0,97	0,003	0,97	0,003	0,003	0,07	0,25	0,47	0,29	0,23	0,27
28S_Am4504	0,80	0,76	0,81	0,81	0,78	0,82	0,78	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,000	0,79	0,000	0,79	0,000	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
28S_Cm4536	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,002	0,99	0,002	0,99	0,002	0,002	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
28S_Cm4558	0,40	0,21	0,37	0,43	0,33	0,53	0,42	0,39	0,41	0,39	0,38	0,41	0,39	0,37	0,46	0,40	0,046	0,43	0,046	0,40	0,101	0,043	0,11	0,44	0,19	0,23	0,08	0,13
28S_Cm4586	0,61	0,61	0,62	0,66	0,63	0,59	0,64	0,61	0,61	0,58	0,61	0,66	0,59	0,63	0,63	0,61	0,026	0,61	0,026	0,60	0,019	0,019	0,18	0,48	0,32	0,17	0,26	0,04
28S_Cm4593	0,90	0,91	0,90	0,89	0,90	0,92	0,90	0,91	0,91	0,89	0,89	0,90	0,91	0,90	0,90	0,90	0,013	0,90	0,013	0,90	0,014	0,004	0,34	0,18	0,38	0,22	0,01	0,27
28S_Cm4607	0,65	0,64	0,64	0,63	0,62	0,69	0,64	0,64	0,65	0,62	0,69	0,69	0,67	0,57	0,57	0,64	0,003	0,64	0,037	0,64	0,032	0,049	0,49	0,19	0,42	0,29	0,25	0,26
28S_Um4614	0,81	0,79	0,81	0,81	0,77	0,78	0,82	0,81	0,85	0,80	0,80	0,81	0,79	0,81	0,81	0,80	0,012	0,79	0,021	0,81	0,025	0,011	0,10	0,21	0,16	0,16	0,11	0,17
5,8S_Gm751	0,85	0,83	0,85	0,85	0,82	0,86	0,82	0,86	0,83	0,85	0,85	0,85	0,84	0,83	0,82	0,84	0,014	0,84	0,022	0,84	0,013	0,010	0,43	0,48	0,49	0,40	0,17	0,29

Table 8: MethScore LSU fraction libre en réponse aux différents traitements

SSU 80S fraction

site	NT			Dapp				Tm				NT	Dapp	Dapp and recovery	Tm	Tm and recovery	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value
	80s_R1	80s_R2	80s_R3	80s_R1	80s_R2	80s_R3	80s_R1	80s_R2	80s_R3	80s_R1	80s_R2	80s_R3	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	NT vs Dox 6h	NT vs Dox 30h	Dox6h vs NT 6h	NT vs Tm 30h	Tm6h vs Tm 30h
18S_Am27	0,98456	0,97891	0,97902	0,98143	0,98328	0,98402	0,97772	0,97693	0,98138	0,98033	0,97883	0,98033	0,98082	0,00324	0,98765	0,00147	0,98587	0,00698	0,98039	0,00153	0,27753	0,13185	0,33488	0,49878	0,45734
18S_Am99	0,95023	0,94258	0,95002	0,94534	0,96428	0,94309	0,92781	0,93247	0,94164	0,93092	0,92981	0,93276	0,94164	0,89195	0,92772	0,93805	0,93289	0,94221	0,94761	0,00435	0,03764	0,03741	0,10651	0,00139	0,18357
18S_Um116	0,87662	0,87237	0,88205	0,88381	0,89386	0,86553	0,87253	0,82621	0,88592	0,88239	0,86935	0,85399	0,86239	0,85839	0,87926	0,87899	0,88732	0,87876	0,88552	0,87706	0,00485	0,12068	0,31699	0,02936	0,02166
18S_Um121	0,96096	0,96096	0,96014	0,96369	0,96428	0,95395	0,96362	0,96159	0,95576	0,95762	0,96105	0,96037	0,95676	0,00287	0,96379	0,00428	0,96042	0,00286	0,95885	0,00282	0,96391	0,11621	0,22902	0,00088	0,4632
18S_Am159	0,94659	0,93258	0,96004	0,94259	0,94921	0,93468	0,91972	0,92269	0,92866	0,93397	0,94899	0,89203	0,94813	0,92494	0,95341	0,94147	0,94627	0,01389	0,94271	0,00461	0,02963	0,94725	0,0155	0,38408	0,03657	0,05048	0,23818	0,20493	0,27144
18S_Am166	0,98709	0,98026	0,98636	0,98448	0,98833	0,98691	0,98647	0,98609	0,98714	0,98743	0,98671	0,98557	0,97911	0,9813	0,98381	0,98324	0,98529	0,00455	0,98874	0,00387	0,98699	0,00148	0,98217	0,00389	0,98466	0,00414	0,46903	0,28718	0,25127	0,29213	0,41764
18S_Um172	0,89463	0,88616	0,89046	0,88638	0,89246	0,87373	0,90295	0,87525	0,89016	0,89247	0,88535	0,88157	0,90027	0,01763	0,8903	0,01146	0,87544	0,00312	0,85597	0,00589	0,89598	0,01104	0,29724	0,05091	0,11253	0,17824	0,34949	0,23548	0,27448
18S_Um174	0,72787	0,58468	0,76604	0	0	0	0,71412	0,54883	0,69801	0	0	0	0,77851	0,52137	0,53899	0	0,72254	0,69179	0,74566	0,67336	0,11245	0,43077	0,39637	0,42057	0,37557	0,19751	0,21696	0,22854	0,21731	0,11689	0,48874
18S_Um354	0,83018	0,89146	0,86246	0,84713	0,88115	0,86609	0,87138	0,82838	0,88358	0,86508	0,85359	0,83033	0,86918	0,86238	0,85202	0,85169	0,86493	0,03763	0,85697	0,03076	0,86493	0,01941	0,86115	0,02899	0,84301	0,01794	0,86356	0,04956	0,40676	0,49356	0,46707	0,28019	0,46703	0,05657
18S_Um428	0,84693	0,80996	0,84685	0,83041	0,86418	0,81586	0,85587	0,76395	0,77559	0,79304	0,76879	0,73555	0,75442	0,82373	0,78504	0,81476	0,77834	0,01348	0,82731	0,78392	0,84016	0,82133	0,81569	0,08324	0,00575	0,02917	0,11864	0,00224	0,04669	0,01647
18S_Um436	0,89399	0,89263	0,91399	0,90634	0,91655	0,90574	0,88255	0,89703	0,91903	0,89941	0,90604	0,89941	0,91088	0,88724	0,89054	0,91249	0,91224	0,01523	0,89954	0,00126	0,89505	0,0117	0,90635	0,01101	0,90345	0,01516	0,89282	0,34002	0,10391	0,30829	0,37657	0,31038
18S_Um462	0,95604	0,95797	0,95797	0,94641	0,95637	0,95393	0,94716	0,94085	0,94899	0,89203	0,93249	0,95341	0,94649	0,02036	0,94694	0,02036	0,95333	0,00502	0,94691	0,00407	0,92469	0,02936	0,94272	0,0155	0,38408	0,03657	0,05048	0,23818	0,20493	0,27144
18S_Um468	0,95617	0,95436	0,95807	0,97017	0,96051	0,96037	0,96704	0,96027	0,9637	0,96478	0,96286	0,96037	0,96478	0,00287	0,96379	0,00428	0,96042	0,00286	0,95885	0,00282	0,96391	0,11621	0,22902	0,00088	0,4632	0,15943					
18S_Am484	0,97250	0,96125	0,96887	0,96638	0,96653	0,96577	0,96197	0,92169	0,94599	0,89203	0,93413	0,92494	0,95341	0,94627	0,94271	0,01389	0,94271	0,00461	0,92469	0,02936	0,94272	0,0155	0,38408	0,03657	0,05048	0,23818	0,20493	0,27144			
18S_Gm509	0,87581	0,87498	0,88927	0,83674	0,85465	0,86309	0,83751	0,85067	0,82699	0,96724	0,94874	0,96096	0,96375	0,96421	0,97139	0,98324	0,98529	0,00455	0,98874	0,00387	0,98699	0,00148	0,98217	0,00389	0,98466	0,00414	0,46903	0,28718	0,25127	0,29213	0,41764
18S_Am512	0,91136	0,87529	0,92601	0,88521	0,90419	0,88802	0,91693	0,89182	0,89182	0,88035	0,87148	0,90021	0,89479	0,01024	0,89554	0,01024	0,90426	0,02611	0,89479	0,01024	0,89554	0,01024	0,90426	0,02611	0,89479	0,01024	0,89554	0,01024	0,90426	0,02611	0,89479
18S_Am517	0,96953	0,97567	0,97406	0,96928	0,97386	0,97216	0,96672	0,96603	0,96848	0,97134	0,96955	0,97159	0,97462	0,97307	0,97225	0,97309	0,97307	0,00318	0,97662	0,00276	0,97622	0,00276	0,97622	0,00276	0,97622	0,00276	0,97622	0,00276	0,97622	0,00276	0,97622
18S_Am576	0,96156	0,95031	0,96734	0,94973	0,96701	0,96453	0,93946	0,92788	0,93953	0,94259	0,93933	0,93933	0,94478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478	0,96478
18S_Am590	0,95012	0,94224	0,96032	0,95089	0,95736	0,93763	0,92712	0,92788	0,94136	0,94385	0,93687	0,93106	0,94585	0,92855	0,96081	0,95089	0,95089	0,00906	0,94141	0,00906	0,94141	0,00906	0,94141	0,00906	0,94141	0,00906	0,94141	0,00906	0,94141	0,00906	0,94141
18S_Gm601	0,95473	0,95429	0,96266	0,96326	0,96529	0,96005	0,92507	0,94806	0,91835	0,93212	0,91703	0,94148	0,96366	0,95724	0,96366	0,95724	0,96366	0,95724	0,96366	0,95724	0,96366	0,95724	0,96366	0,95724	0,96366	0,95724	0,96366	0,95724	0,96366	0,95724	0,96366
18S_Gm621	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18S_Um627	0,95409	0,96624	0,95250	0,95127	0,95727	0,95727	0,95555	0,95869	0,94538	0,94189	0,95414	0,95475	0,95094	0,96055	0,95891	0,96439	0,95761	0,00715	0,95483	0,00725	0,94662	0,01042	0,95041	0,00454	0,95983	0,13482	0,13104	0,19894	0,35523	0,04387
18S_Gm644	0,94289	0,93465	0,94175	0,93247	0,93562	0,93091	0,93434	0,93969	0,93104	0,92363	0,94552	0,93506	0,93796	0,95034	0,95385	0,93544	0,93978	0,00476	0,93544	0,00381	0,95982	0,01058	0,93415	0,01029	0,93978	0,01246	0,18435	0,49627	0,33161	0,17847	0,49562	0,10461
18S_Am668	0,95748	0,95691	0,95980	0,95365	0,95834	0,95612	0,94386	0,95583	0,88347	0,89067	0,95563	0,95585	0,95622	0,94375	0,95397	0,95227	0,00232	0,95194	0,00528	0,93245	0,97042	0,00497	0,95189	0,00621	0,07169	0,06036	0,47620	0,20436	0,08025	0,28182
18S_Gm683	0,93981	0,93559	0,94702	0,92857	0,87932	0,86985	0,91302	0,88692	0,91302	0,87898	0,88692	0,91302	0,90078	0,93155	0,93059	0,92968	0,90078	0,03787	0,89858	0,03787	0,89858	0,03787	0,89858	0,03787	0,89858	0,03787	0,89858	0,03787	0,89858	0,03787	0,89858
18S_Gm797	0,90431	0,88470	0,90132	0,84202	0,90003	0,85763	0,89181	0,86854	0,89181	0,87402	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181	0,89181
18S_Um799	0,91027	0,91119	0,88269	0,88809	0,90317	0,88685	0,90307	0,87204	0,88634	0,91866	0,84697	0,88052	0,89720	0,90599	0,88105	0,90599	0,90599	0,90599	0,90599	0,90599	0,90599	0,90599	0,90599	0,90599	0,90599	0,90599	0,90599	0,90599	0,90599	0,90599	0,90599
18S_Gm867	0,70161	0,72572	0,76263	0,74280	0,65849	0,63948	0,72384	0,68634	0,69397	0,91866	0,84697	0,88052	0,61375	0,66223	0,76268	0,74808	0,70531	0,76268	0,73060	0,03062	0,69613	0,73273	0,02609	0,65659	0,04031	0,72678	0,02184	0,23074	0,06016	0,4186	0,07823	0,01208
18S_Am1031	0,97403	0,95750	0,97526	0,97604	0,97453	0,97474	0,96354	0,97649	0,96734	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553	0,95629	0,96439	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553	0,96553
18S_Cm1272	0,46782	0,31449	0,35175	0,27554	0,23245	0,21539	0,21639	0,16618	0,24803	0	0	0	0,20659	0,21188	0,25789	0,26691	0,32479	0,27805	0,37802	0,26691	0,32479	0,27805	0,37802	0,26691	0,32479	0,27805	0,37802	0,26691	0,32479	0,27805	0,37802
18S_Um1326	0,97302	0,95927	0,96624	0,96921	0,96422	0,96111	0,96156	0,95966	0,96513	0,95829	0,96462	0,96328	0,96218	0,97108	0,95597	0,96509	0,96509	0,96509	0,96509	0,96509	0,96509	0,96509	0,96509	0,96509	0,96509	0,96509	0,96509	0,96509	0,96509	0,96509	0,96509
18S_Um1328	0,94504	0,93411	0,95146	0,94345	0,94858	0,94405	0,94138	0,93828	0,93986	0,93215	0,93316	0,93615	0,93461	0,94584	0,94298	0,94584	0,94584	0,94584	0,94584	0,94584	0,94584	0,94584	0,94584	0,94584	0,94584	0,94584	0,94584	0,94584	0,94584	0,94584	0,94584
18S_Am1383	0,97817	0,98017	0,97933	0,97959	0,98056	0,97984	0,97679	0,98091	0,97843	0,98056	0,98056	0,97984	0,97679	0,97532	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844	0,97844
18S_Cm1381	0,92412	0,91659	0,90413	0,89454	0,91588	0,90504	0,90804	0,90879	0,90604	0,89218	0,90505	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342	0,90342
18S_Um1442	0,72844	0,75884	0,80413	0,80896	0,75618	0,68506	0,74064	0,67867	0,73528	0,74753	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402	0,79402
18S_Cm1447	0	0	0,02891	0,05674	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00963	0,01669	0,02158	0	0	0	0	0	0	0	0,35414	0,21132	0,21132	#DIV/0!
18S_Gm1490	0,98387	0,98387	0,95838	0,97025	0,96744	0,96707	0,98027	0,98193	0,98368	0,94928	0,97987	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664	0,98664
18S_Um1668	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18S_Am1678	0,96268	0,94604	0,97353	0,96056	0,97258	0,97069	0,98027	0,97917	0,97832	0,97741	0,97323	0,97836	0,97772	0,97577	0,97832	0,97741	0,97323	0,97836	0,97772	0,97577	0,97832	0,97741	0,97323	0,97836	0,97772	0,97577	0,97832	0,97741	0,97323	0,97836	0,97772
18S_Um1703	0,98077	0,97479	0,98052	0,97385	0,98092	0,97642	0,96491	0,96785	0,98122	0,98485	0,97055	0,97170	0,98302	0,96785	0,96706	0,96785	0,96785	0,96785	0,96785	0,96785	0,96785	0,96785	0,96785	0,96785	0,96785	0,96785	0,96785	0,96785	0,96785	0,96785	0,96785
18S_Um1804	0,95566	0,96136	0,95644	0,95409	0,95707	0,96067	0,96518	0,94330	0,95746	0,95933	0,94493	0,96009	0,94905	0,94057	0,95683	0,95782	0,95782	0,95782	0,95782	0,95782	0,95782	0,95782	0,95782	0,95782	0,95782	0,95782	0,95782	0,95782	0,95782	0,95782	0,95782

Table 8: MethScore SSU fraction monosome en réponse aux différents traitements

LSU 80S fraction

		NT			Dxeo					Tm				NT		Dxeo		Dxeo+cl recovery		Tm		Tm+cl recovery		p-value				p-value	
	site	NT 80s_R1	NT 80s_R2	NT 80s_R3	6h Dxe 80s_R1	6h Dxe 80s_R2	6h Dxe 80s_R3	30h Dxe 80s_R1	30h Dxe 80s_R2	30h Dxe 80s_R3	6h Tm 80s_R1	6h Tm 80s_R2	6h Tm 80s_R3	30h Tm 80s_R1	30h Tm 80s_R2	30h Tm 80s_R3	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Dxe6h vs Dxe 30h	p-value NT vs Dxe 30h	p-value NT vs Tm 30h	p-value NT Tm6h vs Tm 30h	p-value Dxe30h vs Tm30h
1	28S_Am389	0,96973962	0,9552572	0,9678688	0,88987085	0,9576497	0,97122302	0,97106242	0,95597428	0,96869075	0,95617021	0,95224767	0,96351781	0,96472088	0,93791452	0,94043579	0,96302866	0,00926895	0,94742523	0,00978588	0,93791452	0,94043579	0,96302866	0,00926895	0,94742523	0,00978588	0,00570021	0,24405952	0,00536074
2	28S_Am391	0,98685364	0,97984268	0,98136969	0,93855533	0,97556625	0,97345214	0,97489577	0,96958252	0,97395615	0,96956955	0,97555372	0,97439765	0,98130369	0,97499265	0,97943716	0,98136969	0,00279056	0,96958252	0,00373005	0,97499265	0,97943716	0,98136969	0,00279056	0,96958252	0,00373005	0,02838636	0,39814648	0,02271686
3	28S_Am393	0,51388889	0,47746445	0,56229508	0,48787788	0,52446285	0,55057353	0,44360056	0,46453718	0,48960302	0,48106075	0,49191944	0,49332766	0,49766195	0,50191453	0,50435611	0,45829841	0,03418398	0,50435611	0,01328349	0,45829841	0,03418398	0,50435611	0,01328349	0,45959133	0,02303021	0,04388298	0,17596019	0,02471906	0,02511526
4	28S_Am131C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
5	28S_Am1313	0,93494313	0,95479687	0,95462713	0,92388274	0,96076201	0,95940496	0,92934102	0,93423336	0,95976568	0,79395585	0,92716858	0,94563451	0,92531949	0,93999434	0,95115332	0,94812238	0,01141388	0,94801134	0,01688111	0,94389343	0,01414765	0,8907872	0,07954404	0,93882238	0,01295673	0,48871013	0,18858778	0,27237044
6	28S_Am1327	0,84625	0,85802016	0,86691127	0,88027246	0,86823237	0,88620019	0,88427556	0,85651594	0,86825504	0,85185174	0,80787083	0,84110766	0,86250557	0,87014732	0,87524856	0,86929049	0,00661161	0,87524856	0,00511496	0,86929049	0,00661161	0,87524856	0,00511496	0,88948084	0,01214066	0,38594771	0,09676643	0,04180397
7	28S_Am1506	0,87398974	0,87683789	0,87649061	0,87640556	0,87918964	0,88488496	0,87645056	0,87682729	0,85468419	0,85396157	0,87142963	0,87684599	0,87676488	0,87722538	0,87717831	0,87613924	0,00535039	0,83815768	0,02748149	0,87613924	0,00535039	0,83815768	0,02748149	0,86698708	0,01101481	0,31869479	0,09576189	0,03796189
8	28S_Am1521	0,92902047	0,98538516	0,98782788	0,98223443	0,98620961	0,98379065	0,98727272	0,98932226	0,98623534	0,98042534	0,98611294	0,98792356	0,98956746	0,98911294	0,98956746	0,98623534	0,00230416	0,98623534	0,00224952	0,98623534	0,00230416	0,98623534	0,00224952	0,98623534	0,00230416	0,01723238	0,41326671	0,33587937
9	28S_Am1512	0,98539534	0,98539974	0,98703139	0,98539534	0,98539974	0,98703139	0,98539534	0,98539974	0,98703139	0,98539534	0,98539974	0,98703139	0,98539534	0,98539974	0,98703139	0,98539534	0,00219737	0,98539534	0,00219737	0,98539534	0,00219737	0,98539534	0,00219737	0,98539534	0,00219737	0,01723238	0,41326671	0,33587937
10	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
11	28S_Am1858	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
12	28S_Am1868	0,93643225	0,92493086	0,93782398	0,91860316	0,92902117	0,92095908	0,91633987	0,92702117	0,92546599	0,86491885	0,84439118	0,85645052	0,85184175	0,80787083	0,84110766	0,86250557	0,02781172	0,87524856	0,03167628	0,88929049	0,03161605	0,85536075	0,02929256	0,88929049	0,00661161	0,12035548	0,00328247	0,05083656	0,06954165
13	28S_Am1956	0,98539086	0,98265131	0,98190415	0,98835361	0,98172726	0,98216543	0,98628281	0,98674033	0,98131493	0,97505734	0,98525584	0,98594768	0,98634057	0,98219071	0,98296504	0,98383057	0,00036213	0,98383057	0,00036785	0,98383057	0,00036213	0,98209859	0,00069764	0,98383057	0,00022073	0,17082308	0,16447058	0,17253932
14	28S_Am1521	0,92902047	0,98538516	0,98782788	0,98223443	0,98620961	0,98379065	0,98727272	0,98932226	0,98623534	0,98042534	0,98611294	0,98792356	0,98956746	0,98911294	0,98956746	0,98623534	0,00230416	0,98623534	0,00224952	0,98623534	0,00230416	0,98623534	0,00224952	0,98623534	0,00230416	0,01723238	0,41326671	0,33587937
15	28S_Am1512	0,92902047	0,98538516	0,98782788	0,98223443	0,98620961	0,98379065	0,98727272	0,98932226	0,98623534	0,98042534	0,98611294	0,98792356	0,98956746	0,98911294	0,98956746	0,98623534	0,00230416	0,98623534	0,00224952	0,98623534	0,00230416	0,98623534	0,00224952	0,98623534	0,00230416	0,01723238	0,41326671	0,33587937
16	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
17	28S_Am1858	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
18	28S_Am1868	0,93643225	0,92493086	0,93782398	0,91860316	0,92902117	0,92095908	0,91633987	0,92702117	0,92546599	0,86491885	0,84439118	0,85645052	0,85184175	0,80787083	0,84110766	0,86250557	0,02781172	0,87524856	0,03167628	0,88929049	0,03161605	0,85536075	0,02929256	0,88929049	0,00661161	0,12035548	0,00328247	0,05083656	0,06954165
19	28S_Am1956	0,98539086	0,98265131	0,98190415	0,98835361	0,98172726	0,98216543	0,98628281	0,98674033	0,98131493	0,97505734	0,98525584	0,98594768	0,98634057	0,98219071	0,98296504	0,98383057	0,00036213	0,98383057	0,00036785	0,98383057	0,00036213	0,98209859	0,00069764	0,98383057	0,00022073	0,17082308	0,16447058	0,17253932
20	28S_Am1512	0,92902047	0,98538516	0,98782788	0,98223443	0,98620961	0,98379065	0,98727272	0,98932226	0,98623534	0,98042534	0,98611294	0,98792356	0,98956746	0,98911294	0,98956746	0,98623534	0,00230416	0,98623534	0,00224952	0,98623534	0,00230416	0,98623534	0,00224952	0,98623534	0,00230416	0,01723238	0,41326671	0,33587937
21	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
22	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
23	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
24	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
25	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
26	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
27	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
28	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
29	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
30	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
31	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
32	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
33	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
34	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
35	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
36	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
37	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
38	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
39	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
40	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
41	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
42	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
43	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
44	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
45	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
46	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
47	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
48	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
49	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
50	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
51	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
52	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
53	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
54	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
55	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
56	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
57	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
58	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
59	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
60	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
61	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
62	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
63	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
64	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
65	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
66	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
67	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
68	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256	0,00485969	0,95696559	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98948084	0,01211496	0,38394772	0,09676643	0,04180397
69	28S_Am1762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
70	28S_Am1524	0,93793185	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,97978139	0,96082884	0,98360244	0,98235173	0,98205805	0,85818475	0,87841433	0,98106439	0,98824325	0,99786132	0,00419211	0,94410742	0,05704302	0,98601256

SSU polysomes fraction

site	NT	NT	NT	6h Dox	6h Dox	30h Dox	30h Dox	6h Tm	6h Tm	30h Tm	30h Tm	NT	Dox	Dox post-recovery	Tm	Tm post-recovery	p-value NT vs Dox 6h	p-value NT vs Dox 30h	p-value Dox6h vs Dox 30h	p-value NT vs Tm 6h	p-value NT vs Tm 30h	p-value Tm6h vs Tm 30h
	Polysomes_R1	Polysomes_R2	Polysomes_R3	Polysomes_R1	Polysomes_R2	Polysomes_R1	Polysomes_R2	Polysomes_R1	Polysomes_R2	Polysomes_R1	Polysomes_R2	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD								
18S_Am27	0,97795304	0,98585693	0,98204537	0,97872517	0,98152972	0,98485188	0,98568299	0,97883639	0,97888908	0,98283807	0,9775226	0,98271277	0,97959704	0,97911909	0,98390636	0,98123223	0,00292941	0,98171225	0,00305388	0,97923949	0,00313698	0,98102448	0,00303336	0,98087436	0,00263681	0,39185098	0,16586706	0,19930498	0,36931161	0,30880222	0,46578751
18S_Am99	0,93868976	0,93818234	0,94428847	0,93379523	0,94314178	0,93566106	0,93773635	0,94977863	0,94134027	0,93302796	0,94521175	0,93726058	0,93923219	0,94140903	0,93785194	0,94400824	0,00550147	0,93851549	0,00561812	0,93589621	0,02164804	0,92352284	0,04179326	0,0185159
18S_Um116	0,98659807	0,98260918	0,88001142	0,85990647	0,87731406	0,85162602	0,87703125	0,98614123	0,98533776	0,86737053	0,88573564	0,87516207	0,88917655	0,89776405	0,88629581	0,87536086	0,01081812	0,87753808	0,01115142	0,1015812	0,19070102	0,47329584	0,24563409	0,4229374	0,33784512
18S_Am159	0,92688437	0,9405672	0,92602774	0,89483883	0,92952898	0,9053297	0,92256871	0,93218946	0,93280787	0,90563978	0,92946824	0,93048628	0,94327539	0,93128118	0,94129402	0,91564558	0,01835237	0,91374951	0,01197007	0,92215768	0,01431383	0,92885775	0,01528675	0,01058381	0,02952189	0,04603545	0,27956578	0,35723221	0,33904371
18S_Am166	0,97994987	0,98549121	0,98107879	0,96240619	0,97735882	0,96481584	0,97735195	0,98818549	0,98719868	0,96826616	0,98519968	0,98455184	0,98915991	0,98839052	0,98968273	0,98631681	0,00350198	0,98227396	0,00301448	0,98197107	0,00242769	0,98361134	0,00306883	0,98413872	0,0015693	0,98226626	0,0017414	0,45516398	0,27238661	0,12438138	0,23304112	0,49329398	0,0131517
18S_Um172	0,93782261	0,89946519	0,92735882	0,88485184	0,88114811	0,8714025	0,88518649	0,94858976	0,94826616	0,88519868	0,88457188	0,88845401	0,89140437	0,89481033	0,88969117	0,89255037	0,01220202	0,87250082	0,00853313	0,88641694	0,0093278	0,87883417	0,00895161	0,0071591	0,00832979	0,07695881	0,39811571	0,11723102	0,15289473
18S_Um174	0	0,67475728	0,62268569	0,59235756	0,59383588	0,54484733	0,57837274	0,72684419	0,71724239	0,67173425	0,74071705	0,64103555	0,7263192	0,64148652	0,65551612	0,63245434	0,0754231	0,65119386	0,1021118	0,53298944	0,1270989	0,6333117	0,04285794	0,6744328	0,0455542	0,39596725	0,26848862	0,29107407	0,42339832	0,2121785	0,00422885
18S_Um194	0,94870373	0,96897802	0,97138401	0,97152111	0,97334828	0,97178355	0,97366467	0,96866407	0,96850535	0,97124847	0,97355157	0,97068191	0,97252787	0,97358519	0,97068191	0,97252787	0,00092468	0,97358519	0,00092468	0,97252787	0,00092468	0,97358519	0,00092468	0,97252787	0,00092468	0,97358519	0,00092468	0,24305045	0,13898027	0,24305045	0,13898027	0,24305045	0,13898027	0,24305045
18S_Um196	0,93181961	0,93083831	0,93118503	0,92023876	0,88944528	0,88779103	0,88928715	0,92148541	0,92866893	0,89562003	0,91726041	0,91103232	0,90704345	0,90552161	0,89655093	0,90704345	0,00552161	0,89655093	0,00552161	0,90704345	0,00552161	0,89655093	0,00552161	0,90704345	0,00552161	0,89655093	0,00552161	0,14089869	0,08148171	0,14089869	0,08148171	0,14089869	0,08148171	0,14089869
18S_Gm144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
18S_Gm149c	0,97524315	0,96424411	0,98329374	0,93873078	0,97202554	0,94568108	0,96827604	0,98675742	0,98036006	0,96827461	0,97629443	0,98096040	0,97873548	0,98046466	0,00052147	0,98096040	0,00052147	0,98096040	0,00052147	0,98096040	0,00052147	0,98096040	0,00052147	0,98096040	0,00052147	0,98096040	0,00052147	0,45439201	0,18758496	0,24078161	0,43866585
18S_Um166	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
18S_Am167	0,95752753	0,9511254	0,95513178	0,95172227	0,94561787	0,95056095	0,95789883	0,94780302	0,94610573	0,94612271	0,94713895	0,95258757	0,94104394	0,94981704	0,95658213	0,95350978	0,00383828	0,95890987	0,00667158	0,95559319	0,00573149	0,95451851	0,00571469	0,95822126	0,00596563	0,95599519	0,00573149	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
18S_Gm644	0,93821186	0,93741685	0,93211402	0,92412935	0,93227284	0,90432034	0,92982213	0,93824728	0,93432428	0,92382407	0,93300482	0,93047695	0,93130905	0,93230995	0,93230995	0,93230995	0,00072351	0,93230995	0,00072351	0,93230995	0,00072351	0,93230995	0,00072351	0,93230995	0,00072351	0,93230995	0,00072351	0,93230995	0,00072351	0,93230995	0,00072351	0,93230995	0,00072351	0,93230995	0,00072351
18S_Am168	0,93417193	0,94041378	0,95206013	0,9463732	0,95424424	0,94482388	0,95723722	0,95257316	0,95418795	0,95259442	0,94845735	0,95353832	0,94211344	0,95209956	0,9565734	0,95319728	0,00672047	0,94961277	0,00911554	0,95470444	0,00204401	0,95166513	0,00237927	0,95192088	0,00950042	0,95790629	0,00205587	0,15043283	0,40091875	0,85321174	0,84888978
18S_Gm683	0,93127913	0,88361683	0,90696676	0,88771842	0,91404011	0,91614256	0,88571429	0,93209323	0,90818327	0,90656727	0,89753367	0,92393232	0,88872418	0,91340176	0,88902946	0,90218724	0,01618961	0,90924357	0,02191436	0,90495693	0,01785669	0,90990429	0,01351325	0,87424847	0,0844922	0,94915751	0,04483781	0,34056233	0,22156737	0,05919786	0,08166446
18S_Cm797	0,88847408	0,89560575	0,89684794	0,85599007	0,8887876	0,86204028	0,88805794	0,85885519	0,8405868	0,86650901	0,86155748	0,88450059	0,83931734	0,87887839	0,86791026	0,87410092	0,0194714	0,88439325	0,01799326	0,88241331	0,00236478	0,87137413	0,01182783	0,88873538	0,00985646	0,01378404	0,01823125	0,00422672	0,27614439	0,11327635	0,24881122	0,13077774	0,33159018
18S_Um799	0,93697267	0,90178027	0,88415911	0,87592586	0,88605287	0,87034108	0,89687375	0,88170055	0,88563252	0,86601077	0,89969981	0,89209706	0,87311498	0,88656186	0,88909743	0,89855292	0,01306513	0,87713904	0,00806641	0,88963554	0,00868057	0,88339806	0,01201314	0,89169115	0,00718515	0,89748487	0,01177632	0,88854588	0,01249927	0,11467	0,02928759	0,35777858	0,01526875	0,01063284	0,07857	0,02453138
18S_Gm867	0,67727562	0,79522079	0,68026352	0,68679632	0,74298746	0,68110579	0,68246129	0,54525792	0,78150931	0,69329887	0,72424398	0,78932192	0,75868654	0,67590405	0,68736664	0,01534452	0,70363006	0,69420308	0,06424723	0,06694741	0,07331742	0,00447584	0,71526817	0,03896899	0,14354573	0,17539634	0,01165511	0,15414973	0,10561473	0,33503895
18S_Am1031	0,97523047	0,97123598	0,97159033	0,95464611	0,97208803	0,96874805	0,96834625	0,95464832	0,96848337	0,96758883	0,97659862	0,97394429	0,97358556	0,96519207	0,97380252	0,96653203	0,00219323	0,96649406	0,00377245	0,96691615	0,00186515	0,97482216	0,00183894	0,96917754	0,00577811	0,16813185	0,011466	0,33393355	0,00848677	0,34764089	0,14829295
18S_Cm1272	0,92680633	0,93771389	0,93771389	0,91951058	0,91435789	0,92652585	0,91882879	0,91286392	0,92706984	0,90693954	0,92366122	0,9251793	0,92380119	0,91172414	0,92732186	0,91090059	0,00620933	0,92923987	0,0617947	0,91572944	0,00325992	0,92028286	0,0093767	0,91896155	0,00587201	0,91766921	0,02877952	0,01078649	0,30189113	0,1186818	0,48693987
18S_Um128	0,88986928	0,92520715	0,93144114	0,88364476	0,91159886	0,90349684	0,88825895	0,90698667	0,89469945	0,88847528	0,91294678	0,88917759	0,89051331	0,91218015	0,89053703	0,90684991	0,88949487	0,91177632	0,88854589	0,91024997	0,11467	0,02928759	0,3577858	0,01526869	0,21556063	0,16043247
18S_Um134	0,93673737	0,93798232	0,93678152	0,90627367	0,93751357	0,92952784	0,93736592	0,93723973	0,93502324	0,9353205	0,93502075	0,93165968	0,92483316	0,93397739	0,93397739	0,93397739	0,00000371	0,93402814	0,00000371	0,93402814	0,00000371	0,93402814	0,00000371	0,93402814	0,00000371	0,93402814	0,00000371	0,93402814	0,00000371	0,93402814	0,00000371	0,93402814	0,00000371	0,93402814	0,00000371
18S_Um141	0,93033851	0,94083317	0,91116503	0,90023876	0,88944528	0,88779103	0,88928715	0,92148541	0,92866893	0,89562003	0,91726041	0,91103232	0,90704345	0,90552161	0,89655093	0,90704345	0,00552161	0,89655093	0,00552161	0,90704345	0,00552161	0,89655093	0,00552161	0,90704345	0,00552161	0,89655093	0,00552161	0,14089869	0,08148171	0,14089869	0,08148171	0,14089869	0,08148171	0,14089869
18S_Um144	0,97511984	0,97487224	0,97667969	0,97012177	0,96901708	0,97235477	0,97667969	0,97012177	0,96901708	0,97235477	0,97667969	0,97012177	0,96901708	0,97235477	0,97667969	0,97012177	0,00552161	0,97235477	0,00552161	0,97667969	0,00552161	0,97012177	0,00552161	0,96901708	0,00552161	0,97235477	0,00552161	0,97667969	0,00552161	0,97012177	0,00552161	0,96901708	0,00552161	0,97235477	0,00552161
18S_Um180	0,93925074	0,95683841	0,96178148	0,9381443	0,95750706	0,95580498	0,95484547	0,93792242	0,95864662	0,953958	0,93920611	0,94839617	0,95750972	0,95805561	0,00134408	0,95684234	0,00352403	0,94261311	0,01060984	0,92662988	0,01188662	0,23953115	0,27351702

LSU polysomes fraction

site	NT	NT	NT	6h Dox	6h Dox	6h Dox	30h Dox	30h Dox	30h Dox	6h Tm	6h Tm	6h Tm	30h Tm	30h Tm	30h Tm	NT	NT	Dox	Dox	Tm	Tm	p-value	p-value	p-value	p-value
	Polysomes_R1	Polysomes_R2	Polysomes_R3	Polysomes_R1	Polysomes_R2	Polysomes_R3	Polysomes_R1	Polysomes_R2	Polysomes_R3	Polysomes_R1	Polysomes_R2	Polysomes_R3	Polysomes_R1	Polysomes_R2	Polysomes_R3	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Dox6h vs Dox 30h	Dox6h vs NT	Dox 30h vs NT	Tm6h vs Tm 30h
28S_Am389	0.954838671	0.972752525	0.902066645	0.95871771	0.950594688	0.950547749	0.960670706	0.960413966	0.966839446	0.966834407	0.955424306	0.95599949	0.9546183	0.957045398	0.956127437	0.960960414	0.015597832	0.951076832	0.009778	0.957684	0.004429296	0.033165936	0.372033171	0.159633205	0.297425903
28S_Am391	0.937737882	0.98553557	0.938153116	0.975919995	0.984	0.969577371	0.970594436	0.977786682	0.976514001	0.978770412	0.981039369	0.979191187	0.985744409	0.978534254	0.984153516	0.979636133	0.003772	0.980418872	0.004088619	0.97098769	0.975111173	0.003656338	0.979663233	0.001152626	0.982879394	0.004602033	0.007165148	0.022174811	0.963932497	0.159406589
28S_Am393	0.945638171	0.97752525	0.902066645	0.95871771	0.950594688	0.950547749	0.960670706	0.960413966	0.966839446	0.966834407	0.955424306	0.95599949	0.9546183	0.957045398	0.956127437	0.960960414	0.015597832	0.951076832	0.009778	0.957684	0.004429296	0.033165936	0.372033171	0.159633205	0.297425903
28S_Am394	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
28S_Am1316	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
28S_Am1313	0.932934797	0.95195381	0.944193114	0.964643869	0.931921861	0.930967779	0.934643369	0.938654446	0.939671255	0.938354144	0.939671255	0.938354144	0.939671255	0.938354144	0.939671255	0.938354144	0.000000	0.938354144	0.000000	0.938354144	0.000000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
28S_Am1327	0.877486819	0.873686819	0.825466775	0.883254044	0.857791925	0.856954564	0.884629181	0.884504187	0.886211672	0.885899511	0.885899511	0.885899511	0.885899511	0.885899511	0.885899511	0.885899511	0.000000	0.885899511	0.000000	0.885899511	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1506	0.875056655	0.870796651	0.862319372	0.884529485	0.868929723	0.867229466	0.885018863	0.883778248	0.885018863	0.885018863	0.885018863	0.885018863	0.885018863	0.885018863	0.885018863	0.885018863	0.000000	0.885018863	0.000000	0.885018863	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1511	0.937304684	0.975254551	0.937432486	0.989243588	0.976004772	0.976004772	0.981722329	0.980687128	0.981722329	0.981722329	0.981722329	0.981722329	0.981722329	0.981722329	0.981722329	0.981722329	0.000000	0.981722329	0.000000	0.981722329	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1521	0.938352709	0.938357996	0.938953929	0.947045751	0.938468469	0.939145708	0.939478428	0.939478428	0.939478428	0.939478428	0.939478428	0.939478428	0.939478428	0.939478428	0.939478428	0.939478428	0.000000	0.939478428	0.000000	0.939478428	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1612	0.938425834	0.938437372	0.938439891	0.938517188	0.938507307	0.938528436	0.938529436	0.938529436	0.938529436	0.938529436	0.938529436	0.938529436	0.938529436	0.938529436	0.938529436	0.938529436	0.000000	0.938529436	0.000000	0.938529436	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1747	0.938947787	0.939147357	0.938948069	0.939154731	0.938947787	0.938947787	0.938947787	0.938947787	0.938947787	0.938947787	0.938947787	0.938947787	0.938947787	0.938947787	0.938947787	0.938947787	0.000000	0.938947787	0.000000	0.938947787	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1856	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.939273844	0.000000	0.939273844	0.000000	0.939273844	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1860	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.939400861	0.000000	0.939400861	0.000000	0.939400861	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1871	0.939433469	0.939436305	0.939436305	0.939436305	0.939436305	0.939436305	0.939436305	0.939436305	0.939436305	0.939436305	0.939436305	0.939436305	0.939436305	0.939436305	0.939436305	0.939436305	0.000000	0.939436305	0.000000	0.939436305	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1872	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.939441369	0.000000	0.939441369	0.000000	0.939441369	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1956	0.939473475	0.939484969	0.939482105	0.939470269	0.939509418	0.939509418	0.939509418	0.939509418	0.939509418	0.939509418	0.939509418	0.939509418	0.939509418	0.939509418	0.939509418	0.939509418	0.000000	0.939509418	0.000000	0.939509418	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1957	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1958	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1959	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1960	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1961	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1962	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1963	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1964	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1965	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1966	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1967	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1968	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1969	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1970	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1971	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1972	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1973	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1974	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1975	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1976	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1977	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1978	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1979	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1980	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1981	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1982	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1983	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1984	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1985	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1986	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1987	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1988	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1989	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1990	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1991	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1992	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1993	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1994	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1995	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1996	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1997	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1998	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am1999	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2000	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2001	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2002	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2003	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2004	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2005	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2006	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2007	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2008	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2009	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2010	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2011	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2012	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2013	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2014	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2015	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.939509565	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
28S_Am2016	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509565	0.939509

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Review

Circular RNA, the Key for Translation

Anne-Catherine Prats *, Florian David, Leila H. Diallo, Emilie Roussel, Florence Tatin, Barbara Garmy-Susini and Eric Lacazette

Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, UMR 1048, Inserm, Université de Toulouse UT3, 1, Avenue Jean Poulhes, BP 84225, 31432 Toulouse CEDEX 4, France; florian.david@inserm.fr (F.D.); leila.diallo@inserm.fr (L.H.D.); emilie.roussel@inserm.fr (E.R.); florence.tatin@inserm.fr (F.T.); barbara.garmy-susini@inserm.fr (B.G.-S.); eric.lacazette@inserm.fr (E.L.)
* Correspondence: anne-catherine.prats@inserm.fr

Received: 2 October 2020; Accepted: 12 November 2020; Published: 14 November 2020



Abstract: It was thought until the 1990s that the eukaryotic translation machinery was unable to translate a circular RNA. However internal ribosome entry sites (IRESs) and m^{6}A-induced ribosome engagement sites (MIRESs) were discovered, promoting 5′ end-independent translation initiation. Today a new family of so-called "noncoding" circular RNAs (circRNAs) has emerged, revealing the pivotal role of 5′ end-independent translation. CircRNAs have a strong impact on translational control via their sponge function, and form a new mRNA family as they are translated into proteins with pathophysiological roles. While there is no more doubt about translation of covalently closed circRNA, the linearity of canonical mRNA is only theoretical: it has been shown for more than thirty years that polysomes exhibit a circular form and mRNA functional circularization has been demonstrated in the 1990s by the interaction of initiation factor eIF4G with poly(A) binding protein. More recently, additional mechanisms of 3′–5′ interaction have been reported, including m^{6}A modification. Functional circularization enhances translation via ribosome recycling and acceleration of the translation initiation rate. This update of covalently and noncovalently closed circular mRNA translation landscape shows that RNA with circular shape might be the rule for translation with an important impact on disease development and biotechnological applications.

Keywords: translation; ribosome; circRNA; RNA circularization; IRES; m^{6}A; MIRES; 3′UTR

1. Introduction

The potential of circular RNA to be translated has been studied since the 1970s. In 1979, an experiment was designed to determine the ability of circular mRNA to attach ribosomes [1]. A synthetic RNA was circularized with T4 RNA ligase and the binding of bacterial 70S ribosomes versus wheat or rabbit 80S ribosomes was assessed, showing that only the prokaryotic ribosomes were able to attach to RNA circles while the eukaryotic ribosomes were not. This demonstration supported the hypothesis of a ribosome scanning mechanism depending on the RNA 5′ end to explain initiation of translation in eukaryotes. According to this model, the 40S ribosome small subunit was expected to be recruited only at the mRNA capped 5′ end [2]. Consequently it was thought that eukaryotic ribosomes were unable to initiate translation by internal entry, rendering impossible the translation of circular RNA.

Ten years later, the discovery of translation initiation mediated by internal ribosome entry sites (IRESs) broke the rule [3–5]. Furthermore, the presumed inability of eukaryotic ribosome to bind circular RNA was contradicted in 1995: artificial circular RNA containing an IRES was generated [6]. The authors observed a significant translation of circular RNAs containing the IRES of encephalomyocarditis virus (EMCV). This work definitely demonstrated two main points in contrast

with earlier suggestions (i) the 40S ribosomal subunit is not necessarily recruited at the mRNA 5′ end but can be recruited internally onto an IRES, and (ii) a circular RNA can be translated.

Despite these demonstrations, IRES function in cellular mRNAs remained questioned for a long time, although obvious in the case of picornaviruses whose genomic mRNAs are uncapped [7,8]. From here on many studies have demonstrated the role of IRESs to permit translation of specific classes of capped mRNAs when the cap-dependent initiation mechanism is blocked, which occurs during stress [7,9]. The IRES-dependent mechanism has now revealed its crucial role in the translational response to stress and is regulated by specific proteins called IRES trans-acting factors (ITAF) [3]. IRESs are also responsible for an increased translation of these mRNAs in cancer cells, a process related to abnormal rRNA modifications [10]. Covalently closed RNA circles resulting from splicing were identified at the beginning of the 1990s and were first considered as aberrant splicing products [11,12]. More than 20 years later it appears that hundreds of human and animal genes express circular RNA isoforms called circRNAs [13]. They are post-transcriptional regulators and in several cases they are translated, mostly via IRESs [14]. Translation of cellular circRNAs thus provides full physiological relevance to IRES-dependent translation.

CircRNAs may also be translated by another cap-independent mechanism mediated by the methylation of the nitrogen at position 6 in the adenosine base within mRNA, N^6-methyladenosine (m^6A) [14,15]. M^6A is a reversible epitranscriptomic modification found in many eukaryotic mRNAs [9]. When present in the 5′ untranslated region (5′UTR), a single m^6A promotes cap-independent translation at sites called "m^6A-induced ribosome engagement sites" (MIRESs) [16]. As IRESs, MIRESs stimulate selective mRNA translation in stress conditions by a mechanism involving direct binding of the initiation factor eIF3. Translation of circRNAs definitively put an end to the debate about 5′ end requirement and IRES existence in cellular mRNAs [8,17]. CircRNAs form a new class of mRNAs whose stability is far more important than that of their linear counterpart.

In parallel to the studies on covalently closed circular (CCC) RNA, a series of reports have shown that translation involves the functional circularization of mRNA. Already in the 1980s circular polysomes were observed by electron microscopy [18]. It was demonstrated a few years later that the mRNA 3′ untranslated region (UTR) is functionally interacting with the 5′UTR via the interaction of PABP with eIF4G [19,20]. The model of functional circularization involving eIF4G as a ribosome adapter was quickly adopted [21,22]. This mechanism involves both cap-dependent and cap-independent translation, as eIF4G can bind to the mRNA via IRESs independently of the cap-binding factor eIF4E [23]. The closed-loop phenomenon promotes ribosome recycling and thus enhances translation. Functional circularization of mRNAs occurs through several mechanisms in addition to interaction of PABP with eIF4G and appears as a pivotal parameter.

Can we still consider an mRNA as linear? That is the question. This review article aims to propose an update of the data on covalently as well as noncovalently closed circular mRNA translation, as the landscape in the field has strongly evolved in the last years.

2. Circular RNAs, from the Artefact to a New Gene Family

The first RNA circles were observed in 1976 by electron microscopy in viroids (plant pathogens), then in 1979 in human HeLa cell cytoplasm [24,25]. More than 10 years later in the 1990s the existence of such circles was confirmed and attributed to a scrambled splicing process, using the acceptor site of an exon located upstream of the donor splice sites [11,12]. The authors described the first cases of circular RNA generated from pre-mRNA processing, but the biological significance of such RNA molecules remained questioned. Today we know that these studies described what is presently called backsplicing [14].

Shortly after, a circular transcript was identified after RNase H digestion of RNAs extracted from adult mouse testis as the most abundant transcript expressed from the *Sry* sex determination gene [26]. This transcript specific to adult testis shows a cytoplasmic localization and a strong stability despite the absence of cap and poly(A). The stability of RNA circles was not a surprise as they do not give access

to exoribonucleases. Such a stability had been observed previously for the circular RNA genome of the hepatitis delta virus, as well as for plant viroids and virusoids [27,28]. A long open reading frame (ORF) was detected in the *Sry* circular RNA. The authors made the assumption that it could have either a positive role by being translated by internal ribosome entry or a negative role as a noncoding RNA by preventing efficient translation [26]. When suggesting a link with translation, the authors were in the right direction: twenty years later *Sry* circRNA has been shown to function as a sponge for the microRNA miR-138 with 16 putative sites for that miRNA [29]. *Sry* circRNA thus indirectly acts on translation by preventing translational inhibition of miR-138 targets involved in activation of tumor cell growth and invasion [30].

In the last decade, the emergence of RNA deep sequencing technologies and of sharp bioinformatics analyses has generated a major leap forward in the field of circRNAs. The abundance of the circular transcript observed for *Sry* in 1993 turned out to be a general feature for thousands of genes in human and mouse tissue and in various cell types [13,31]. RNA-seq analyses revealed that many scrambled splicing isoforms are expressed at levels comparable to that of their linear counterparts. The circular status of these scrambled isoforms was demonstrated using RNase R, a 3′–5′ exoribonuclease that degrades all linear RNA molecules. Most circRNAs are located in the cytoplasm. The expanded landscapes of circRNAs have been determined by RNA-Seq in 44 tissues of human, macaque and mouse, revealing 104,388, 96,675 and 82,321 circRNAs from the three species respectively [32]. Initially considered as splicing background noise, circRNAs constitute according to the current studies 20% of the top 1000 most abundant transcripts in human and macaque tissues while only 8% in mouse tissue. In human tissue, 61% of the coding genes express at least one circular transcript. All these reports demonstrate that expression of circRNAs is far from being an epiphenomenon.

CircRNAs exhibit different modes of action, depending on their composition which itself affects their localization. CircRNAs that contain intronic (called ciRNAs) or intronic plus exonic sequences (EIciRNAs) are nuclear and mainly regulate the expression of their parental gene. EIciRNAs have been shown to interact with RNA polymerase II subunits, with U1 snRNP and with the parental gene promoter where they behave as transcriptional enhancers [33]. Another study has shown that circRNA expression can influence the splicing of the parental gene by competing with canonical splicing [34]. The third class of circRNAs, composed of exonic sequences exclusively (ecRNAs), are cytoplasmic and act via two types of mechanisms: on the one hand they act by sponging miRNAs or RNA binding proteins (RBPs), on the other hand they can be translated [14,35].

3. circRNAs as Translational Activators or Repressors through Sponge and Protein Carrier Functions

In parallel to the discovery of thousands of circRNAs expressed in mammalian cells, it has been established in 2013 that natural RNA circles exhibit the function of miRNA sponges: as mentioned above, *Sry* circRNA is a sponge for miR-138 [29]. Another report characterized the sponge function of circular transcript ciRS-7 (circular sponge for miR-7 also known as CDR1as) that is highly expressed in human and mouse brain tissue [31]. CiRS-7 has more than 70 binding sites for miR-7 and is associated in an miR-7-dependent manner with Argonaute 2 protein (AGO2), a pivotal component of the RNA-induced silencing complex (RISC). Therefore ciRS-7 is able to block the miR-7 silencing activity on its mRNA targets while being completely resistant to miRNA-mediated target destabilization. This observation revealed that circRNAs are more stable than linear RNAs and that their sponge role is more efficient than that of other long noncoding RNAs. Today this miRNA sponge role has been generalized to several dozens of circRNAs, providing them with a strong impact on epigenetic/epitranscriptomic regulation of gene expression with important consequences in the control of cell proliferation and development of pathologies [36]. The primordial function of miRNAs is the inhibition of cap-dependent mRNA translation: the miRNA machinery RNA induced silencing complex (RISC), after binding to mRNA 3′UTR, interacts with the cap-binding complex and blocks the cap-recognition process [37,38]. Several IRESs are also sensitive to miR-dependent inhibition of translation, as shown for one of the two

vascular endothelial growth factor A (VEGFA) IRESs that is regulated by miR-16 [39]. By preventing miR-controlled mechanisms, circRNAs behave as translational activators.

In addition to being miRNA sponges, circRNAs are also sponges for RBPs. This has been shown for Foxo3 circular RNA that forms a ternary complex with cell division protein kinase 2 (CDK2) and its inhibitor p21, which blocks the CDK2 function and arrests cell cycle progression [40]. RBP sponges also impact translation when the bound RBP is involved in translational control. This is the case for circPABPN1 that interacts with the protein HuR, a translational activator of the poly(A)-binding protein nuclear 1 (PABPN1) mRNA [41]. CircPABPN1 thus lowers PABPN1 mRNA translation. This phenomenon may be generalized to other circRNAs, as HuR associates with many of them and is involved in the control of translation and stability of many mRNAs. Recently, interaction between HuR and circPABPN1 has been shown to decrease the translation of the autophagy-related gene 16L1 (ATG16L1) mRNA whose translation is activated by HuR binding to its 3'UTR in the intestinal epithelium [42]. Also the circRNA BACH1, a circRNA highly expressed in hepatocellular carcinoma (HCC), inhibits the translation of $p27^{kip}$ mRNA by facilitating HuR translocation to the cytoplasm. As HuR is a negative ITAF able to inactivate the $p27^{kip}$ mRNA IRES, its presence in the cytoplasm would promote silencing of $p27^{kip}$ mRNA translation and prevent cell cycle inhibition by $p27^{kip}$ [43,44]. Here the circRNA plays a role of carrier rather than sponge. A third circRNA mode of action has been identified for circMALAT, expressed in cancer stem cells from hepatocellular carcinoma [45]. In addition to being an miR-6886-3p sponge that enhances JAK2/STAT3 signaling, circMALAT binds to both ribosome and PAX5 mRNA and thereby directly inhibits PAX5 mRNA translation by a braking mechanism. With these different mechanisms of sponge, protein carrier or translational brake, circRNAs have a strong impact on translational control as regulatory noncoding RNAs.

4. circRNAs, a Novel Class of mRNAs Mainly Translated by the IRES-Dependent Mechanism

We have seen above that circRNAs have a strong impact on translation as noncoding RNAs. However they can no longer be considered as noncoding RNAs due to the growing evidence that many of them are translated. In spite of the continuous controversy about the ability of cellular mRNAs to be translated independently of their 5′ end, the first demonstration of translation of a natural circular RNA was provided in 2014 for the covalently closed circle (CCC) 220 nt-length RNA of the virusoid associated with rice yellow mottle virus (RYMV) [8,46]. The CCC RNA translated in a wheat germ extract system produced a polypeptide of 16 kDa that was identified by LC-MS/MS analysis in total proteins from RYMV-infected rice. Larger proteins were also identified resulting from continuous synthesis around the circular RNA (Figure 1).

The absolute proof of translation of cellular circRNAs was provided in 2017 by Pamudurti et al. [17]. From ribosome footprinting (RFP) datasets, these authors identified sequencing reads spanning the backsplice junction (i.e., noncolinear splicing junctions) that is circRNA signature. They found 151 circRNAs associated to polysomes in Drosophila while 34 and 158 circ-RNAs presented RFP reads in rat and mouse tissue, respectively. These so-called ribo-circRNAs show a strong bias towards 5′UTR and 40% of them are predicted to share the start codon with the parental gene. The authors focused on the fly *muscleblind* (mbl) locus that produces several highly expressed circRNAs and identified by mass spectrometry (MS) a 37kDa peptide produced by the circRNA CircMbl3. Furthermore, they identified IRESs in several circRNAs (circMbl, circCdi, circPde8 and circTai) by using the well-known bicistronic vector strategy and by measuring their resistance to 4E-BP overexpression (which inhibits cap-dependent translation) [3,5,17]. This study provided multiple lines of evidence supporting circRNA translation by the IRES-dependent mechanism, thus confirming the initial data of Chen and Sarnow in 1995 with an artificial circRNA [6] (Figure 1A, left panel). Interestingly, Padumurti et al. suggested that circRNA translation may be particularly important for the control of synaptic function in the brain as MBL proteins (and their human orthologs MBLN) are involved in neuromuscular pathologies [47].

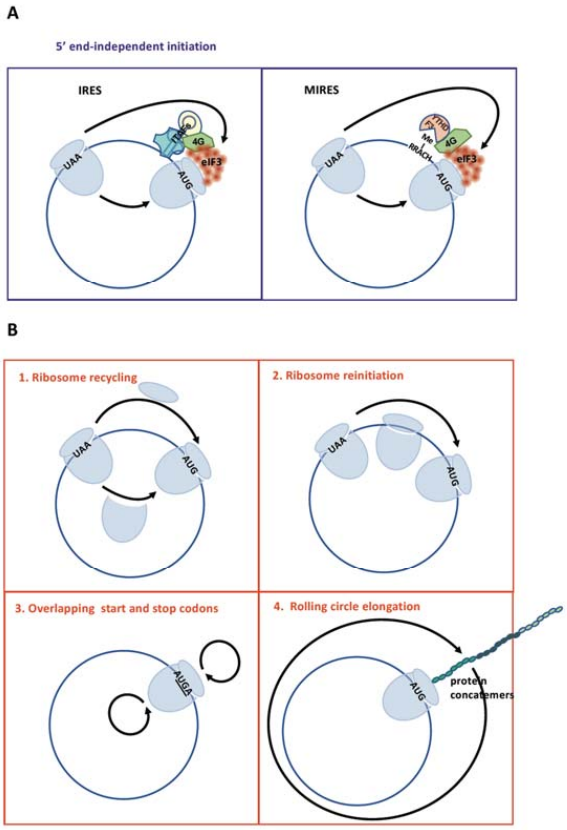


Figure 1. Translation of circular RNAs (circRNAs)**.** (**A**). Translation initiation on circRNAs by internal ribosome entry sites (IRESs) (**left**) and m^6A-induced ribosome engagement sites (MIRESs) (**right**) is schematized with the main proteins involved in the complexes. Details are provided in the text (Sections 4 and 5). (**B**). Mechanisms of translation elongation on circRNAs: even though 5′ end-independent initiation may be less efficient than cap-dependent initiation, translation efficiency is enhanced through ribosome recycling (**1**), reinitiation (**2**), overlapping start and stop codons (**3**) or rolling-circle elongation (**4**). Details are provided in the text (Section 9).

In the same issue, Legnini et al. identified the translation of another circRNA, circ-ZNF609, expressed in murine and human myoblasts [48]. A global change of circRNA expression was observed during myoblast differentiation, and myoblasts from Duchenne muscular dystrophy (DMD) patients exhibited a unique signature in terms of circRNA expression levels. The circular/linear ratio tends to increase with myoblast differentiation, a feature probably linked to the high stability of circRNAs. An RNAi-based circRNA functional screening allowed these authors to target 25 circRNAs, revealing the important role of circ-ZNF609 in myoblast differentiation. Circ-ZNF609 is downregulated during myogenesis but remains strongly expressed in DMD cells. This circRNA contains a 753-nt-long ORF whose translation initiation is controlled by an IRES and it sediments with heavy polysomes both in human and mouse tissue. By tagging the endogenous circRNA with the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/Cas9 technology, Legnini et al. were able to detect the circ-ZNF609 protein product by mass spectrometry. They identified an IRES in the circ-ZNF609 UTR that was significantly more efficient than that of EMCV IRES used as a positive control in these muscular

cells. Strikingly, the ZNF609 IRES activity requires the presence of the original splice junction of circ-ZNF609 [48].

Following these two pioneer articles several additional studies have identified proteins expressed by circRNAs. Translation initiation always depends on IRESs, identified by the systematic use of bicistronic vectors. Zhang et al. revealed the existence of the circRNA circ-SHPRH whose expression is repressed in glioblastoma [49]. Circ-SHPRH expresses an isoform of histone-linker PHD and RING finger domain-containing helicase (SHPRH), the 17 kDa protein SHPRH-144aa, which has a role in tumor suppression. Interestingly, translation of this latter circRNA uses overlapping initiation and termination codons (Figure 1B, panel 3). The same laboratory also identified the circRNAs circFPXW7 and circPINTexon2 (circular form of the long intergenic non-protein-coding RNA p53-induced transcript LINC-PINT). Translation of these circRNAs produces peptides of 10 kDa and 26 kDa, respectively, which both suppress glioblastoma cell proliferation [50,51]).

A fourth coding circRNA, circβ-catenin, has been characterized in human cells and tissues [52]. It is overexpressed in cancer cell lines and its knockdown drastically attenuates liver cancer cell growth and metastasis. Here again the mechanism of translation initiation is IRES-dependent. Circβ-catenin produces β-catenin-370aa, a new β-catenin isoform of 50 kDa identified by mass spectrometry whose role is to protect β-catenin from ubiquitination and degradation mediated by the kinase GS3Kβ. The β-catenin-370aa potentiates the Wnt/β-catenin signaling pathway. These different examples clearly show the importance of IRES-dependent translation to initiate protein synthesis from circRNAs.

5. MIRES, an Alternative Mechanism for Ribosome Recruitment on circRNAs

All circRNAs characterized above for translation contain an IRES. However an alternative to IRESs is provided by m^6A-based ribosome entry sites, called MIRES [16]. Supporting that hypothesis, MIRES-dependent circRNA translation has been obtained using an artificial green fluorescent protein (GFP)-circRNA [15]. The authors observed that circGFP is translated using different known IRESs, but also with the negative controls. Interestingly all their negative controls contained the RRACH consensus motif of m^6A modification close to the start codon (R = purine, H = pyrimidine or A), suggesting MIRES-dependent initiation (Figure 1A, right panel). It was also observed that m^6A-predicted motifs are significantly enriched in circRNAs compared to linear mRNAs, consistent with data from m^6A RNA immunoprecipitation (m^6A-RIP) identifying a higher density of m^6A sites in the m^6A methylome [15,53]. Yang et al. finally showed that one or two m^6A sites present in the GFP circRNA are sufficient to promote reporter gene expression and that this translation is sensitive to the overexpression of the methylases METTL3/14 or of the fat mass and obesity-associated protein (FTO) demethylase. m^6A-dependent translation initiation involves the initiation factors eIF4G2, eIF3A as well as the m^6A reader YT521-B homology domain (YTHD) F3. The direct interaction of eIF4G2 with YTHDF3 suggested a possible role of the m^6A reader in recruiting eIF4G2 to the m^6A site, promoting by this way the internal entry of the translation machinery as eIF4G2 directly recruits eIF3 [15]. In the same study, 19 endogenous peptides were identified by MS/MS as translated from/through the circular mRNA junction. The high degree of circRNA m^6A methylation was also demonstrated in human embryonic stem cells by Zhou et al. who identified, by m^6A-RIP, 1404 m^6A circRNAs whose methylation is dependent on METTL3 [54].

Very recently, Fan et al. generated a library of random 10-nt sequences inserted before the start codon of a circRNA-coded GFP and identified 97 IRES-like hexamer sequences enriched in thousands of endogenous circRNAs, whose pervasive translation is supported by mass spectrometry evidences [55]. Several of these hexamers contain the RRACH signature for the m6A modification and might correspond to MIRESs. Fifty-eight RBPs binding these elements were also identified as recruited by IRES-like hexamers. Among them, PABPC1 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) U are able to activate this cap-independent translation. MIRESs appear as an alternative mechanism for translation initiation on circRNAs. However in spite of all the above arguments MIRES-dependent translation of endogenous circRNAs remains to be demonstrated.

6. The m^{6}A Machinery Allows circRNAs to be Marked as the Self

Other authors found another unexpected role of circRNA m^{6}A modification on the immune response [56,57]. They engineered a GFP circRNA based on self-splicing via permuted *td* autocatalytic intron from T4 bacteriophage and demonstrated that this self-spliced circRNA is highly immunogenic in mammalian cells [57]. It was thus termed circFOREIGN. RNAseq data of cells transfected by circFOREIGN showed that expression of 127 genes involved in innate immunity is increased. This immune response is mediated by RIG-1, as RIG-1 knock-out abrogates the circFOREIGN-induced immune response. This article shows that RIG-recognition depends on the intron: circRNAs spliced by endogenous spliceosomes are marked as the self, while circRNAs generated by autocatalytic splicing are considered as foreign. These authors have identified that m^{6}A modification is the marker for self: they transfected DNA plasmids coding circRNAs generated by protein-assisted (circSELF) or autocatalytic splicing (circFOREIGN) into HeLa cells and found that circSELF but not circFOREIGN is associated with the m^{6}A machinery [56]. The m^{6}A YTHDF2 reader is required for suppression of immune stimulation by circFOREIGN while the METTL3 writer is also needed for self/nonself-recognition. m^{6}A UV-crosslinking and immunoprecipitation revealed that circSELF gained an m^{6}A modification within 50–100 nt downstream from the circularization junction. When circFOREIGN was mutated for all m^{6}A RRACH motifs, its RIG-1-mediated immunogenicity was increased by 10,000 fold.

Association of circSELF with the m^{6}A machinery might be related to the presence of the exon junction complex (EJC) on this cirRNA spliced by endogenous spliceosome [58]. Supporting this hypothesis, a study using methylated RNA immunoprecipitation-seq (MeRIP-seq) has revealed a role of METTL3 in the modulation of nonsense-mediated decay (NMD) [59]. NMD-targeted transcripts are dependent on the m^{6}A reader YTHDC1. M^{6}A modifications around the start codon prevent NMD. Knowing that induction of NMD is dependent on the presence of the EJC on spliced mRNA, we can speculate that an interaction between the EJC and METTL3 might explain the difference of methylation of circSELF and circFOREIGN. The concept of RNA marking as self or nonself constitutes an important parameter to take into account if using circRNAs as biotechnological vectors for protein expression.

7. mRNA Functional Circularization Enhances Translation Efficiency Via Ribosome Recycling

While there is no more doubt about translation of covalently closed circular RNA, the linearity of canonical mRNA can be questioned. It has been shown for more than thirty years that polysomes exhibit a circular or spiral form [18]. This was established by electron microscopy in rat somatotropes and mammotropes expressing growth hormone and prolactin, respectively, and concerned about 80% of the polysomes seen in the rough endoplasmic reticulum of these cells. In the two cell types the number of ribosomes in circular polysomes showed a peak at six to seven ribosomes. This study suggested a proximity of the 5′ end with the 3′ termination codon that would allow ribosome recycling [18]. The functional interaction between mRNA 3′ and 5′ UTRs was first demonstrated in yeast by the demonstration that the poly(A) tail behaves as a translational enhancer and that the polyA-binding protein Pab1p stimulates 40S ribosome joining [19] (Figure 2a). One year later, the same authors demonstrated that the Pab1p-poly(A) tail complex interacts with eIF4G [20]. The model of mechanism proposed from these data was that stimulation of cap-dependent translation results from Pab1p binding to the eIF4G/4E complex, leading to mRNA circularization and placement of the terminated 40S ribosome subunit near the mRNA 5′. eIF4G, existing as two isoforms eIF4G1 and eIF4G2, interacts with eIF4E via its N-terminal domain and forms a bridge between the cap and the 40S ribosome subunit [21,22]. This bridge is broken by the picornavirus protease that blocks cap-dependent translation, but eIF4G remains capable of binding to IRESs to drive cap-independent translation via 40S internal recruitment [23] (Figure 2e). Thus Pab1p acts synergistically with the cap structure but can also function independently [21]. In both cap-dependent and IRES-dependent translation, eIF4G is the molecular adapter responsible for functional circularization leading to an increase in protein synthesis efficiency. The complex between the cap binding factor eIF4E, eIF4G and Pab1p has been reconstituted

Int. J. Mol. Sci. **2020**, *21*, 8591

and analyzed by atomic force microscopy (AFM), allowing the authors to visualize circular RNA molecules and to definitely prove the existence of noncovalently closed circular RNA [60].

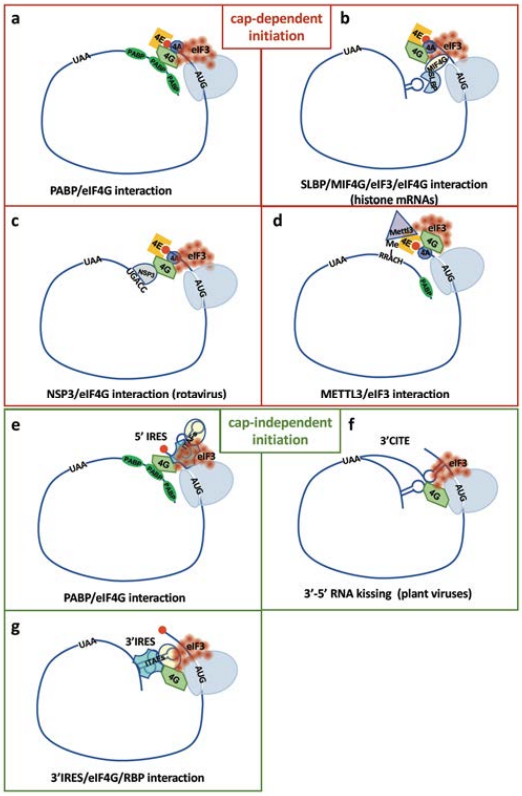


Figure 2. mRNA functional circularization is mediated by different mechanisms. Several mechanisms of mRNA circularization are represented, with the known proteins and RNA elements involved in the 3′–5′ interaction, allowing cap-dependent (**a**–**d**) and cap-independent (**e**–**g**) translation. Each mechanism is detailed in the text (Sections 7 and 8). This list is not exhaustive and the mechanism d (METTL3/eIF3 interaction) may also serve cap-independent translation.

RNA functional circularization is not limited to the interaction between eIF4G and PABP. It also takes place on nonpolyadenylated histone mRNAs via a 3′ terminal stem-loop that binds the SLBP protein. The 3′–5′ bridge is formed by the complex SLBP/MIF4G(SLIP1)/eIF3/eIF4F [61] (Figure 2b). Several viruses whose mRNAs carry no poly(A) tail have developed specific cyclization systems. Rotaviruses are double-stranded RNA viruses that produce a functional homolog of PABP and NSP3, which binds to the UGACC consensus at the viral mRNA 3′ end and circularizes the mRNA by interacting with eIF4G (Figure 2c). In addition, NSP3 shuts down host cell protein by displacing PABP to titrate all the available eIF4G pool for translation of the viral mRNA [62,63]. The 5′–3′ interaction of the IRES-containing HCV RNA genome is supported by the binding of 40S ribosome subunit and eIF3 to both 5′ and 3′ regions, involving RNA–RNA long-range interactions as well as binding of several ITAFs [64]. These different studies show that mRNA functional circularization might be the rule rather than the exception.

8. 3′UTR Elements and m^{6}A Modifications Enhance Translation by a Closed-Loop Mechanism

The 3′ translational enhancers (3′TE) have been identified in several plant viruses such as the tobacco mosaic virus whose mRNA 3′UTR contains a pseudoknot that stimulates translation initiation in conjunction with the 5′cap [65]. However many plant positive-strand RNA viruses do not contain a 5′ cap. In such a case the 3′ TE mimics the 5′ cap and has been called a 3′ cap-independent translational enhancer (3′CITE) (Figure 2f). 3′CITEs bind a component of eIF4F and engage RNA circularization by RNA–RNA kissing interactions [66,67]. In particular, a CITE element has been described in the barley yellow dwarf virus (BYDV) [68]. Activation of translation initiation by elements in the 3′UTR have also been found in animal cell mRNAs including the FGF2 mRNA where a 3′TE modulates the choice of alternative initiation codons [69].

The model of RNA looping was demonstrated in 2014 by Peak et al. who tethered eIF4G fused to MS2 coat protein to the 3′UTR of a reporter mRNA through MS2-binding sites [70]. This fusion protein is able to recruit 43S ribosomes at the mRNA 3′ and enhances 5′ end-independent translation of the reporter gene located upstream. In this study, cap-independent translation is also stimulated when inserting the EMCV IRES downstream from the reporter gene. The authors proposed a model of RNA looping allowing communication between the ribosome recruited in 3′ and the initiation coding located upstream (Figure 2g). This model was supported by a study focused on the systematic discovery of cap-independent sequences in human and viral genomes based on a high-throughput bicistronic assay [71]. The authors found a high enrichment of sequences able to generate cap-independent translation in human mRNA 3′UTRs, suggesting that numerous transcripts have the ability to recruit ribosomes in the 3′UTR and then initiate translation by the mRNA looping mechanism. Recently, a large-scale tether function assay (TFA) has been designed to identify RBPs regulating mRNA stability and translation, again based on the MS2 system [72]. A library of 690 RBP open reading frames were fused to MS2 coat protein and tethered to the 3′UTR of a reporter mRNA using MS2 binding sites as above. Several proteins were identified as translational enhancers when bound to the mRNA 3′UTR, suggesting that many RPBs are involved in the closed-loop mechanism of translation initiation [72,73].

An additional mechanism of mRNA closed-loop model involves the m^{6}A modification [74]. Me-RIP-seq experiments have shown an enrichment of m^{6}A modifications in mRNA 3′UTRs, in particular in the vicinity of the termination codon [75]. Such modifications have an enhancing effect on translation efficiency mediated by a physical and functional interaction between the m^{6}A writer METTL3 and the eIF3 subunit h [74] (Figure 2d). Electron microscopy revealed circular polysomes, supporting the hypothesis that METTL3 behaves as a translational activator by the mRNA closed-loop mechanism. The above evidences indicate that IRESs and m^{6}A, in addition to driving internal initiation of translation, participate in mechanism of mRNA circularization when located in the 3′UTR.

9. Enhancement of Translation Initiation Rate by Ribosome Recycling and Rolling-Cycle Translation

The closed-loop model suggests that translation enhancement would result from engagement into a round of translation of a ribosome recruited to the 3′ UTR, and/or of a re-engagement of terminating ribosomes, via mRNA circularization. Supporting this, it was shown in 1987 by Nelson and Winkler that events of primary initiation and reinitiation (when a just-terminated ribosome rebinds the same mRNA) are quite different [76]. These authors analyzed the kinetic assembly of histone mRNA in rabbit reticulocyte lysate and demonstrated a biphasic change of initiation rate: initial formation of large polysomes is quite slow as it takes 16 min, while reinitiation of terminated ribosomes occurs at a greater rate. These pioneer data suggesting the existence of ribosome recycling have been confirmed and connected to RNA circularization in a recent article that focuses on closed-loop assisted reinitiation (CLAR) [77]. By monitoring the rate of protein synthesis in the course of translation of capped and polyadenylated mRNA in a Krebs-2 cell-free translation system, this study again reports a biphasic kinetics of translation: here the first phase exhibits a low initial synthesis rate, and is followed after 18 min by a second phase with an acceleration of translation corresponding to a shift of polysome

average size from two to five. This acceleration is not caused by the involvement of new mRNAs in translation but reflects an increase of the initiation rate [77]. This process requires mRNA 5′–3′ interaction, suggesting that it results from ribosome recycling.

The mechanism of ribosome recycling has been fully documented in the last decade, with several studies revealing a full connection between the steps of termination and initiation of translation. Termination is mediated by the eukaryotic release factors (eRF) 1 and 3 [78]. eRF1 is responsible for recognition of the stop codon and release of the nascent polypeptide following GTP hydrolysis by the GTPase eRF3, while eRF3 interacts with PABP and directly connects the just-terminating ribosome with the translation initiation complex [79]. Moreover, the release factor eRF1 interacts with the ribosome splitting factor ATP binding cassette (ABC) E1. This highly conserved essential protein initiates the recycling of post-termination 40S ribosomes. In 2013, Skabkin et al. reconstituted ABCE1-40S post-termination complexes in vitro in the presence of initiation factors and of initiator Met-tRNA. These authors observed that ribosomes are able to scan bidirectionally, suggesting their ability to reinitiate at codons located upstream or downstream from the stop codon [80]. High resolution cryo-electron microscopy (Cryo-EM) structures of 40S-ABCE1 postsplitting complexes either assembled in vitro or isolated as native complexes from yeast cells have also confirmed the interaction of ABCE1 with initiation factors and have shown its proximity with eIF3 [81]. It is proposed that ABCE1 retention on the small ribosome subunit primes the next round of initiation by enhancing the recruitment of initiation factors [82]. ABCE1 is now considered as an initiation factor as it bridges ribosome recycling with initiation, and this function is meaningful in the context of mRNA 3′–5′ interaction.

The concept of translation acceleration by ribosome recycling leads us back to translation of covalently closed circRNA, which may be subjected to the ribosome recycling process and are good candidates for the CLAR mechanism and the acceleration rate of translation initiation (Figure 1B, panels 1–2). While translation efficiency of circRNAs may be enhanced by processes of reinitiation or start/stop codon overlap due to bidirectional scanning of post-terminated ribosome, the model of 3′ to 5′ ribosome recycling connects with the observation of continuous translation, described for the virusoid CCC RNA in 2014 [46] (Figure 1B, panels 3–4). Rolling-circle translation of covalently closed circRNA has also been described in human cells using flagged circRNAs synthesized in vitro and transfected into Hela cells [83]. In the absence of any IRES, once initiation has occurred on a circular RNA with an infinite ORF even if it is ineffective the elongation can revolve around the circle many times and produce high molecular weight proteins. Thus the rolling-circle amplification mechanism based on a single but poorly efficient initiation event may be an additional mechanism for circRNA translation [84]. Interestingly, in the recent study cited above by Fan et al., 14% of the endogenous circRNAs containing IRES-like hexamers can produce protein concatemers through rolling-circle translation. This report also confirms that rolling-circle translation directs synthesis of huge amounts of protein concatemers and that initiation of circRNA translation is the rate-limiting step [55].

10. Impact of Covalently or Noncovalently Closed Circular RNA Translation in Pathologies

The present update has clearly shown the crucial role of RNA circularization for translation efficiency, with important pathophysiological consequences. Translation of circular RNA, covalently closed or not, has also demonstrated its relevance in many diseases [84,85]. This evidence is growing for covalently closed circRNAs. The first described circRNA translation product, circ-ZNF609, is able to activate myoblast proliferation and is involved in Duchenne myodystrophy [48]. Several circRNA products are involved in cancer, by example we can note the tumor suppression role of circ-FBXW7-185aa and circSHPRH-146aa in glioblastoma [49,50]. Overexpression of circFBXW7 also inhibits proliferation and metastasis of triple-negative breast cancer cells [86]. These circRNA-derived proteins may act as decoys as is the case for circSHPRH-146aa that protects the full-length SHPRH from degradation by the ubiquitin proteasome. The same mechanisms occur with circAKT3 that produces the isoform AKT3-174aa, a dominant-negative variant of AKT with tumor suppressor activity [87]. FBXW7-185aa competitively interacts with the deubiquitinating enzyme USP28 and antagonizes

USP28-induced c-Myc stabilization [50]. The β-catenin-370aa protein produced by circβ-catenin is highly expressed in liver cancer cells and promotes tumor growth by activating the Wnt/β-catenin pathway. It also acts as a decoy protein by binding to the GSK3β ubiquitine ligase, which protects the full-length β-catenin from proteasome-dependent degradation [53]. PINT87aa produced by circLINC-PINT is a tumor suppressor but acts through a different mechanism: it interacts with the polymerase-associated factor 1 which recruits RNA polymerase II and suppresses the transcription of multiple proto-oncogenes [51]. Most circRNA translation products have an effect on cancer progression or suppression [85]. However the deregulated expression of circRNAs acting as sponges or being translated is also involved in neurodegenerative diseases and circRNAs appear as key players in aging [88,89]. Interestingly a decreased expression of circRNAs has been observed in brains of Alzheimer disease patients, contrasting with the general increase observed during aging [90].

Efficient translation of noncovalently circularized mRNAs also plays a role in disease development. Translation of many viral mRNAs is promoted by a 3′–5′ interaction resulting in a more efficient viral replication, as is the case of rotaviruses with interaction of NSP3 protein with eIF4G. These pathogens are an important cause of gastroenteritis in young animals and children [63]. Also ribosome recycling and acceleration of translation initiation by the closed-loop formation promote oncogenesis. In particular mRNA looping generated by METTL3-eIF3h interaction enhances translation of a large subset of oncogenic mRNAs, paving the way for the development of new cancer therapeutic strategies [74].

11. Future Perspectives for Biotechnological and Therapeutic Applications of RNA Translation in Circles

The emergence of circular RNAs, much more stable than their linear counterparts, opens a new avenue for protein production in biological systems and development of therapeutic vectors. In view of the stability of circular RNA one can envisage cell transfection by circular RNA produced in vitro. The challenge of optimizing such a vector resides in its translation efficiency. The study by Wesselhoeft et al. has pioneered the use of exogenous circRNA for robust and stable protein expression in eukaryotic cells [91]. These authors have engineered a technology of circRNA production for potent and stable translation in eukaryotic cells, based on self-splicing by using a group I autocatalytic intron. They found that the most efficient intron is that of Anabaena pre-tRNA while the optimal IRES is the Coxsackievirus B3 (CVB3) IRES. The efficiency of the IRES is however cell-type-dependent. Such circRNAs containing the luciferase reporter ORF were produced by in vitro transcription and purified using high-performance liquid chromatography (HPLC). They were then used for transfection of human cell lines, revealing that the circRNA produces 811% more protein than the corresponding capped and polyadenylated linear RNA. CircRNA exhibited a protein production half-life of 80–116 h, compared to 43–49 h for the linear counterpart. These authors reported that circRNAs are less immunogenic than linear RNAs [92]. Synthetic circRNAs were also produced by simple ligation of in-vitro-transcribed linear RNA molecules containing microRNA binding sites [93]. Such sponge circRNAs, containing miR-21 binding sites, were shown to suppress proliferation of three gastric cell lines. It should be noted that synthetic circRNAs containing m^6A modifications instead of the IRES failed to produce any translation product, suggesting that m^6A-mediated translation would require the binding of nuclear RBPs [92].

In another contribution, Meganck et al. designed a recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector expressing a circRNA coding GFP under the control of the CMV promoter, with the EMCV IRES to drive initiation of translation [94]. Vector intravenous delivery into mice demonstrated a robust transgene expression in cardiac tissue as well as in brain and eye tissue while expression was less efficient in liver tissue. This was attributed to the EMCV IRES but might also result from the weak activity of the CMV promoter in liver. The above studies demonstrate that IRESs drive the efficient production of proteins from circular RNA-producing vectors but also underline the sensitivity of IRESs to the cellular context. In future applications, the choice of IRES and promoter may be adapted

according to the targeted tissue and it will be of particular interest to test cellular IRESs rather than only viral IRESs in such vectors, as these IRESs are often tissue-specific in vivo [95,96].

A recent study has developed a cell factory for recombinant protein production in Chinese hamster ovary (CHO) cells, based on rolling-circle translation [97]. Cells were transfected with a plasmid containing the sequence of human erythropoietin (EPO) ORF flanked by adequate splicing sites to obtain a circRNA. The EPO ORF was made infinite by removal of the stop codon which was replaced by a 2A element to obtain a ribosome "stop-go" process (and not a cleavage as mentioned in many publications) [98]. The 2A-mediated stop-go drives immediate reinitiation through ribosome skipping and prevents the formation of multimers. Costello et al. showed that the EPO coding "infinite" circular mRNA improves the production of secreted EPO compared to linear mRNA or circRNA with a stop codon. Another original approach is to produce ribozyme-assisted circRNAs (racRNAs), in the so-called "Tornado" (Twister-optimized RNA for durable overexpression) expression system [99]. The "Tornado" transcript is flanked by two Twister ribozymes that undergo autocatalytic cleavage and generate termini that are ligated by the endogenous RNA ligase RtcB. racRNAs containing protein-binding aptamers were successfully expressed in different mammalian cell types. In particular, the NF-kB pathway was efficiently inhibited by this way. RacRNAs might also be useful to express proteins of interest if containing an ORF. Altogether, these different studies provide numerous perspectives for a new generation of gene therapies [100]. Synthetic circRNAs, plasmids or viral vectors expressing circRNAs offer an exciting perspective to expression of genes of interest and also combinations of therapeutic genes that could be translated either with IRESs or by rolling-circle translation with 2A elements.

12. Conclusions

Our last word will be that the concept of RNA circle and of circular RNA translation can no longer be considered as an exception, and may be the key for efficient translation in eukaryotes. Translation of RNA circles also represents a powerful tool in future biotechnology and gene transfer research for the development of new gene therapies.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, A.-C.P.; Figure—original drawing, E.L.; Writing—Review and Editing, A.-C.P., B.G.-S., E.L., E.R., F.D., F.T. and L.H.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding

Acknowledgments: E.R. and F.D. are financed by the Ligue Nationale Contre le Cancer and the Agence Nationale de la Recherche ANR-18-CE11-0020-RIBOCARD, respectively.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

Abbreviations

ABC	ATP-binding cassette
AFM	atomic force microscopy
AGO	argonaute protein
BYDV	barley yellow dwarf virus
CCC	covalently closed circle
CHO	Chinese hamster ovary
CITE	cap-independent translational enhancer
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
Cryo-EM	cryo-electron microscopy
DMD	Duchenne muscular dystrophy
EJC	exon junction complex
eIF	eukaryotic initiation factor
EMCV	encephalomyocarditis virus
EPO	erythropoietin

eRF	eukaryotic release factor
FTO	fat mass and obesity-associated protein
GFP	green fluorescent protein
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HPLC	high-performance liquid chromatography
IRES	internal ribosome entry site
LINC-PINT	long intergenic non-protein-coding RNA p53-induced transcript
MBL	muscleblind
Me-RIP	methylated RNA immunoprecipitation
METTL	m^6 A methyltransferase-like
MIRES	m6A-induced ribosome engagement site
MS	mass spectrometry
NMD	nonsense-mediated decay
ORF	open reading frame
PABP	poly(A)-binding protein
rAAV	recombinant adeno-associated virus
racRNA	ribozyme-assisted circRNA
RBP	RNA binding protein
RFP	ribosome footprinting
RIP	RNA immunoprecipitation
RISC	RNA-induced silencing complex
SHPRH	histone-linker, PHD and RING finger domain-containing helicase
TE	translational enhancer
TFA	tether function assay
Tornado	Twister-optimized RNA for durable overexpression
UTR	untranslated region
YTHD	YT521-B homology domain

References

1. Kozak, M. Inability of circular mRNA to attach to eukaryotic ribosomes. *Nature* **1979**, *280*, 82–85. [CrossRef]
2. Kozak, M. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* **1978**, *15*, 1109–1123. [CrossRef]
3. Godet, A.C.; David, F.; Hantelys, F.; Tatin, F.; Lacazette, E.; Garmy-Susini, B.; Prats, A.C. IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 924. [CrossRef] [PubMed]
4. Jang, S.K.; Krausslich, H.G.; Nicklin, M.J.; Duke, G.M.; Palmenberg, A.C.; Wimmer, E. A segment of the 5′ nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.* **1988**, *62*, 2636–2643. [CrossRef] [PubMed]
5. Pelletier, J.; Sonenberg, N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **1988**, *334*, 320–325. [CrossRef]
6. Chen, C.Y.; Sarnow, P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science* **1995**, *268*, 415–417. [CrossRef]
7. Holcik, M.; Sonenberg, N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 318–327. [CrossRef]
8. Shatsky, I.N.; Terenin, I.M.; Smirnova, V.V.; Andreev, D.E. Cap-Independent Translation: What's in a Name? *Trends Biochem. Sci.* **2018**, *43*, 882–895. [CrossRef]
9. Lacerda, R.; Menezes, J.; Romao, L. More than just scanning: The importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 1659–1680. [CrossRef]
10. Marcel, V.; Ghayad, S.E.; Belin, S.; Therizols, G.; Morel, A.P.; Solano-Gonzalez, E.; Vendrell, J.A.; Hacot, S.; Mertani, H.C.; Albaret, M.A.; et al. p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 318–330. [CrossRef]
11. Cocquerelle, C.; Daubersies, P.; Majerus, M.A.; Kerckaert, J.P.; Bailleul, B. Splicing with inverted order of exons occurs proximal to large introns. *EMBO J.* **1992**, *11*, 1095–1098. [CrossRef] [PubMed]

12. Nigro, J.M.; Cho, K.R.; Fearon, E.R.; Kern, S.E.; Ruppert, J.M.; Oliner, J.D.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. Scrambled exons. *Cell* **1991**, *64*, 607–613. [CrossRef]
13. Salzman, J.; Gawad, C.; Wang, P.L.; Lacayo, N.; Brown, P.O. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30733. [CrossRef] [PubMed]
14. Diallo, L.H.; Tatin, F.; David, F.; Godet, A.C.; Zamora, A.; Prats, A.C.; Garmy-Susini, B.; Lacazette, E. How are circRNAs translated by non-canonical initiation mechanisms? *Biochimie* **2019**, *164*, 45–52. [CrossRef] [PubMed]
15. Yang, Y.; Fan, X.; Mao, M.; Song, X.; Wu, P.; Zhang, Y.; Jin, Y.; Yang, Y.; Chen, L.L.; Wang, Y.; et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N(6)-methyladenosine. *Cell Res.* **2017**, *27*, 626–641. [CrossRef] [PubMed]
16. Meyer, K.D.; Patil, D.P.; Zhou, J.; Zinoviev, A.; Skabkin, M.A.; Elemento, O.; Pestova, T.V.; Qian, S.B.; Jaffrey, S.R. 5′ UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* **2015**, *163*, 999–1010. [CrossRef]
17. Pamudurti, N.R.; Bartok, O.; Jens, M.; Ashwal-Fluss, R.; Stottmeister, C.; Ruhe, L.; Hanan, M.; Wyler, E.; Perez-Hernandez, D.; Ramberger, E.; et al. Translation of CircRNAs. *Mol. Cell* **2017**, *66*, 9–21.e7. [CrossRef]
18. Christensen, A.K.; Kahn, L.E.; Bourne, C.M. Circular polysomes predominate on the rough endoplasmic reticulum of somatotropes and mammotropes in the rat anterior pituitary. *Am. J. Anat.* **1987**, *178*, 1–10. [CrossRef]
19. Tarun, S.Z., Jr.; Sachs, A.B. A common function for mRNA 5′ and 3′ ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 2997–3007. [CrossRef]
20. Tarun, S.Z., Jr.; Sachs, A.B. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* **1996**, *15*, 7168–7177. [CrossRef]
21. Hentze, M.W. eIF4G: A multipurpose ribosome adapter? *Science* **1997**, *275*, 500–501. [CrossRef] [PubMed]
22. Keiper, B.D.; Gan, W.; Rhoads, R.E. Protein synthesis initiation factor 4G. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, *31*, 37–41. [CrossRef]
23. Sachs, A.B.; Sarnow, P.; Hentze, M.W. Starting at the beginning, middle, and end: Translation initiation in eukaryotes. *Cell* **1997**, *89*, 831–838. [CrossRef]
24. Coca-Prados, M.; Hsu, M.T. Intracellular forms of simian virus 40 nucleoprotein complexes. II. Biochemical and electron microscopic analysis of simian virus 40 virion assembly. *J. Virol.* **1979**, *31*, 199–208. [CrossRef] [PubMed]
25. Sanger, H.L.; Klotz, G.; Riesner, D.; Gross, H.J.; Kleinschmidt, A.K. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 3852–3856. [CrossRef] [PubMed]
26. Capel, B.; Swain, A.; Nicolis, S.; Hacker, A.; Walter, M.; Koopman, P.; Goodfellow, P.; Lovell-Badge, R. Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell* **1993**, *73*, 1019–1030. [CrossRef]
27. Makino, S.; Chang, M.F.; Shieh, C.K.; Kamahora, T.; Vannier, D.M.; Govindarajan, S.; Lai, M.M. Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta (delta) virus RNA. *Nature* **1987**, *329*, 343–346. [CrossRef]
28. Wang, K.S.; Choo, Q.L.; Weiner, A.J.; Ou, J.H.; Najarian, R.C.; Thayer, R.M.; Mullenbach, G.T.; Denniston, K.J.; Gerin, J.L.; Houghton, M. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature* **1986**, *323*, 508–514. [CrossRef]
29. Hansen, T.B.; Jensen, T.I.; Clausen, B.H.; Bramsen, J.B.; Finsen, B.; Damgaard, C.K.; Kjems, J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* **2013**, *495*, 384–388. [CrossRef]
30. Feng, Y.; Wang, Q.; Shi, C.; Liu, C.; Zhang, Z. Does Circular RNA Exert Significant Effects in Ovarian Cancer? *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2019**, *29*, 161–170. [CrossRef]
31. Memczak, S.; Jens, M.; Elefsinioti, A.; Torti, F.; Krueger, J.; Rybak, A.; Maier, L.; Mackowiak, S.D.; Gregersen, L.H.; Munschauer, M.; et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* **2013**, *495*, 333–338. [CrossRef] [PubMed]
32. Ji, P.; Wu, W.; Chen, S.; Zheng, Y.; Zhou, L.; Zhang, J.; Cheng, H.; Yan, J.; Zhang, S.; Yang, P.; et al. Expanded Expression Landscape and Prioritization of Circular RNAs in Mammals. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 3444–3460 e5. [CrossRef]
33. Li, Z.; Huang, C.; Bao, C.; Chen, L.; Lin, M.; Wang, X.; Zhong, G.; Yu, B.; Hu, W.; Dai, L.; et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 256–264. [CrossRef] [PubMed]

34. Ashwal-Fluss, R.; Meyer, M.; Pamudurti, N.R.; Ivanov, A.; Bartok, O.; Hanan, M.; Evantal, N.; Memczak, S.; Rajewsky, N.; Kadener, S. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* **2014**, *56*, 55–66. [CrossRef]
35. Lacazette, E.; Diallo, L.H.; Tatin, F.; Garmy-Susini, B.; Prats, A.C. Do circular RNAs play tricks on us? *Med. Sci.* **2020**, *36*, 38–43.
36. Wu, J.; Qi, X.; Liu, L.; Hu, X.; Liu, J.; Yang, J.; Yang, J.; Lu, L.; Zhang, Z.; Ma, S.; et al. Emerging Epigenetic Regulation of Circular RNAs in Human Cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *16*, 589–596. [CrossRef]
37. Mathonnet, G.; Fabian, M.R.; Svitkin, Y.V.; Parsyan, A.; Huck, L.; Murata, T.; Biffo, S.; Merrick, W.C.; Darzynkiewicz, E.; Pillai, R.S.; et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* **2007**, *317*, 1764–1767. [CrossRef]
38. Pillai, R.S.; Bhattacharyya, S.N.; Filipowicz, W. Repression of protein synthesis by miRNAs: How many mechanisms? *Trends Cell Biol.* **2007**, *17*, 118–126. [CrossRef]
39. Karaa, Z.S.; Iacovoni, J.S.; Bastide, A.; Lacazette, E.; Touriol, C.; Prats, H. The VEGF IRESes are differentially susceptible to translation inhibition by miR-16. *RNA* **2009**, *15*, 249–254. [CrossRef]
40. Du, W.W.; Yang, W.; Liu, E.; Yang, Z.; Dhaliwal, P.; Yang, B.B. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 2846–2858. [CrossRef]
41. Abdelmohsen, K.; Panda, A.C.; Munk, R.; Grammatikakis, I.; Dudekula, D.B.; De, S.; Kim, J.; Noh, J.H.; Kim, K.M.; Martindale, J.L.; et al. Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1. *RNA Biol.* **2017**, *14*, 361–369. [CrossRef] [PubMed]
42. Li, X.X.; Xiao, L.; Chung, H.K.; Ma, X.X.; Liu, X.; Song, J.L.; Jin, C.Z.; Rao, J.N.; Gorospe, M.; Wang, J.Y. Interaction between HuR and circPABPN1 Modulates Autophagy in the Intestinal Epithelium by Altering ATG16L1 Translation. *Mol. Cell. Biol.* **2020**, *40*, e00492-19. [CrossRef] [PubMed]
43. Kullmann, M.; Gopfert, U.; Siewe, B.; Hengst, L. ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 3087–3099. [CrossRef] [PubMed]
44. Liu, B.; Yang, G.; Wang, X.; Liu, J.; Lu, Z.; Wang, Q.; Xu, B.; Liu, Z.; Li, J. CircBACH1 (hsa_circ_0061395) promotes hepatocellular carcinoma growth by regulating p27 repression via HuR. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 6929–6941. [CrossRef] [PubMed]
45. Chen, L.; Kong, R.; Wu, C.; Wang, S.; Liu, Z.; Liu, S.; Li, S.; Chen, T.; Mao, C.; Liu, S. Circ-MALAT1 Functions as Both an mRNA Translation Brake and a microRNA Sponge to Promote Self-Renewal of Hepatocellular Cancer Stem Cells. *Adv. Sci.* **2019**, *7*, 1900949. [CrossRef] [PubMed]
46. AbouHaidar, M.G.; Venkataraman, S.; Golshani, A.; Liu, B.; Ahmad, T. Novel coding, translation, and gene expression of a replicating covalently closed circular RNA of 220 nt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 14542–14547. [CrossRef] [PubMed]
47. Casci, I.; Krishnamurthy, K.; Kour, S.; Tripathy, V.; Ramesh, N.; Anderson, E.N.; Marrone, L.; Grant, R.A.; Oliver, S.; Gochenaur, L.; et al. Muscleblind acts as a modifier of FUS toxicity by modulating stress granule dynamics and SMN localization. *Nat. Commun.* **2019**, *10*(1), 5583. [CrossRef]
48. Legnini, I.; Di Timoteo, G.; Rossi, F.; Morlando, M.; Briganti, F.; Sthandier, O.; Fatica, A.; Santini, T.; Andronache, A.; Wade, M.; et al. Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis. *Mol. Cell* **2017**, *66*, 22–37.e9. [CrossRef]
49. Zhang, M.; Huang, N.; Yang, X.; Luo, J.; Yan, S.; Xiao, F.; Chen, W.; Gao, X.; Zhao, K.; Zhou, H.; et al. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis. *Oncogene* **2018**, *37*, 1805–1814. [CrossRef]
50. Yang, Y.; Gao, X.; Zhang, M.; Yan, S.; Sun, C.; Xiao, F.; Huang, N.; Yang, X.; Zhao, K.; Zhou, H.; et al. Novel Role of FBXW7 Circular RNA in Repressing Glioma Tumorigenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **2018**, *110*, 304–315. [CrossRef]
51. Zhang, M.; Zhao, K.; Xu, X.; Yang, Y.; Yan, S.; Wei, P.; Liu, H.; Xu, J.; Xiao, F.; Zhou, H.; et al. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4475. [CrossRef] [PubMed]
52. Liang, W.C.; Wong, C.W.; Liang, P.P.; Shi, M.; Cao, Y.; Rao, S.T.; Tsui, S.K.; Waye, M.M.; Zhang, Q.; Fu, W.M.; et al. Translation of the circular RNA circbeta-catenin promotes liver cancer cell growth through activation of the Wnt pathway. *Genome Biol.* **2019**, *20*, 84. [CrossRef] [PubMed]

53. Dominissini, D.; Moshitch-Moshkovitz, S.; Schwartz, S.; Salmon-Divon, M.; Ungar, L.; Osenberg, S.; Cesarkas, K.; Jacob-Hirsch, J.; Amariglio, N.; Kupiec, M.; et al. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* **2012**, *485*, 201–206. [CrossRef] [PubMed]
54. Zhou, C.; Molinie, B.; Daneshvar, K.; Pondick, J.V.; Wang, J.; Van Wittenberghe, N.; Xing, Y.; Giallourakis, C.C.; Mullen, A.C. Genome-Wide Maps of m6A circRNAs Identify Widespread and Cell-Type-Specific Methylation Patterns that Are Distinct from mRNAs. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 2262–2276. [CrossRef] [PubMed]
55. Fan, X.; Yang, Y.; Wang, Z. Pervasive translation of circular RNAs driven by short IRES-like elements. *BioRxiv* **2019**, 473207. [CrossRef]
56. Chen, Y.G.; Chen, R.; Ahmad, S.; Verma, R.; Kasturi, S.P.; Amaya, L.; Broughton, J.P.; Kim, J.; Cadena, C.; Pulendran, B.; et al. N6-Methyladenosine Modification Controls Circular RNA Immunity. *Mol. Cell* **2019**, *76*, 96–109.e9. [CrossRef]
57. Chen, Y.G.; Kim, M.V.; Chen, X.; Batista, P.J.; Aoyama, S.; Wilusz, J.E.; Iwasaki, A.; Chang, H.Y. Sensing Self and Foreign Circular RNAs by Intron Identity. *Mol. Cell* **2017**, *67*, 228–238. [CrossRef]
58. Schlautmann, L.P.; Gehring, N.H. A Day in the Life of the Exon Junction Complex. A Day in the Life of the Exon Junction Complex. *Biomolecules* **2020**, *10*, 866. [CrossRef]
59. Li, F.; Yi, Y.; Miao, Y.; Long, W.; Long, T.; Chen, S.; Cheng, W.; Zou, C.; Zheng, Y.; Wu, X.; et al. N6-Methyladenosine Modulates Nonsense-Mediated mRNA Decay in Human Glioblastoma. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 5785–5798. [CrossRef]
60. Wells, S.E.; Hillner, P.E.; Vale, R.D.; Sachs, A.B. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* **1998**, *2*, 135–140. [CrossRef]
61. Neusiedler, J.; Mocquet, V.; Limousin, T.; Ohlmann, T.; Morris, C.; Jalinot, P. INT6 interacts with MIF4GD/SLIP1 and is necessary for efficient histone mRNA translation. *RNA* **2012**, *18*, 1163–1177. [CrossRef] [PubMed]
62. Groft, C.M.; Burley, S.K. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol. Cell* **2002**, *9*, 1273–1283. [CrossRef]
63. Vende, P.; Piron, M.; Castagne, N.; Poncet, D. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3′ end. *J. Virol.* **2000**, *74*, 7064–7071. [CrossRef] [PubMed]
64. Niepmann, M.; Gerresheim, G.K. Hepatitis C Virus Translation Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2328. [CrossRef]
65. Gallie, D.R.; Walbot, V. RNA pseudoknot domain of tobacco mosaic virus can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells. *Genes Dev.* **1990**, *4*, 1149–1157. [CrossRef]
66. Guo, L.; Allen, E.M.; Miller, W.A. Base-pairing between untranslated regions facilitates translation of uncapped, nonpolyadenylated viral RNA. *Mol. Cell* **2001**, *7*, 1103–1109. [CrossRef]
67. Simon, A.E.; Miller, W.A. 3′ cap-independent translation enhancers of plant viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* **2013**, *67*, 21–42. [CrossRef]
68. Wang, S.; Browning, K.S.; Miller, W.A. A viral sequence in the 3′-untranslated region mimics a 5′ cap in facilitating translation of uncapped mRNA. *EMBO J.* **1997**, *16*, 4107–4116. [CrossRef]
69. Touriol, C.; Roussigne, M.; Gensac, M.C.; Prats, H.; Prats, A.C. Alternative translation initiation of human fibroblast growth factor 2 mRNA controlled by its 3′-untranslated region involves a Poly(A) switch and a translational enhancer. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19361–19367. [CrossRef]
70. Paek, K.Y.; Hong, K.Y.; Ryu, I.; Park, S.M.; Keum, S.J.; Kwon, O.S.; Jang, S.K. Translation initiation mediated by RNA looping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 1041–1046. [CrossRef]
71. Weingarten-Gabbay, S.; Elias-Kirma, S.; Nir, R.; Gritsenko, A.A.; Stern-Ginossar, N.; Yakhini, Z.; Weinberger, A.; Segal, E. Comparative genetics. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* **2016**, *351*, aad4939. [CrossRef] [PubMed]
72. Luo, E.C.; Nathanson, J.L.; Tan, F.E.; Schwartz, J.L.; Schmok, J.C.; Shankar, A.; Markmiller, S.; Yee, B.A.; Sathe, S.; Pratt, G.A.; et al. Large-scale tethered function assays identify factors that regulate mRNA stability and translation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2020**, *27*, 989–1000. [CrossRef] [PubMed]
73. Vicens, Q.; Kieft, J.S.; Rissland, O.S. Revisiting the Closed-Loop Model and the Nature of mRNA 5′-3′ Communication. *Mol. Cell* **2018**, *72*, 805–812. [CrossRef] [PubMed]
74. Choe, J.; Lin, S.; Zhang, W.; Liu, Q.; Wang, L.; Ramirez-Moya, J.; Du, P.; Kim, W.; Tang, S.; Sliz, P.; et al. mRNA circularization by METTL3-eIF3h enhances translation and promotes oncogenesis. *Nature* **2018**, *561*, 556–560. [CrossRef] [PubMed]

75. Meyer, K.D.; Saletore, Y.; Zumbo, P.; Elemento, O.; Mason, C.E.; Jaffrey, S.R. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3′ UTRs and near stop codons. *Cell* **2012**, *149*, 1635–1646. [CrossRef] [PubMed]
76. Nelson, E.M.; Winkler, M.M. Regulation of mRNA entry into polysomes. Parameters affecting polysome size and the fraction of mRNA in polysomes. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11501–11506. [PubMed]
77. Alekhina, O.M.; Terenin, I.M.; Dmitriev, S.E.; Vassilenko, K.S. Functional Cyclization of Eukaryotic mRNAs. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1677. [CrossRef]
78. Hellen, C.U.T. Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a032656. [CrossRef]
79. Kozlov, G.; Gehring, K. Molecular basis of eRF3 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10169. [CrossRef]
80. Skabkin, M.A.; Skabkina, O.V.; Hellen, C.U.; Pestova, T.V. Reinitiation and other unconventional posttermination events during eukaryotic translation. *Mol. Cell* **2013**, *51*, 249–264. [CrossRef]
81. Heuer, A.; Gerovac, M.; Schmidt, C.; Trowitzsch, S.; Preis, A.; Kötter, P.; Berninghausen, O.; Becker, T.; Beckmann, R.; Tampé, R. Structure of the 40S-ABCE1 post-splitting complex in ribosome recycling and translation initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 453–460. [CrossRef] [PubMed]
82. Mancera-Martínez, E.; Brito Querido, J.; Valasek, L.S.; Simonetti, A.; Hashem, Y. ABCE1: A special factor that orchestrates translation at the crossroad between recycling and initiation. *RNA Biol.* **2017**, *14*, 1279–1285. [CrossRef] [PubMed]
83. Abe, N.; Matsumoto, K.; Nishihara, M.; Nakano, Y.; Shibata, A.; Maruyama, H.; Shuto, S.; Matsuda, A.; Yoshida, M.; Ito, Y.; et al. Rolling Circle Translation of Circular RNA in Living Human Cells. *Sci Rep.* **2015**, *5*, 16435. [CrossRef]
84. Wawrzyniak, O.; Zarebska, Z.; Kuczynski, K.; Gotz-Wieckowska, A.; Rolle, K. Protein-Related Circular RNAs in Human Pathologies. *Cells* **2020**, *9*, 1841. [CrossRef] [PubMed]
85. Wu, P.; Mo, Y.; Peng, M.; Tang, T.; Zhong, Y.; Deng, X.; Xiong, F.; Guo, C.; Wu, X.; Li, Y.; et al. Emerging role of tumor-related functional peptides encoded by lncRNA and circRNA. *Mol. Cancer* **2020**, *19*, 22. [CrossRef]
86. Ye, F.; Gao, G.; Zou, Y.; Zheng, S.; Zhang, L.; Ou, X.; Xie, X.; Tang, H. circFBXW7 Inhibits Malignant Progression by Sponging miR-197-3p and Encoding a 185-aa Protein in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *18*, 88–98. [CrossRef] [PubMed]
87. Xia, X.; Li, X.; Li, F.; Wu, X.; Zhang, M.; Zhou, H.; Huang, N.; Yang, X.; Xiao, F.; Liu, D.; et al. A novel tumor suppressor protein encoded by circular AKT3 RNA inhibits glioblastoma tumorigenicity by competing with active phosphoinositide-dependent Kinase-1. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 131. [CrossRef]
88. Cai, H.; Li, Y.; Niringiyumukiza, J.D.; Su, P.; Xiang, W. Circular RNA involvement in aging: An emerging player with great potential. *Mech. Ageing Dev.* **2019**, *178*, 16–24. [CrossRef]
89. Zhang, S.; Zhu, D.; Li, H.; Li, H.; Feng, C.; Zhang, W. Characterization of circRNA-Associated-ceRNA Networks in a Senescence-Accelerated Mouse Prone 8 Brain. *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 2053–2061. [CrossRef]
90. Lo, I.; Hill, J.; Vilhjalmsson, B.J.; Kjems, J. Linking the association between circRNAs and Alzheimer's disease progression by multi-tissue circular RNA characterization. *RNA Biol.* **2020**, 1–9. [CrossRef]
91. Wesselhoeft, R.A.; Kowalski, P.S.; Anderson, D.G. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2629. [CrossRef] [PubMed]
92. Wesselhoeft, R.A.; Kowalski, P.S.; Parker-Hale, F.C.; Huang, Y.; Bisaria, N.; Anderson, D.G. RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In Vivo. *Mol. Cell* **2019**, *74*, 508–520 e4. [CrossRef] [PubMed]
93. Liu, X.; Abraham, J.M.; Cheng, Y.; Wang, Z.; Wang, Z.; Zhang, G.; Ashktorab, H.; Smoot, D.T.; Cole, R.N.; Boronina, T.N.; et al. Synthetic Circular RNA Functions as a miR-21 Sponge to Suppress Gastric Carcinoma Cell Proliferation. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2018**, *13*, 312–321. [CrossRef] [PubMed]
94. Meganck, R.M.; Borchardt, E.K.; Castellanos Rivera, R.M.; Scalabrino, M.L.; Wilusz, J.E.; Marzluff, W.F.; Asokan, A. Tissue-Dependent Expression and Translation of Circular RNAs with Recombinant AAV Vectors In Vivo. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2018**, *13*, 89–98. [CrossRef]
95. Creancier, L.; Morello, D.; Mercier, P.; Prats, A.C. Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity ex vivo and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation. *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, 275–281. [CrossRef]

96. Renaud-Gabardos, E.; Tatin, F.; Hantelys, F.; Lebas, B.; Calise, D.; Kunduzova, O.; Masri, B.; Pujol, F.; Sicard, P.; Valet, P.; et al. Therapeutic Benefit and Gene Network Regulation by Combined Gene Transfer of Apelin, FGF2, and SERCA2a into Ischemic Heart. *Mol. Ther.* **2018**, *26*, 902–916. [CrossRef]
97. Costello, A.; Lao, N.T.; Barron, N.; Clynes, M. Continuous translation of circularized mRNA improves recombinant protein titer. *Metab Eng.* **2019**, *52*, 284–292. [CrossRef]
98. de Felipe, P.; Luke, G.A.; Brown, J.D.; Ryan, M.D. Inhibition of 2A-mediated 'cleavage' of certain artificial polyproteins bearing N-terminal signal sequences. *Biotechnol. J.* **2010**, *5*, 213–223. [CrossRef]
99. Litke, J.L.; Jaffrey, S.R. Highly efficient expression of circular RNA aptamers in cells using autocatalytic transcripts. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 667–675. [CrossRef]
100. Costello, A.; Lao, N.T.; Barron, N.; Clynes, M. Reinventing the Wheel: Synthetic Circular RNAs for Mammalian Cell Engineering. *Trends Biotechnol.* **2020**, *38*, 217–230. [CrossRef]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

ARTICLE IN PRESS

Biochimie xxx (xxxx) xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Translational control by long non-coding RNAs

Anne-Claire Godet [a, b], Emilie Roussel [a], Nathalie Laugero [a], Florent Morfoisse [a], Eric Lacazette [a], Barbara Garmy-Susini [a, **], Anne-Catherine Prats [a, *]

[a] UMR 1297-I2MC, Inserm, Université de Toulouse, UT3, Toulouse, France
[b] Threonin Design, 220 Chemin de Montabon, Le Touvet, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 April 2023
Received in revised form
21 August 2023
Accepted 25 August 2023
Available online xxx

Handling Editor: Dr B Friguet

Keywords:
lncRNA
Translational control
Cancer
Pathologies

ABSTRACT

Long non-coding (lnc) RNAs, once considered as junk and useless, are now broadly recognized to have major functions in the cell. LncRNAs are defined as non-coding RNAs of more than 200 nucleotides, regulate all steps of gene expression. Their origin is diverse, they can arise from intronic, intergenic or overlapping region, in sense or antisense direction. LncRNAs are mainly described for their action on transcription, while their action at the translational level is more rarely cited. However, the bibliography in the field is more and more abundant. The present synopsis of lncRNAs involved in the control of translation reveals a wide field of regulation of gene expression, with at least nine distinct molecular mechanisms. Furthermore, it appears that all these lncRNAs are involved in various pathologies including cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases.

© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Contents

1. Introduction 00
2. Impact of lncRNAs on miRNA-mediated translational blockade 00
   2.1. Competing endogenous lncRNAs or miRNA sponges 00
   2.2. MiRNA biogenesis 00
3. Regulation of ribosome biosynthesis and assembly by lncRNAs 00
4. LncRNAs associated with ribosomes or with ribosomal proteins 00
5. LncRNAs interacting with mRNAs 00
   5.1. Translational inhibitors 00
   5.2. Translational activators 00
6. LncRNAs that interact with translation initiation or elongation factors 00
7. LncRNAs interacting with RBPs 00
8. LncRNA impacting the post-translational modifications of translational regulatory proteins 00
9. Translational control by paraspeckle components: the case of NEAT1 00
10. Conclusion 00
Author contributions 00
Acknowledgements 00
References 00

1. Introduction

Only a small portion of the genome is transcribed into messenger RNA, while the vast majority of the transcripts produced

* Corresponding author. Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Inserm UMR 1297, 1, Avenue Jean Poulhes, BP 84225, 31432, Toulouse cedex 4, France.
** Corresponding author.
E-mail address: Anne-Catherine.Prats@inserm.fr (A.-C. Prats).

https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.08.015
0300-9084/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Please cite this article as: A.-C. Godet, E. Roussel, N. Laugero *et al.*, Translational control by long non-coding RNAs, Biochimie, https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.08.015

ARTICLE IN PRESS

Abbreviations

AGO	argonaute
ALKBH5	alkB homolog 5
APOA4	apolipoprotein A-IV
APP	amyloid precursor protein
ARAP1	ankyrin repeat and PH domain 1
AS	antisense
BACE1	beta-secretase-1
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CARF	collaborator of ARF, the product of the CDKN2AIP gene
CDS	coding sequence
CeRNA	competing endogenous RNA
CiRS-7	circular RNA sponge for miR-7
CircRNA	circular RNA
DAZAP1	deleted in azoospermia associated protein 1
DC	detention center
EBP1	erbB3 binding protein 1
EMCV	encephalomyocarditis virus
eRNA	enhancer RNA
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
FBL	fibrillarin
FGF	fibroblast growth factor
FOXC1	forkhead box C1
FUBP3	far-upstream element-binding protein 3
GAS5	growth-arrest specific 5
GMAN	gastric cancer metastasis associated long non coding RNA
HCC	hepatocellular carcinoma
HnRNP	heterogenous ribonucleoprotein
HULC	highly up-regulated in liver cancer
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
IGS	intergenic spacer
IMP2	IGF2 mRNA binding protein 2
IRES	internal ribosome entry site
ISR	integrated stress response
ITAF	IRES *trans*-acting factor
LincRNA	long intergenic non coding RNA
LISR	lncRNA ISR regulator
LncRNA	long non-coding RNA
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1
METTL3	methyltransferase-like 3
miRNA	microRNA
NAT	natural antisense transcript
NEAT1	nuclear enriched abundant transcript 1
NPM1	nucleophosmin 1
ORF	open reading frame
PAX5	paired box 5
PCR	polymerase chain reaction
PPP2R2A	protein phosphatase 2A subunit B
PRC2	polycomb repressive complex 2
PSD-95	postsynaptic density-95
PSF	polypyrimidine splicing factor
PSPC1	paraspeckles compound 1
PTB1	pyrimidine tract binding protein 1
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
PXN	paxillin
RBM	RNA binding motif
RBP	RNA binding protein
ROCK1	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1
RP	ribosomal protein
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SFPQ	splicing factor proline and glutamine-rich
SINEB2	short Interspersed Nuclear Element B2
SLERT	SnoRNA-ended lncRNA enhances pre-ribosomal RNA transcription
SmiFISH	single-molecule inexpensive fluorescent in situ hybridization
Sry	sex-determining region Y
TreRNA	translational regulatory lncRNA
TRMP	TP53-induced modulator of P27
UCA1	urothelial carcinoma associated 1
UCHL1	ubiquitin C-terminal hydrolase L1
UTR	untranslated region
VEGF	vascular endothelial growth factor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
Xist	X-specific inactive transcript
XRN2	5′-3′ exoribonuclease 2
Zeb2	zinc finger E-box binding homeobox 2

are non-coding RNAs (ncRNAs) [1,2]. NcRNAs are classified in two parts, small and long non-coding RNAs. Small non-coding RNAs include housekeeping and regulatory transcripts: snRNAs and snoRNAs implicated in splicing of mRNA and chemical modification of ribosomal RNAs, respectively, miRNAs and siRNAs that regulate transcript stability and translation, tRNAs and rRNAs that are essential parts of the translational machinery, and piRNAs that protect the germline from transposable element attack. A long ncRNA (lncRNA) is defined as an ncRNA whose size is over 200 nucleotides (nt). LncRNAs arise from different genome regions and are really diverse compared to short ncRNAs. They are transcribed by RNA polymerase II, except for long rRNAs that are transcribed by RNA polymerase I. Some of them are transcribed from intergenic region (long intergenic non coding RNAs or lincRNAs), spliced, capped and polyadenylated, or from intronic regions. Some others are produced from the opposite strand of a polymerase II gene, in antisense direction and are called natural antisense transcripts (NATs) or antisense (AS) RNAs, partly or completely overlapping the sense gene. Other lncRNAs such as metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) and nuclear enriched abundant transcript 1 (NEAT1) exhibit unusually long isoforms (up to 20 kb). However, they do not possess introns, thus are not spliced. The 3′ends of MALAT1 and NEAT1 longer isoforms are generated by RNAse P and Z cleavage. These RNAses, usually implicated in tRNA maturation, are responsible for maturation of a tRNA-like structure situated at the end of MALAT1 and NEAT1 transcripts. MALAT1 and NEAT1 long isoforms are further stabilized by a triple-helix at their 3′ ends [3]. Some lncRNAs are circular (circRNAs), a feature that protects them from degradation. They mostly result from a back-splicing event that gives rise to a non-colinear transcript, and can be composed of introns, exons or both. These structural differences modulate their subcellular localization and function [4].

More than 50000 articles have been published with the key-term “long non-coding RNA” over the last decade, revealing their multiple regulatory roles in cells [2]. Firstly, they regulate genome organization, as is the case for the well-known X-specific inactive transcript (Xist) that regulates chromosome architecture to

inactivate the supplementary X chromosome in female mammals. Several lncRNAs have a role in chromatin-remodelling. Enhancer RNAs (eRNAs) are transcribed from enhancer region of genes, sometimes far upstream from the promoter. Their transcription, uni- or bidirectional, depends on the activity of the enhancer itself. They are not always polyadenylated and have a variable half-life. They serve as a platform to bring together the enhancer and the promoter region [5].

LncRNAs intervene at the transcriptional and post-transcriptional levels. For example, they act on transcription by R-loop formation or interference with RNA polymerase II machinery [6]. PTENP1 antisense lncRNA, also known as PTENpg1, has two isoforms coded by its pseudogene, that both regulate phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) gene expression at different levels: α isoform is located to the PTEN promoter to suppresses PTEN expression through induction of chromatin remodelling whilst isoform β interacts with PTENP1 sense, which affects PTEN protein synthesis through changes of PTENP1 mRNA stability and miRNA sponge activity [7]. CircRNAs can regulate their own gene transcription via interaction with the RNA polymerase II machinery and with RNA binding proteins (RBPs), whereas they also compete with their linear counterparts for the splicing machinery. LncRNA AS-FOXC1 promotes m6A demethylase alkB homolog 5 (ALKBH5) interaction with forkhead box C1 (FOXC1) nascent transcripts, leading to their demethylation and an enhanced expression [6,8].

LncRNAs can act in mRNA maturation, stability and decay. NAT Zeb2 antisense RNA for instance prevents splicing of zinc finger E-box binding homeobox 2 (Zeb2) mRNA 5′UTR intron, that contain an internal ribosome entry site (IRES) element, and so increases Zeb2 protein expression by promoting cap-independent translation [9]. APOA4-AS, an antisense RNA expressed in liver of mice and patients with fatty liver diseases, interacts with HuR protein to stabilize apolipoprotein A-IV (APOA4) mRNA [10]. As well, Wrap53 is an antisense of p53 mRNA that binds and stabilizes/induces its complementary mRNA [11].

Other lncRNAs can sequester mRNA and prevent their expression. It is the case of the long non-coding RNA NEAT1 that has the ability to form a nuclear body, the paraspeckle. NEAT1 is essential for paraspeckle formation that occurs during certain physiological processes such as muscle differentiation, mitosis or apoptosis [12–15], and during stresses and pathologies like viral infection, hypoxia, or myocardial infarction [16–20]. Edited RNAs (adenosine to inosine) are retained in the paraspeckle, preventing their export from nucleus and subsequent translation in the cytoplasm. Moreover, paraspeckles also retain proteins, mostly RBPs and transcription factors [21–23]. MALAT1 lncRNA is located in the speckles, nuclear bodies implicated in the storage of splicing factors. MALAT1 has been shown to interact with transcriptionally active genes, thus is implicated in transcription regulation and is considered as a scaffold for protein-protein, RNA-protein and DNA-protein interaction [24–26].

In addition to these numerous functions, lncRNAs impact translational control. Although rarely addressed in review articles on lncRNAs, this function is crucial and involves several mechanisms. First of all, lncRNAs have a crucial role of competing endogenous RNAs (ceRNAs) by acting as miRNA sponges [27,28]. By this way they suppress the translational blockade generated by miRNAs. LncRNAs can also be precursors for miRNA biogenesis or compete with miRNA for a same mRNA target. In addition, translation is directly regulated by lncRNAs at multiple levels, starting from the control of ribosome biosynthesis that affects overall translation. LncRNAs are found interacting with ribosomes or regulating modifications of ribosomal proteins. Several of them can interact with translation initiation or elongation factors, with RBPs, or be implied in RBP post-translational modifications. Furthermore, lncRNAs are implicated in mRNA methylation, notably N^6 methyl-adenosine (m^6A) modification, the most common modification of RNA in eukaryotes. m^6A is a dynamic modification present in mRNAs and lncRNAs [4,29]. This mark regulates gene expression at different levels, from splicing to translation. It has been shown that a single m^6A modification in a mRNA 5' untranslated region (UTR) is sufficient to drive cap-independent translation [30]. Finally, lncRNAs can affect translation initiation, particularly IRES-dependent and cap-dependent translation. These different mechanisms of action are summarized in Fig. 1 and will be detailed below (Fig. 1). All the lncRNAs described below are listed in Table 1.

2. Impact of lncRNAs on miRNA-mediated translational blockade

2.1. Competing endogenous lncRNAs or miRNA sponges

Many reports have described a role of miRNA sponge for lncRNAs [31]. Such lncRNAs are called ceRNAs: they contain miRNA binding sites and by this way sequester specific miRNAs, possibly generating their degradation [27,28]. These miRNA sponges prevent translational blockade by miRNAs and thus behave as translational activators. A given lncRNA can contain several sites for the same miRNA, or binding sites for different miRNAs. The probability for a given lncRNA to bind miRNAs increases with its length, as the miRNA core seed sequence is only 6–8 nucleotides long [32].

One of the best documented lncRNAs in the field is Long Intergenic Non-Protein Coding RNA, P53 Induced Transcript (LINC-PINT)(Fig. 1A) [33]. This lncRNA is a p53-induced long intergenic noncoding transcript with a tumor suppressor function. LINC-PINT acts by different mechanisms of action including epigenetic modification, ceRNA function and host gene for a circRNA producing a peptide. The LINC-PINT gene is located on chromosome 7 in human and exhibits a large diversity in length, from 387 to 3505 nt, due to alternative splicing. LINC-PINT interacts with at least ten different miRNAs and this has consequences in inhibition of cell growth and metastatic tumor invasion in different cancers (for a review, see Ref. [33]).

Another interesting example of miRNA sponge is the lncRNA NEAT1. This long lncRNA, present as two isoforms of 3.7 and 22.7 kb long in human, is the backbone of a nuclear body, the paraspeckle, appearing during cell differentiation and during stress [34–36]. NEAT1 is described in the bibliography as a miRNA sponge for more than twenty different miRNAs. This lncRNA is up-regulated in many cancers and its role seems opposed to that of LINC-PINT.

PTENP1 acts as a sponge for several miRNAs targeting PTEN mRNA [37]. It affects the progression of different cancers: the down-regulation of miRNA action results in the increase of PTEN mRNA translation and in the decrease of cell proliferation, migration, invasion and colony formation. Thus, PTENP1 has a tumor suppressor effect. The role of PTENP1 in disease is wide: it is also involved in osteopenia, osteoporosis and cardiac dysfunction.

Circular RNAs can also act as miRNA sponges. It is the case of circular RNA sponge for miR-7 (ciRS-7). This circRNA, expressed in human and mouse brain, contains more than 70 miRNA binding sites. It interacts with argonaute proteins (AGO) and facilitates miR-7 interaction with AGO [38]. By inhibiting miR-7 regulatory effect, CiRS-7 acts as a promoter of tumor progression and is involved in the development of different cancers as well as in neurological disorders [39]. The same authors have shown that the testis specific circRNA sex-determining region Y (Sry) is a sponge for miR-118, with 16 putative binding sites for this miRNA. Presently, the role of miRNA sponge is known as a major mode of action of circRNAs [4].

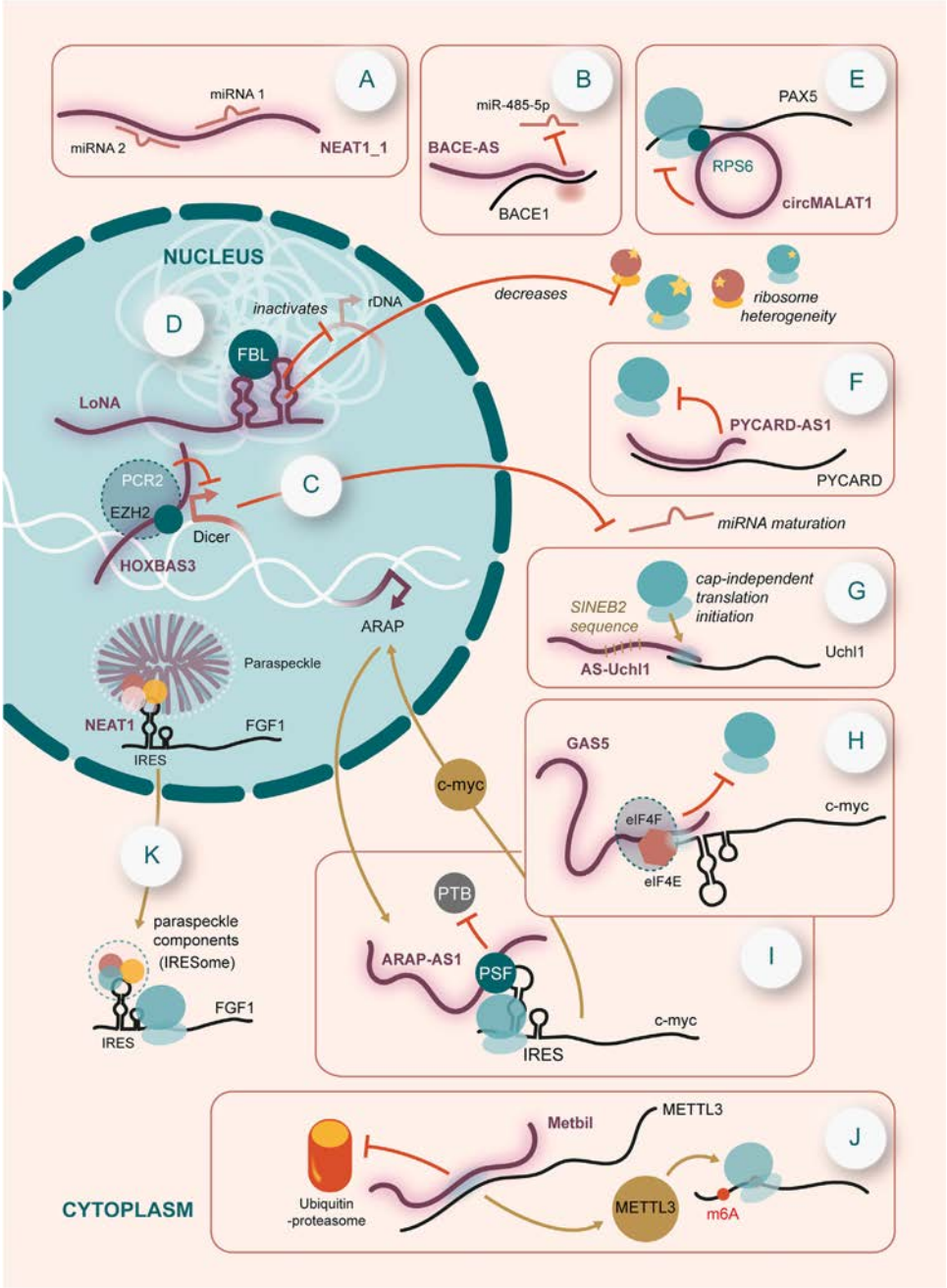


Fig. 1. Schema of the different mechanisms of translational control by lncRNAs. LncRNAs can regulate translation by eleven reported mechanisms (see text). An example is represented for each of them. (A) MiRNA sponge. (B) Masking miRNA binding site. (C) Blockade of miRNA maturation. (D) Ribosome biogenesis. (E) Association with ribosome. (F–G) Interaction with mRNA generating translation inhibition (F) or activation (G). (H) Interaction with translation initiation or elongation factors. (I) Interaction with RBPs. (J) Impact on post-translational modifications of translational regulatory proteins. (K) Translational control by paraspeckle.

Table 1
LncRNAs regulate translation by different mechanisms and are involved in different pathologies.

LncRNA	Mechanism of action	Disease	References
LINC-PINT	miRNA sponge	Cancer (tumor suppressor)	[33]
NEAT1	miRNA sponge, recruitment of mRNAs with IRESs to paraspeckle, translational activator	Cancer (tumor promoter)	[34–36,83]
BACE-AS	Masking of miRNA binding site on mRNA	Alzheimer's disease	[37]
PTB-AS	Masking of miRNA binding site on mRNA	Gliomagenesis	[38,39]
PTENP1	miRNA sponge	Cancer (tumor suppressor), osteopenia, osteoporosis, cardiac dysfunction	[40]
ciRS-7	miRNA sponge	Cancer (tumor promoter), neurological disorders, Parkinson's diseases	[41,42]
Sry	miRNA sponge	Spermatogenesis dysfunction	[41]
LOC554202	miRNA biogenesis	Cancer (metastasis suppressor)	[43]
Lnc-pri-miR-122	miRNA biogenesis	Non-alcoholic fatty liver disease, liver diseases, liver cancer (tumor suppressor)	[44]
HOXB-AS3	miRNA biogenesis, ribosome biogenesis	Liver cancer	[45,54]
SLERT	rRNA transcription, RBP binding, stimulation of mRNA m6A methylation	Cancer (tumor promoter), Activator of metastatic invasion	[46,47,82]
LoNA	rRNA transcription and methylation	Alzheimer's disease	[48]
SAMSSON	Ribosome maturation	Melanoma	[49]
IGS-RNAs	Ribosome biogenesis blockade	Cancer	[50,51]
ZFAS	Ribosome biogenesis, miRNA sponge	Breast cancer (tumor promoter)	[52,53]
CircMALAT1	Complex with ribosomes, ribosome heterogeneity, miRNA sponge	Cancer (tumor promoter)	[55]
TRMP	Interaction with RNP, ITAF sequestration	Cancer (tumor promoter)	[56]
TRMP-S	Interaction with a ribosomal protein	Cancer (tumor promoter), inhibitor of senescence	[57]
LISR	Generation of cancer-specific ribosomes, ribosome heterogeneity	Cancer (tumor promoter, stimulates immune evasion)	[58]
LincRNA-p21	Interaction with mRNAs, translational repressor	Cancer (tumor promoter)	[59]
PYCARD-AS1	Interaction with mRNA, translational repressor	Cancer (anti-apoptotic activity)	[60]
LncRNA-PXN-AS1-002	Interaction with mRNA, competition miRNA binding	Cancer (tumor promoter)	[61]
LncRNA-PXN-AS1-S	Interaction with mRNA, blockade of translation elongation	Cancer (tumor suppressor)	[61]
TINCR	Interaction with mRNA, translational reprogramming	Cancer (suppressor of melanoma dissemination)	[62]
AS-RBM15	Interaction with mRNA, translational activator	Cancer (tumor promoter)	[63]
GMAN	Interaction with mRNA, interaction with translation initiation factor 4B and with lncRNA GMAN-AS, translational activator	Cancer, activator of gastric tumor invasion and hepatocellular carcinoma progression, anti-apoptotic activity	[64,65]
GMAN-AS	Interaction with mRNA and with lncRNA GMAN, translational inhibitor	Cancer (tumor suppressor)	[64]
Lnc-31	Interaction with mRNA, translational activator	Myogenesis inhibition, cancer (tumor promoter)	[66]
SA-Uchl1	Interaction with mRNA, translational activator	Alzheimer's and Parkinson's diseases	[67]
SINEUP RNAs	Interaction with mRNA, translational activator	Development of RNA-based therapeutics	[68]
R12A-AS1	Interaction with mRNA, translational activator	Non described	[69]
PU1-AS	Interaction with translation initiation factor 4A, translational inhibitor	Anti-inflammatory activity	[71]
treRNA	Interaction with translation initiation factor 4G1, translational inhibitor	Cancer (tumor invasion promoter)	[72]
GAS5	Interaction with translation initiation factor 4E, translational inhibitor, miRNA sponge	Cancer (tumor suppressor), promoter of lymphangiogenesis and diabetic wound healing	[73,74]
circBACH1	Interaction with RBP	Cancer (tumor promoter)	[75]
UCA1	Interaction with RBP (ITAF), inhibitor of IRES-dependent translation	Cancer (tumor promoter)	[76]
ARAP-AS1	Interaction with RBP (ITAF), activator of IRES-dependent translation	Cancer (tumor promoter)	[77,78]
LncMyoD	Interaction with RBP, translational activator	Muscle regeneration	[79]
HULC	Interaction with RBP, translational activator	Cancer (tumor promoter)	[80]
Metbil	Interaction with RBP, translational activator, stimulator of mRNA m6A methylation	Myocardial infarction, pro-fibrotic factor	[81]

LncRNAs mentioned in the present review article are listed here, with their mechanisms of action, their involvement in pathologies and the corresponding references. Please note that this list is not exhaustive.

LncRNAs can also compete with miRNAs for the same mRNA target and thus inhibit miRNA activity. It is the mechanism of action of the antisense transcript for beta-secretase-1 (BACE1), an enzyme involved in Alzheimer's disease pathophysiology. Faghihi et al. have shown that lncRNA BACE-AS is able to mask the binding site for miR-485-5p on the BACE1 mRNA, and by this way prevents the miRNA-induced repression of BACE1 mRNA expression (Fig. 1B) [40].

Another example is the lncRNA PTB-AS, a natural antisense of the pyrimidine tract binding protein 1 (PTB1) mRNA. PTB-AS binds the PTB1 mRNA 3′UTR, masking by this way the miR-9 binding site [41]. This results in an increased level of PTB1 protein which contributes to gliomagenesis. In addition to preventing the translational silencing of PTB1 mRNA by miR-9, PTB-AS has also an activator effect on IRES-dependent translation, as PTB1 is an IRES-transacting factor [42].

2.2. MiRNA biogenesis

LncRNAs may be involved in miRNA biogenesis. By example, the lncRNA LOC554202 is the host gene of miR-31 [43]. MiR-31 maps in an intronic sequence and its transcription is controlled by the lncRNA. MiR-31 is a metastasis suppressor and its expression is lost in triple negative breast cancer.

A different mode of action has been characterized for the liver-specific lnc-pri-miR-122 [44]. Dhir et al. report that the two identified isoforms of lnc-pri-miRNA-122 transcript do not use the canonical cleavage and polyadenylation pathway. They describe a microprocessor complex containing the RNase III Drosha protein, able to release a 70 nt long pre-miRNA that will be exported and processed by Dicer.

A third mode of action impacting miRNA biogenesis is provided by lncRNA HOXB-AS3 (Fig. 1C). This lncRNA interacts with enhancer

of zeste homolog 2 (EZH2), a subunit of the polycomb repressive complex 2 (PRC2) [45]. Such interaction promotes EZH2 binding to the Dicer promoter and repression of Dicer expression. Consequently, miRNA maturation is blocked and translation of many mRNAs is enhanced. This mechanism plays an important role in resistance to sorafenib and cancer stemness in liver cancer.

3. Regulation of ribosome biosynthesis and assembly by lncRNAs

Ribosome biosynthesis starts with rRNA transcription and modifications in the nucleolus. A first mechanism of lncRNA implication in regulation of translation begins with the control ribosome biosynthesis. SnoRNA-ended lncRNA enhances pre-ribosomal RNA transcription (SLERT) lncRNA regulates RNA polymerase I activity [46,47]. This lncRNA is flanked by two box H/ACA snoRNAs at its ends, that are responsible for its nucleolar localization. Its non-snoRNA region promotes pre-rRNA transcription. SLERT interacts with DDX21 helicase, which forms ring-shaped arrangements around RNA polymerase I complexes. This ring contains about 10 000 DDX21 molecules. Two or three molecules of SLERT RNA are sufficient to modify the ring conformation and induce an increase of RNA polI activity. By this mechanism, SLERT promotes tumorigenesis.

LoNA, another long nucleolus-specific lncRNA identified in the brain of trained mice, also regulates rRNA transcription [48]. This lncRNA is abundant in the nucleus of hippocampal neurones. LoNA possesses two exons, one intron, and sizes 1.5 kb in its mature form with a poly(A) tail but without a cap-structure. Its transcription is dependent on RNA polymerase III, as for 5S rRNA. LoNA has been found to coordinate rRNA transcription by acting at different levels: firstly it inactivates the chromatin of rDNA promoters, lowering rDNA transcription. This effect is due to nucleolin binding to its 5′ region: LoNA sequesters the nucleolar protein, leading to rDNA silencing. Secondly LoNA binds fibrillarin (FBL) that 2′O-methylates rRNAs, due to a snoRNA-structure present in its 3′ region (Fig. 1D). This diminution of FBL activity leads to a decrease in ribosome heterogeneity. As a consequence, global translation is affected by FBL depletion or overexpression as well. LoNA alters polysomes distribution: its extinction drives an increase in translation measured by the polysomes/monosomes ratio. The presence of two pre- and postsynaptic markers, synaptophysin and postsynaptic density-95 (PSD-95) mRNAs, in heavy polysome fractions after LoNA extinction, indicates that the impact of LoNA on polysome distribution leads to a modification of synaptic plasticity. Finally, as seen in APP/PS1 transgenic mice, a model of Alzheimer disease, LoNA impairment leads to improved learning and memory [48].

SAMMSON, a lineage-specific lncRNA overexpressed in cutaneous melanoma, ensures maturation of both mitochondrial and cytosolic ribosomes [49]. It interacts with p32, a mitochondrial protein necessary for mitochondrial rRNA maturation, and promotes p32 targeting to mitochondria. In addition, SAMMSON interacts with 5′-3′ exoribonuclease 2 (XRN2) and with collaborator of ARF, the product of the CDKN2AIP gene (CARF), two proteins involved in cytosolic ribosome biogenesis.

Several intergenic spacers (IGS) located between the ribosomal DNA (rDNA) tandem repeats produce lncRNAs [50]. These IGS-RNAs immobilize proteins such as HSP70, DNMT1, POLD2 or VHL as they contain a pH-dependent nucleolar sequestration motif. IGS lncRNAs generate the formation of a subnucleolar structure, the detention center (DC), which is accompanied by the redistribution of nucleolar factors and blockade of ribosomal biogenesis [51].

Certain lncRNAs affect ribosomal protein expression and post-translational modifications. In developing mammary gland, ZFAS1 lncRNA is expressed from antisense strand of the promoter region of Znfx1. Its expression is restricted to the epithelial cells of mammary gland, and its knock-down increases differentiation and proliferation of these cells. ZFAS1 is expressed as well in various cancer cell lines independently of Znfx1. ZFAS1 is associated with the 40S small ribosomal subunit and its expression is correlated with the expression of genes coding ribosomal proteins (RP) such as RPS21, RPS24, RPL22 or RPL28. Moreover, ZFAS1 expression increases during ribosome biogenesis. Finally, Hansji et al. discovered that ZFAS1 is implicated in RPS6 phosphorylation and may be implicated in early stages of ribosome induction or production [52]. In addition to its role in ribosome biogenesis, one must note that ZFAS1 also functions as a miRNA sponge [53].

Another example of lncRNA implicated in ribosome biogenesis is HOXB-AS3, already mentioned above for its role in miRNA maturation [54]. This additional function does not involve its antisense feature. HOXB-AS3 is mostly localized in the nucleus and regulates rDNA transcription by interacting with ErbB3 binding protein 1 (EBP1) and guiding this transcriptional activator to rDNA locus. HOXB-AS3 extinction leads to a decrease in overall protein synthesis. HOXB-AS3 is aberrantly overexpressed in acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin 1 (NPM1) and stimulates leukemic blasts proliferation. EBP1 is known to interact with NPM1 in the nucleus, and HOXB-AS3 is able to enhance this interaction. The HOXB-AS3-EBP1-NPM1 complex regulates both rRNA maturation and rRNA transcription [54].

4. LncRNAs associated with ribosomes or with ribosomal proteins

LncRNAs can also modulate translation by interacting with ribosomes. MALAT1 produces a circRNA, circMALAT1, that can base-pair with 11 nt of paired box 5 (PAX5) mRNA in its coding sequence (CDS) [55]. CircMALAT1 forms a complex with ribosomes and PAX5 tumor suppressor mRNA. It interacts with RPS6 protein and with PAX5 mRNA via a 11 nt sequence located in the open reading frame (ORF). By this mechanism, circMALAT1 silences the synthesis of PAX5 protein (Fig. 1E). Thereby the authors propose that circMALAT1 acts as a “translation brake” to prevent PAX5 mRNA translation by interacting with PAX5 mRNA and competitively binding ribosomes [55]. The same authors describe a role of miRNA sponge for circMALAT1. This shows again that a given lncRNA, circular or linear, can act by different mechanisms.

LncRNA RP11-369C8.1 undergoes alternative splicing. A first splicing variant named TP53-induced modulator of P27 (TRMP) suppresses the tumor suppressor $p27^{kip}$ mRNA translation by interacting with a RNP, a mechanism that will be described below [56]. More recently, a shorter splicing variant TRMP-S has been described [57]. TRMP-S inhibits p53 mRNA translation by interacting with RPL26, a positive regulator of p53 mRNA translation. TRMP-S promotes cell growth and inhibits cellular senescence. Shuai et al. have shown that TRMP-S forms a complex with the far-upstream element-binding protein 3 (FUBP3) and with RPL26 [57]. This complex sequesters RPL26 from its interaction with the P53 mRNA.

LncRNA association to ribosome also confers ribosome heterogeneity [58]. LncRNA ISR regulator (LISR) is strongly enriched in polysomes after integrated stress response (ISR) activation, and its expression correlates with resistance to immunotherapy. LISR recruits deleted in azoospermia associated protein 1 (DAZAP1) to ribosomes. The authors have shown that LISR regulates the translation of mRNAs involved in immunoregulation. Thus LISR stimulates tumor progression and immune evasion.

5. LncRNAs interacting with mRNAs

LncRNAs can affect translation by a direct interaction with mRNAs. This can lead to translational inhibition or activation through various mechanisms.

5.1. Translational inhibitors

Yoon et al. showed that lincRNA-p21 interacts with β-catenin and junB mRNAs and represses their translation [59]. This association is promoted by the helicase rck/p54/DDX6, that acts as an oncogene in several cancers. In contrast, the RNA-binding protein HuR prevents this translational inhibition by interacting with lincRNA-p21 and destabilizing it.

PYCARD-AS1 antisense RNA prevents PYCARD mRNA translation by interacting with the 5′UTR of the mRNA [60]. PYCARD is a pro-apoptotic gene. Its antisense lncRNA PYCARD-AS1 is transcribed from the opposite DNA strand and is composed of two exons, the second one corresponding to the region in 5′ of the transcription start site of PYCARD. PYCARD-AS1 is present in the nucleus as well as in the cytoplasm. Also described for its role in chromatin remodelling leading to repression of PYCARD transcription, PYCARD-AS1 can bind to PYCARD mRNA. Silencing the antisense lncRNA has no effect on PYCARD mRNA stability, but increases its translation, as seen by a shift of the mRNA to heavier polysome fractions with PYCARD-AS1 extinction (Fig. 1F). The authors thus stated that PYCARD-AS1 prevents or affects ribosome assembly on PYCARD mRNA. This example shows that an antisense lncRNA can act at both epigenetic and translational levels. PYCARD-AS1 has an anti-apoptotic effect by repressing PYCARD expression [60].

Yuan et al. has shown that a lncRNA can displace elongation factors to inhibit translation elongation [61]. LncRNA-PXN-AS1, an antisense RNA coded by the paxillin (PXN) locus, exists as two splicing isoforms. PXN protein has oncogenic roles in many cancers. The alternative splicing of lncRNA-PXN-AS1 is regulated by the tumorigenic oncofetal splicing factor muscleblind-like3 (MBNL3) that promotes inclusion of exon 4. The two lncRNA isoforms bind competitively to the PXN mRNA, while they have different effects on their sense gene PXN. LncRNA-PXN-AS1-002, with exon 4, binds to the PXN mRNA 3′UTR and protects it from miRNA-24-AGO2 targeting, while lncRNA-PXN-AS1-S inhibits protein synthesis of PXN by decreasing ribosome elongation rate. In fact, the AS RNA without exon 4 reduces the interaction between PXN mRNA and elongation factors (eEF1A, eEF1B, eEF1D, eEF2) by binding to the mRNA coding sequence (CDS), and downregulates PXN protein expression accordingly. Thus, in this case, two lncRNA isoforms have opposite roles depending on splicing regulation by MBNL3. Tumorigenic function of MBNL3 is mediated by its regulatory role on PXN and AS-PXN expression [61].

Another example of lncRNA able to repress translation is TINCR [62]. This lncRNA interacts with several mRNAs involved in ISR and reduces their binding to ribosome, resulting in a translational reprogramming. In particular, it prevents ATF4 mRNA translation, which suppresses melanoma dissemination. Interestingly, this mechanism is independent of the eIF4E and eIF2α-dependent pathways that block translation during stress.

5.2. Translational activators

Antisense lncRNAs can also act as translation activators. The *rbm15* locus generates an antisense lncRNA, AS-RBM15, downstream from its transcription start site [63]. AS-RBM15 RNA has a pro-differentiating effect on megakaryocytes progenitors. AS-RBM15 overexpression increases RNA binding motif 15 (RBM15) protein expression but not its mRNA level. The authors have shown that AS-RBM15 intervenes at the translational level, via a direct interaction with the 5′UTR of RBM15 mRNA promoting the increase of cap-dependent translation. RBM15 mRNA and AS-RBM15 expression are controlled by Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) transcription factor, a master regulator of haematopoiesis, and repressed by RUNX1-ETO, a leukemic fusion protein. Thus AS-RBM15 may play a role in leukemogenesis.

In a bit different way, gastric cancer metastasis associated long non coding RNA (GMAN), expressed from ephrin A1 cluster, promotes ephrin A1 protein expression without impacting mRNA level [64]. GMAN extinction leads to a decrease of invasive activity of gastric tumour cells, and a xenograft in nude mice of cells depleted for GMAN conducts to fewer metastasis. Interestingly, the authors identified an antisense RNA to GMAN lncRNA, called GMAN-AS. In fact, this AS RNA inhibits ephrin A1 mRNA translation by binding to ephrin A1 mRNA, and GMAN RNA binds GMAN-AS in a competitive manner to prevent this inhibition. The authors have shown that the ratio GMAN:GMAN-AS is correlated with ephrin A1 protein level and outcome of patients. This study is a beautiful example of regulation of translational balance by two lncRNAs, depending on sense and antisense lncRNA availability [64,65].

LncRNA lnc-31 is also a translational activator, that interacts with the Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 (Rock1) mRNA 5′UTR through a 22 nt base-pairing [66]. The proposed mechanism is that lnc-31, when bound to Rock1 mRNA, can stabilize the translation activating protein YB1, and stimulates by this way Rock1 translation. Due to the differentiation-repressing activity of ROCK1 protein, lnc-31 promotes cell proliferation and prevents myoblast differentiation.

LncRNA AS-Uchl1 is a translational activator of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL1) protein synthesis [67]. UCHL1 is a deubiquitination enzyme expressed in neurones, that is related to Alzeimer and Parkinson diseases. Its Antisense RNA, AS-Uchl1, overlaps the first 73 nt of Uchl1 mRNA including the AUG codon. Carrieri et al. discovered that translational enhancement requires a repetitive element Short Interspersed Nuclear Element B2 (SINEB2) present in the lncRNA [67](Fig. 1G). LncRNA AS-Uchl1 promotes cap-independent translation initiation of Uchl1 mRNA in condition of stress. The antisense overlap confers the specificity of the target and the SINEB2 sequence allows protein expression induction. Thus this mechanism can apply to other mRNAs if the target sequence is changed. This category of lncRNAs has been called SINEUP lncRNA by Zucchelli et al. [68]. Another SINEUP lncRNA has been described, lncRNA R12A-AS1, that increases PPP1R12A mRNA translation in human cells [69]. SINEUP RNAs provide a biotechnological tool to increase protein expression in therapy as well as for protein manufacturing. Interestingly, PTB and heterogenous ribonucleoprotein K (hnRNPK) play a key role in SINEUP RNA nucleocytoplasmic shuttling and translation enhancing [70].

6. LncRNAs that interact with translation initiation or elongation factors

Another mechanism involves lncRNAs that promote or prevent translation initiation or elongation factor recruitment.

PU.1 is a transcription factor specific of haematopoietic lineage, critical for haematopoiesis: a slight modification of its expression level can lead to lymphoma and leukemia. Ebralidze et al. have discovered that the PU.1 gene expresses antisense RNAs whose transcription start site is in PU.1 intron 3 and whose 3' ends are heterogenous [71]. Knock-down of PU.1-AS leads to an increase in PU.1 mRNA and protein levels in total cellular extracts. Thus PU.1 expression is modulated by the balance of functional sense and antisense RNAs. PU.1-AS negatively affects translation of PU.1 mRNA by interacting with the translation initiation factor eIF4A

and interfering with formation of elongating eEF1A-PU.1 mRNA complexes. This suggests that PU.1-AS stalls translation between the initiation and elongation steps, thus preventing PU.1 mRNA translation in cells where the haematopoiesis transcription factor is not needed [71].

Another report has shown a translational regulatory lncRNA (treRNA) overexpressed in lymph node metastatic human breast cancer samples and statistically associated with cancer progression [72]. This treRNA promotes tumour invasion in *vitro* and tumour metastasis in *vivo*. Gumireddy et al. discovered that treRNA suppresses E-cadherin mRNA translation by forming an RNP with the proteins hnRNPK, FXR1, FXR2, PUF60, and SF3B3. This RNP inhibits translation by binding to initiation factor eIF4G1, potentially preventing its action in eIF4F complex. This mechanism is dependent on the 3′UTR of E-cadherin mRNA [72].

More directly, lncRNA growth-arrest specific 5 (GAS5) is able to repress the translation of its targets by interacting with translation initiation factors, as shown by Hu et al. [73]. This lncRNA is essential for regulation of cell apoptosis and growth and is suppressed in many cancers. In lymphoma cells, GAS5 is recruited to the translation initiation complex eIF4F, via a direct interaction with the cap-binding protein eIF4E, and is able to specifically bind the c-myc mRNA (Fig. 1H). This results in suppression of c-myc mRNA translation. GAS5 also acts as a miRNA sponge, particularly for miR-217. GAS5 up-regulates Prox1 and promotes lymphangiogenesis and diabetic wound healing [73,74].

7. LncRNAs interacting with RBPs

CircRNA CircBACH1 binds the protein HuR, an inhibitor of p27 mRNA translation. P27 is an important member of the cyclin-dependent kinase inhibitor family. CircBACH1 promotes the translocation of HuR from nucleus to cytoplasm, which results in inhibition of p27 protein synthesis [75]. By this mechanism, CircBACH1 behaves as an oncogene and accelerates hepatocellular carcinoma development.

Several lncRNAs control IRES-dependent translation via RNP binding. This type of translation occurs in particular during stress or physiological processes where the cap-dependent translation is blocked. IRESs are secondary structures present in 5′UTR of certain mRNAs, able to direct the internal recruitment of the ribosomal subunit without requiring a cap recognition by the cap-binding complex [42]. Huang et al. have been the first to show a role of IRES *trans*-acting factor (ITAF) for a lncRNA [76]. Urothelial carcinoma associated 1 (UCA1) is a long non-coding RNA expressed in bladder transitional cell carcinoma. It interacts with hnRNPI, a positive ITAF also known as PTB1. PTB1 activates the IRES-dependent translation of the $p27^{kip}$ mRNA, while UCA1 prevents translation of this mRNA by sequestering PTB1. By this way, UCA1 promotes cell growth and tumorigenesis, because p27 is a tumour suppressor and controls the cell cycle. P27 decreased expression leads to an increased tumorigenesis [76].

Interestingly, the lncRNA TRMP mentioned above, the longer splicing variant of lncRNA RP11-369C8.1, suppresses p27 mRNA translation by the same mechanism of PTB1 sequestering [56].

While the above lncRNAs can be considered as negative ITAFs, the oncogenic lncRNA ankyrin repeat and PH domain 1 (ARAP1)-AS1 is a positive ITAF, activator of c-myc mRNA translation. This nuclear lncRNA is upregulated in colorectal cancer. Its expression correlates with metastases and advanced cancer stage as well as large tumour size. It promotes also cell proliferation and invasion *in vitro* and *in vivo*. Although it has been described as a sponge for several miRNAs, ARAP1-AS1 also directly acts on c-myc mRNA translation by interacting with polypyrimidine splicing factor (PSF), also named splicing factor proline and glutamine-rich (SFPQ) [77]. PSF binds PTB and both of them are ITAFs of the c-myc IRES [78]. ARAP1-AS1 binding to PSF dissociates the PSF/PTB dimer, resulting in enhanced translation of the c-myc mRNA. Interestingly, ARAP1-AS1 transcription is induced by c-myc transcription factor [77] (Fig. 1I).

LncRNA lncMyoD is expressed at a locus 30 kb upstream from myoD, a master gene regulating myogenesis [79]. It is induced by MyoD during early myoblast differentiation and muscle regeneration. Gong et al. have shown that lncMyoD directly interacts with IGF2 mRNA binding protein 2 (IMP2), a protein able to enhance the translation of its own mRNA and of proliferation gene mRNAs such as N-Ras or c-myc. Thus LncMyoD, by binding IMP2 protein, downregulates the translation of its mRNA as well as of mRNAs involved in cell proliferation. The MyoD-lncMyoD-IMP2 pathway reveals the mechanism used by MyoD to block myoblast proliferation and generate a permissive state for differentiation [79].

8. LncRNA impacting the post-translational modifications of translational regulatory proteins

LncRNAs can impact the post-translational modifications of RBPs implicated in translation. Highly up-regulated in liver cancer (HULC) long non-coding RNA is involved in such a mechanism [80]. HULC lncRNA high expression in liver cancer is associated with tumour grade and poor outcome for hepatocellular carcinoma (HCC) patients. HULC interacts with the translational repressor YB-1 and promotes the phosphorylation of the protein, generating the release of the YB-1 from its bound mRNA. This results on activated translation of oncogenic mRNAs.

The latest is the case for GMAN, already mentioned above, expressed from Ephrin A1 gene cluster and associated with HCC progression. Xu et al. discovered that GMAN interacts with eIF4B and promotes its phosphorylation at serine 422 [65]. GMAN acts by preventing the binding of the protein phosphatase 2A subunit B (PPP2R2A) to eIF4B and the subsequent dephosphorylation of the protein. The interaction of GMAN with eIF4B activates the p-eIF4B/anti-apoptotic protein pathway by activating the translation of mRNAs coding anti-apoptotic proteins such as BCL2, BCL6 and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP).

LncRNAs are also implicated in mRNA methylation, notably N^6 methyladenosine (m^6A) modification, the most common modification of RNA in eukaryotes. m^6A are dynamic modifications present in mRNAs and lncRNAs including circRNAs [4,29]. These marks regulate gene expression at different levels, from splicing to translation. It has been shown that a single m^6A modification in a mRNA 5′UTR is sufficient to drive a cap-independent translation [30].

METTL3 binding lncRNA (Metbil), that is significantly increased in fibrotic tissues following myocardial infarction, protects methyltransferase-like 3 (METTL3) from ubiquitin-proteasome degradation (Fig. 1J) [81]. METTL3 is a key component of the m6A methyltransferase complex. By this mechanism Metbil positively impacts the translation of m6A modified mRNAs. Metbil regulates activation and collagen production of cardiac fibroblasts and is a pro-fibrotic factor.

METTL3 binding has also been reported for lncRNA SLERT. SLERT is involved in metastasis progression by promoting endothelial cell migration and invasion. Its interaction with METTL3 increases the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA m6A modification [82].

9. Translational control by paraspeckle components: the case of NEAT1

LncRNA NEAT1, described above as a sponge for at least 20 miRNAs, is also able to activate translation by a unique mechanism. In our recent report by Godet, Roussel et al., we have discovered a new function for NEAT1 [83]. This lncRNA is an essential component of the paraspeckle, a nuclear body formed during cell differentiation and in response to stress [34–36]. Our data show that, despite this nuclear localization, the paraspeckle plays a role in translational control, and that NEAT1 is the key of this mechanism (Fig. 1K). Single-molecule inexpensive fluorescent in situ hybridization (smiFISH) experiments showed that IRES-containing mRNAs are co-localized with NEAT1 in paraspeckles, in cardiomyocytes submitted to hypoxia. A knock-down approach revealed the pivotal role of NEAT1, as well as of two main paraspeckle proteins P54^{nrb} and paraspeckles compound 1 (PSPC1), in the regulation of IRES-dependent translation. Two other proteins, nucleolin and ribosomal protein RPS2, interact with p54 and play a role of ITAF. The two NEAT1 isoforms, NEAT1_1 and NEAT1_2, conserved in human and mouse, are involved in this mechanism. Thus, NEAT1 appears as a translational activator for IRES-containing mRNAs coding (lymph)angiogenic growth factors of the fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) families, as well as cardioprotective factors such as c-myc and insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) mRNAs (Fig. 2). In contrast, NEAT1 is not required to activate encephalomyocarditis virus (EMCV) IRES, suggesting that the paraspeckle-mediated mechanism of IRES activation concerns IRES-containing cellular mRNAs, but not viral mRNAs. A polymerase chain reaction (PCR) array indicates that NEAT1 impacts the recruitment into polysomes of many IRES-containing mRNAs involved in the stress response.

Previous reports from us and others had shown that a nuclear event is required to activate translation mediated by IRES-containing mRNAs [84,85]. These recent data suggest that this nuclear event may involve the paraspeckle as an assembly platform, to pre-assemble the ribonucleoprotein complex of ITAFs with the IRES-containing mRNA named the IRESome (Fig. 2). The proposed model is that NEAT1 and paraspeckle proteins would interact with the IRES to form the IRESome. Then the mRNA would be exported to cytoplasm, with paraspeckle components having the function of ITAFs, and translated.

At the moment we do not know whether this new role of paraspeckle is universal or restricted to cardiomyocytes. However, data showing that NEAT1 knock-down affects IRES-dependent translation in breast cancer cells 67NR indicate that this role might extend to several cell types [83]. Identification of NEAT1 in the cytoplasm as well as in polysomes suggests that it may be part of

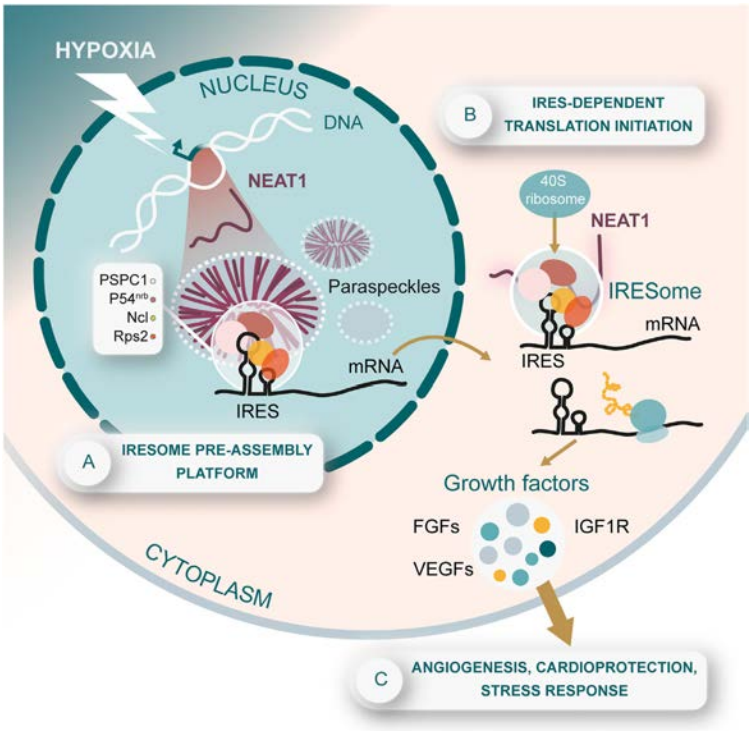


Fig. 2. Model of regulation of IRES-dependent translation by lncRNA NEAT1 in the paraspeckle. (A) In response to hypoxia NEAT1 transcription is induced, resulting in paraspeckle formation. IRES containing mRNAs are recruited to paraspeckles and IRESome assembly occurs with NEAT1 and different paraspeckle proteins exhibiting also an ITAF function. (B) The RNP complex containing the mRNA with the IRESome is exported to cytoplasm and recruited into polysomes, allowing IRES-dependent translation to occur. (C) A set of proteins involved in (lymph)angiogenesis and cardioprotection are synthesized. Growth factors are secreted. This process triggers angiogenesis, lymphangiogenesis, cardioprotection, and more widely the stress response. This model corresponds to data obtained in HL-1 cardiomyocytes, but data obtained in breast cancer cells 67NR suggest that this mechanism could generalize to other stressed cells [83].

the IRESome and play a direct role in translation [83,86]. Such a hypothesis remains to be elucidated.

10. Conclusion

This synopsis has demonstrated the important impact of lncRNAs on translational control. At least eleven different mechanisms have been identified (Fig. 1). A given lncRNA may act by different mechanisms. The number of lncRNAs involved in translational control is too important to provide an exhaustive list, thus we had to select a few examples of lncRNAs for each mechanism of action.

An important aspect emerging of this review is the pivotal role of translational control mediated by lncRNAs in various pathologies. In most cases, these lncRNAs are involved in cancer, positively or negatively [87], but we have also listed lncRNA roles in cardiovascular or neurodegenerative diseases, as well as in senescence. We can conclude that all described lncRNAs play a role in pathologies. This observation not only reveals, once again, the importance of RNA in life processes, but confirms that RNA provides a tool to develop new therapies as it has happened in the recent years.

Author contributions

A.C.G contributed to manuscript writing and drew the figures, E.R., N.L., F.M. and E.L. corrected the manuscript, B.G.S. and A.C.P. wrote and corrected the manuscript.

Acknowledgements

LYMPHACTOR team is labeled by the Fondation pour la Recherche Médicale. This work has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program named Theralymph under grant agreement no. 874708. A.C.G. and E.R. were funded by the Ligue Nationale Contre le Cancer.

References

[1] T. Derrien, R. Johnson, G. Bussotti, A. Tanzer, S. Djebali, H. Tilgner, G. Guernec, D. Martin, A. Merkel, D.G. Knowles, J. Lagarde, L. Veeravalli, X. Ruan, Y. Ruan, T. Lassmann, P. Carninci, J.B. Brown, L. Lipovich, J.M. Gonzalez, M. Thomas, C.A. Davis, R. Shiekhattar, T.R. Gingeras, T.J. Hubbard, C. Notredame, J. Harrow, R. Guigó, The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression, Genome Res. 22 (2012) 1775–1789, https://doi.org/10.1101/gr.132159.111.

[2] J.S. Mattick, P.P. Amaral, P. Carninci, S. Carpenter, H.Y. Chang, L.-L. Chen, R. Chen, C. Dean, M.E. Dinger, K.A. Fitzgerald, T.R. Gingeras, M. Guttman, T. Hirose, M. Huarte, R. Johnson, C. Kanduri, P. Kapranov, J.B. Lawrence, J.T. Lee, J.T. Mendell, T.R. Mercer, K.J. Moore, S. Nakagawa, J.L. Rinn, D.L. Spector, I. Ulitsky, Y. Wan, J.E. Wilusz, M. Wu, Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (2023), https://doi.org/10.1038/s41580-022-00566-8.

[3] J.E. Wilusz, C.K. JnBaptiste, L.Y. Lu, C.-D. Kuhn, L. Joshua-Tor, P.A. Sharp, A triple helix stabilizes the 3′ ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails, Genes Dev. 26 (2012) 2392–2407, https://doi.org/10.1101/gad.204438.112.

[4] L.H. Diallo, F. Tatin, F. David, A.-C. Godet, A. Zamora, A.-C. Prats, B. Garmy-Susini, E. Lacazette, How are circRNAs translated by non-canonical initiation mechanisms? Biochimie 164 (2019) 45–52, https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.06.015.

[5] I.M. Dykes, C. Emanueli, Transcriptional and post-transcriptional gene regulation by long non-coding RNA, genomics, Proteomics & Bioinformatics 15 (2017) 177–186, https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.12.005.

[6] X. Zhang, W. Wang, W. Zhu, J. Dong, Y. Cheng, Z. Yin, F. Shen, Mechanisms and functions of long non-coding RNAs at multiple regulatory levels, IJMS 20 (2019) 5573, https://doi.org/10.3390/ijms20225573.

[7] P. Johnsson, A. Ackley, L. Vidarsdottir, W.-O. Lui, M. Corcoran, D. Grandér, K.V. Morris, A pseudogene long-noncoding-RNA network regulates PTEN transcription and translation in human cells, Nat. Struct. Mol. Biol. 20 (2013) 440–446, https://doi.org/10.1038/nsmb.2516.

[8] S. Zhang, B.S. Zhao, A. Zhou, K. Lin, S. Zheng, Z. Lu, Y. Chen, E.P. Sulman, K. Xie, O. Bögler, S. Majumder, C. He, S. Huang, m 6 A demethylase ALKBH5 maintains tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells by sustaining FOXM1 expression and cell proliferation program, Cancer Cell 31 (2017) 591–606.e6, https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.013.

[9] M. Beltran, I. Puig, C. Peña, J.M. García, A.B. Álvarez, R. Peña, F. Bonilla, A.G. de Herreros, A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial–mesenchymal transition, Genes Dev. 22 (2008) 756–769, https://doi.org/10.1101/gad.455708.

[10] W. Qin, X. Li, L. Xie, S. Li, J. Liu, L. Jia, X. Dong, X. Ren, J. Xiao, C. Yang, Y. Zhou, Z. Chen, A long non-coding RNA, *APOA4* -AS, regulates *APOA4* expression depending on HuR in mice, Nucleic Acids Res. 44 (2016) 6423–6433, https://doi.org/10.1093/nar/gkw341.

[11] S. Mahmoudi, S. Henriksson, M. Corcoran, C. Méndez-Vidal, K.G. Wiman, M. Farnebo, Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage, Mol. Cell 64 (2016) 1009, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.027.

[12] H. Sunwoo, M.E. Dinger, J.E. Wilusz, P.P. Amaral, J.S. Mattick, D.L. Spector, *MEN ε/β* nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles, Genome Res. 19 (2009) 347–359, https://doi.org/10.1101/gr.087775.108.

[13] H. Choudhry, A. Albukhari, M. Morotti, S. Haider, D. Moralli, J. Smythies, J. Schödel, C.M. Green, C. Camps, F. Buffa, P. Ratcliffe, J. Ragoussis, A.L. Harris, D.R. Mole, Tumor hypoxia induces nuclear paraspeckle formation through HIF-2α dependent transcriptional activation of NEAT1 leading to cancer cell survival, Oncogene 34 (2015) 4482–4490, https://doi.org/10.1038/onc.2014.378.

[14] A.H. Fox, C.S. Bond, A.I. Lamond, P54nrb forms a heterodimer with PSP1 that localizes to paraspeckles in an RNA-dependent manner, MBoC 16 (2005) 5304–5315, https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0587.

[15] C. Bruelle, M. Bédard, S. Blier, M. Gauthier, A.M. Traish, M. Vincent, The mitotic phosphorylation of p54 ^{nrb} modulates its RNA binding activity, Biochem. Cell. Biol. 89 (2011) 423–433, https://doi.org/10.1139/o11-030.

[16] Q. Zhang, C.-Y. Chen, V.S.R.K. Yedavalli, K.-T. Jeang, NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression, mBio 4 (2013) e00596-12, https://doi.org/10.1128/mBio.00596-12.

[17] Z. Wang, P. Fan, Y. Zhao, S. Zhang, J. Lu, W. Xie, Y. Jiang, F. Lei, N. Xu, Y. Zhang, NEAT1 modulates herpes simplex virus-1 replication by regulating viral gene transcription, Cell. Mol. Life Sci. 74 (2017) 1117–1131, https://doi.org/10.1007/s00018-016-2398-4.

[18] F. Prinz, A. Kapeller, M. Pichler, C. Klec, The implications of the long non-coding RNA NEAT1 in non-cancerous diseases, IJMS 20 (2019) 627, https://doi.org/10.3390/ijms20030627.

[19] H. Ma, P. Han, W. Ye, H. Chen, X. Zheng, L. Cheng, L. Zhang, L. Yu, X. Wu, Z. Xu, Y. Lei, F. Zhang, The long noncoding RNA NEAT1 exerts antihantaviral effects by acting as positive feedback for RIG-I signaling, J. Virol. 91 (2017) e02250-16, https://doi.org/10.1128/JVI.02250-16.

[20] F. Kenneweg, C. Bang, K. Xiao, C.M. Boulanger, X. Loyer, S. Mazlan, B. Schroen, S. Hermans-Beijnsberger, A. Foinquinos, M.N. Hirt, T. Eschenhagen, S. Funcke, S. Stojanovic, C. Genschel, K. Schimmel, A. Just, A. Pfanne, K. Scherf, S. Dehmel, S.M. Raemon-Buettner, J. Fiedler, T. Thum, Long noncoding RNA-enriched vesicles secreted by hypoxic cardiomyocytes drive cardiac fibrosis, Mol. Ther. Nucleic Acids 18 (2019) 363–374, https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.09.003.

[21] K.V. Prasanth, S.G. Prasanth, Z. Xuan, S. Hearn, S.M. Freier, C.F. Bennett, M.Q. Zhang, D.L. Spector, Regulating gene expression through RNA nuclear retention, Cell 123 (2005) 249–263, https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.033.

[22] L.-L. Chen, G.G. Carmichael, Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA, Mol. Cell 35 (2009) 467–478, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.027.

[23] K. Imamura, N. Imamachi, G. Akizuki, M. Kumakura, A. Kawaguchi, K. Nagata, A. Kato, Y. Kawaguchi, H. Sato, M. Yoneda, C. Kai, T. Yada, Y. Suzuki, T. Yamada, T. Ozawa, K. Kaneki, T. Inoue, M. Kobayashi, T. Kodama, Y. Wada, K. Sekimizu, N. Akimitsu, Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli, Mol. Cell 53 (2014) 393–406, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.009.

[24] F. Kopp, J.T. Mendell, Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs, Cell 172 (2018) 393–407, https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011.

[25] J.A. West, C.P. Davis, H. Sunwoo, M.D. Simon, R.I. Sadreyev, P.I. Wang, M.Y. Tolstorukov, R.E. Kingston, The long noncoding RNAs NEAT1 and MALAT1 bind active chromatin sites, Mol. Cell 55 (2014) 791–802, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.07.012.

[26] R. Valgardsdottir, I. Chiodi, M. Giordano, A. Rossi, S. Bazzini, C. Ghigna, S. Riva, G. Biamonti, Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells, Nucleic Acids Res. 36 (2008) 423–434, https://doi.org/10.1093/nar/gkm1056.

[27] S. Geisler, J. Coller, RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14 (2013) 699–712, https://doi.org/10.1038/nrm3679.

[28] Q. Zhang, H. Ren, L. Ge, W. Zhang, F. Song, P. Huang, A review on the role of long non-coding RNA and microRNA network in clear cell renal cell carcinoma and its tumor microenvironment, Cancer Cell Int. 23 (2023) 16, https://doi.org/10.1186/s12935-023-02861-6.

[29] N. Liu, M. Parisien, Q. Dai, G. Zheng, C. He, T. Pan, Probing N^6 -methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA, RNA 19 (2013) 1848–1856, https://doi.org/10.1261/rna.041178.113.

[30] K.D. Meyer, D.P. Patil, J. Zhou, A. Zinoviev, M.A. Skabkin, O. Elemento, T.V. Pestova, S.-B. Qian, S.R. Jaffrey, 5′ UTR m6A promotes cap-independent translation, Cell 163 (2015) 999–1010, https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.012.

[31] M. Sebastian-delaCruz, I. Gonzalez-Moro, A. Olazagoitia-Garmendia, A. Castellanos-Rubio, I. Santin, The role of lncRNAs in gene expression regulation through mRNA stabilization, NcRNA 7 (2021) 3, https://doi.org/10.3390/ncrna7010003.

[32] J.B. Moore, S. Uchida, Functional characterization of long noncoding RNAs, Curr. Opin. Cardiol. 35 (2020) 199–206, https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000725.

[33] I. Bukhari, M.R. Khan, M.A. Hussain, R.F. Thorne, Y. Yu, B. Zhang, P. Zheng, Y. Mi, PINTology : a short history of the lncRNA LINC-PINT in different diseases, WIREs RNA 13 (2022), https://doi.org/10.1002/wrna.1705.

[34] A.H. Fox, Y.W. Lam, A.K.L. Leung, C.E. Lyon, J. Andersen, M. Mann, A.I. Lamond, Paraspeckles, Current Biology 12 (2002) 13–25, https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00632-7.

[35] C.M. Clemson, J.N. Hutchinson, S.A. Sara, A.W. Ensminger, A.H. Fox, A. Chess, J.B. Lawrence, An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles, Mol. Cell 33 (2009) 717–726, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.026.

[36] N.E. Smith, P. Spencer-Merris, A.H. Fox, J. Petersen, M.Z. Michael, The long and the short of it: NEAT1 and cancer cell metabolism, Cancers 14 (2022) 4388, https://doi.org/10.3390/cancers14184388.

[37] S. Ghafouri-Fard, T. Khoshbakht, B.M. Hussen, M. Taheri, N. Akbari Dilmaghani, A review on the role of PTENP1 in human disorders with an especial focus on tumor suppressor role of this lncRNA, Cancer Cell Int. 22 (2022) 207, https://doi.org/10.1186/s12935-022-02625-8.

[38] T.B. Hansen, T.I. Jensen, B.H. Clausen, J.B. Bramsen, B. Finsen, C.K. Damgaard, J. Kjems, Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges, Nature 495 (2013) 384–388, https://doi.org/10.1038/nature11993.

[39] J. Chen, J. Yang, X. Fei, X. Wang, K. Wang, CircRNA ciRS-7: a novel oncogene in multiple cancers, Int. J. Biol. Sci. 17 (2021) 379–389, https://doi.org/10.7150/ijbs.54292.

[40] M.A. Faghihi, M. Zhang, J. Huang, F. Modarresi, M.P. Van der Brug, M.A. Nalls, M.R. Cookson, G. St-Laurent, C. Wahlestedt, Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function, Genome Biol. 11 (2010) R56, https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-5-r56.

[41] L. Zhu, Q. Wei, Y. Qi, X. Ruan, F. Wu, L. Li, J. Zhou, W. Liu, T. Jiang, J. Zhang, B. Yin, J. Yuan, B. Qiang, W. Han, X. Peng, PTB-AS, a novel natural antisense transcript, promotes glioma progression by improving PTBP1 mRNA stability with SND1, Mol. Ther. 27 (2019) 1621–1637, https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.05.023.

[42] A.-C. Godet, F. David, F. Hantelys, F. Tatin, E. Lacazette, B. Garmy-Susini, A.-C. Prats, IRES trans-acting factors, key actors of the stress response, IJMS 20 (2019) 924, https://doi.org/10.3390/ijms20040924.

[43] K. Augoff, B. McCue, E.F. Plow, K. Sossey-Alaoui, miR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer, Mol. Cancer 11 (2012) 5, https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-5.

[44] A. Dhir, S. Dhir, N.J. Proudfoot, C.L. Jopling, Microprocessor mediates transcriptional termination of long noncoding RNA transcripts hosting microRNAs, Nat. Struct. Mol. Biol. 22 (2015) 319–327, https://doi.org/10.1038/nsmb.2982.

[45] C. Tseng, L. Chen, H. Wang, Y. Liu, S. Shiah, Transcriptional suppression of Dicer by HOXB-AS3/EZH2 complex dictates sorafenib resistance and cancer stemness, Cancer Sci. 113 (2022) 1601–1612, https://doi.org/10.1111/cas.15319.

[46] Y.-H. Xing, R.-W. Yao, Y. Zhang, C.-J. Guo, S. Jiang, G. Xu, R. Dong, L. Yang, L.-L. Chen, SLERT regulates DDX21 rings associated with pol I transcription, Cell 169 (2017) 664–678.e16, https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.011.

[47] M. Wu, G. Xu, C. Han, P.-F. Luan, Y.-H. Xing, F. Nan, L.-Z. Yang, Y. Huang, Z.-H. Yang, L. Shan, L. Yang, J. Liu, L.-L. Chen, lncRNA *SLERT* controls phase separation of FC/DFCs to facilitate Pol I transcription, Science 373 (2021) 547–555, https://doi.org/10.1126/science.abf6582.

[48] D. Li, J. Zhang, M. Wang, X. Li, H. Gong, H. Tang, L. Chen, L. Wan, Q. Liu, Activity dependent LoNA regulates translation by coordinating rRNA transcription and methylation, Nat. Commun. 9 (2018) 1726, https://doi.org/10.1038/s41467-018-04072-4.

[49] R. Vendramin, Y. Verheyden, H. Ishikawa, L. Goedert, E. Nicolas, K. Saraf, A. Armaos, R. Delli Ponti, K. Izumikawa, P. Mestdagh, D.L.J. Lafontaine, G.G. Tartaglia, N. Takahashi, J.-C. Marine, E. Leucci, SAMMSON fosters cancer cell fitness by concertedly enhancing mitochondrial and cytosolic translation, Nat. Struct. Mol. Biol. 25 (2018) 1035–1046, https://doi.org/10.1038/s41594-018-0143-4.

[50] T.E. Audas, M.D. Jacob, S. Lee, Immobilization of proteins in the nucleolus by ribosomal intergenic spacer noncoding RNA, Mol. Cell 45 (2012) 147–157, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.012.

[51] M.D. Jacob, T.E. Audas, J. Uniacke, L. Trinkle-Mulcahy, S. Lee, Environmental cues induce a long noncoding RNA–dependent remodeling of the nucleolus, MBoC 24 (2013) 2943–2953, https://doi.org/10.1091/mbc.e13-04-0223.

[52] H. Hansji, E.Y. Leung, B.C. Baguley, G.J. Finlay, D. Cameron-Smith, V.C. Figueiredo, M.E. Askarian-Amiri, ZFAS1: a long noncoding RNA associated with ribosomes in breast cancer cells, Biol. Direct 11 (2016) 62, https://doi.org/10.1186/s13062-016-0165-y.

[53] S. Ghafouri-Fard, M.J. Kamali, A. Abak, H. Shoorei, M. Taheri, LncRNA ZFAS1: role in tumorigenesis and other diseases, Biomed. Pharmacother. 142 (2021) 111999, https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111999.

[54] D. Papaioannou, A. Petri, O.M. Dovey, S. Terreri, E. Wang, F.A. Collins, L.A. Woodward, A.E. Walker, D. Nicolet, F. Pepe, P. Kumchala, M. Bill, C.J. Walker, M. Karunasiri, K. Mrózek, M.L. Gardner, V. Camilotto, N. Zitzer, J.L. Cooper, X. Cai, X. Rong-Mullins, J. Kohlschmidt, K.J. Archer, M.A. Freitas, Y. Zheng, R.J. Lee, I. Aifantis, G. Vassiliou, G. Singh, S. Kauppinen, C.D. Bloomfield, A.M. Dorrance, R. Garzon, The long non-coding RNA HOXB-AS3 regulates ribosomal RNA transcription in NPM1-mutated acute myeloid leukemia, Nat. Commun. 10 (2019) 5351, https://doi.org/10.1038/s41467-019-13259-2.

[55] L. Chen, R. Kong, C. Wu, S. Wang, Z. Liu, S. Liu, S. Li, T. Chen, C. Mao, S. Liu, Circ-MALAT1 functions as both an mRNA translation brake and a microRNA sponge to promote self-renewal of hepatocellular cancer stem cells, Adv. Sci. 7 (2020) 1900949, https://doi.org/10.1002/advs.201900949.

[56] Y. Yang, C. Wang, K. Zhao, G. Zhang, D. Wang, Y. Mei, TRMP, a p53-inducible long noncoding RNA, regulates G1/S cell cycle progression by modulating IRES-dependent p27 translation, Cell Death Dis. 9 (2018) 886, https://doi.org/10.1038/s41419-018-0884-3.

[57] T. Shuai, M.R. Khan, X.D. Zhang, J. Li, R.F. Thorne, M. Wu, F. Shao, lncRNA TRMP-S directs dual mechanisms to regulate p27-mediated cellular senescence, Mol. Ther. Nucleic Acids 24 (2021) 971–985, https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.04.004.

[58] S. Cinque, Y. Verheyden, V. Katopodi, Z. Knezevic, E. Demesmaeker, S. Adnane, S. Hanache, R. Vendramin, F. Stinkens, F. Vervloesem, A. Cuomo, J. Pozniak, A.C. Calabuig, S. Tabruyn, O. Bechter, M.F. Baietti, E. Groaz, T. Bonaldi, E. Leucci, The Generation of Cancer-specific Ribosomes by the lncRNA *LISR* Suppresses Melanoma Anti-tumour Immunity, SSRN, 2023, https://doi.org/10.2139/ssrn.4430396.

[59] J.-H. Yoon, K. Abdelmohsen, S. Srikantan, X. Yang, J.L. Martindale, S. De, M. Huarte, M. Zhan, K.G. Becker, M. Gorospe, LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation, Mol. Cell 47 (2012) 648–655, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.027.

[60] H. Miao, L. Wang, H. Zhan, J. Dai, Y. Chang, F. Wu, T. Liu, Z. Liu, C. Gao, L. Li, X. Song, A long noncoding RNA distributed in both nucleus and cytoplasm operates in the PYCARD-regulated apoptosis by coordinating the epigenetic and translational regulation, PLoS Genet. 15 (2019) e1008144, https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008144.

[61] J. Yuan, X. Liu, T. Wang, W. Pan, Q. Tao, W. Zhou, F. Wang, S. Sun, The MBNL3 splicing factor promotes hepatocellular carcinoma by increasing PXN expression through the alternative splicing of lncRNA-PXN-AS1, Nat. Cell Biol. 19 (2017) 820–832, https://doi.org/10.1038/ncb3538.

[62] M. Melixetian, D. Bossi, M. Mihailovich, S. Punzi, I. Barozzi, F. Marocchi, A. Cuomo, T. Bonaldi, G. Testa, J. Marine, E. Leucci, S. Minucci, P.G. Pelicci, L. Lanfrancone, Long non-coding RNA TINCR suppresses metastatic melanoma dissemination by preventing ATF4 translation, EMBO Rep. 22 (2021) e50852, https://doi.org/10.15252/embr.202050852.

[63] N. Tran, H. Su, A. Khodadadi-Jamayran, S. Lin, L. Zhang, D. Zhou, K.M. Pawlik, T.M. Townes, Y. Chen, J.C. Mulloy, X. Zhao, The AS-RBM15 lncRNA enhances RBM15 protein translation during megakaryocyte differentiation, EMBO Rep. 17 (2016) 887–900, https://doi.org/10.15252/embr.201541970.

[64] W. Zhuo, Y. Liu, S. Li, D. Guo, Q. Sun, J. Jin, X. Rao, M. Li, M. Sun, M. Jiang, Y. Xu, L. Teng, Y. Jin, J. Si, W. Liu, Y. Kang, T. Zhou, Long noncoding RNA GMAN, up-regulated in gastric cancer tissues, is associated with metastasis in patients and promotes translation of ephrin A1 by competitively binding GMAN-AS, Gastroenterology 156 (2019) 676–691.e11, https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.10.054.

[65] J. Xu, Y. Lu, Q. Liu, A. Xia, J. Zhao, X. Xu, Q. Sun, F. Qi, B. Sun, Long noncoding RNA GMAN promotes hepatocellular carcinoma progression by interacting with eIF4B, Cancer Lett. 473 (2020) 1–12, https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.12.032.

[66] D. Dimartino, A. Colantoni, M. Ballarino, J. Martone, D. Mariani, J. Danner, A. Bruckmann, G. Meister, M. Morlando, I. Bozzoni, The long non-coding RNA lnc-31 interacts with Rock1 mRNA and mediates its YB-1-Dependent translation, Cell Rep. 23 (2018) 733–740, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.101.

[67] C. Carrieri, L. Cimatti, M. Biagioli, A. Beugnet, S. Zucchelli, S. Fedele, E. Pesce, I. Ferrer, L. Collavin, C. Santoro, A.R.R. Forrest, P. Carninci, S. Biffo, E. Stupka, S. Gustincich, Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat, Nature 491 (2012) 454–457, https://doi.org/10.1038/nature11508.

[68] S. Zucchelli, D. Cotella, H. Takahashi, C. Carrieri, L. Cimatti, F. Fasolo, M. Jones, D. Sblattero, R. Sanges, C. Santoro, F. Persichetti, P. Carninci, S. Gustincich, SINEUPs: a new class of natural and synthetic antisense long non-coding RNAs that activate translation, RNA Biol. 12 (2015) 771–779, https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1060395.

[69] A. Schein, S. Zucchelli, S. Kauppinen, S. Gustincich, P. Carninci, Identification of antisense long noncoding RNAs that function as SINEUPs in human cells, Sci. Rep. 6 (2016) 33605, https://doi.org/10.1038/srep33605.

[70] N. Toki, H. Takahashi, H. Sharma, M.N.Z. Valentine, F.-U.M. Rahman,

S. Zucchelli, S. Gustincich, P. Carninci, SINEUP long non-coding RNA acts via PTBP1 and HNRNPK to promote translational initiation assemblies, Nucleic Acids Res. 48 (2020) 11626–11644, https://doi.org/10.1093/nar/gkaa814.

[71] A.K. Ebralidze, F.C. Guibal, U. Steidl, P. Zhang, S. Lee, B. Bartholdy, M.A. Jorda, V. Petkova, F. Rosenbauer, G. Huang, T. Dayaram, J. Klupp, K.B. O'Brien, B. Will, M. Hoogenkamp, K.L.B. Borden, C. Bonifer, D.G. Tenen, PU.1 expression is modulated by the balance of functional sense and antisense RNAs regulated by a shared cis -regulatory element, Genes Dev. 22 (2008) 2085–2092, https://doi.org/10.1101/gad.1654808.

[72] K. Gumireddy, A. Li, J. Yan, T. Setoyama, G.J. Johannes, U.A. Ørom, J. Tchou, Q. Liu, L. Zhang, D.W. Speicher, G.A. Calin, Q. Huang, Identification of a long non-coding RNA-associated RNP complex regulating metastasis at the translational step, EMBO J. 32 (2013) 2672–2684, https://doi.org/10.1038/emboj.2013.188.

[73] G. Hu, Z. Lou, M. Gupta, The long non-coding RNA GAS5 cooperates with the eukaryotic translation initiation factor 4E to regulate c-myc translation, PLoS One 9 (2014) e107016, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107016.

[74] Z.-Y. He, M.-T. Huang, X. Cui, S.-T. Zhou, Y. Wu, P.-H. Zhang, J. Zhou, Long noncoding RNA GAS5 accelerates diabetic wound healing and promotes lymphangiogenesis via miR-217/Prox1 axis, Mol. Cell. Endocrinol. 532 (2021) 111283, https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111283.

[75] B. Liu, G. Yang, X. Wang, J. Liu, Z. Lu, Q. Wang, B. Xu, Z. Liu, J. Li, CircBACH1 (hsa_circ_0061395) promotes hepatocellular carcinoma growth by regulating p27 repression via HuR, J. Cell. Physiol. 235 (2020) 6929–6941, https://doi.org/10.1002/jcp.29589.

[76] J. Huang, N. Zhou, K. Watabe, Z. Lu, F. Wu, M. Xu, Y.-Y. Mo, Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1), Cell Death Dis. 5 (2014), https://doi.org/10.1038/cddis.2013.541 e1008–e1008.

[77] Y. Zhang, D. Wu, D. Wang, Long non-coding RNA ARAP1-AS1 promotes tumorigenesis and metastasis through facilitating proto-oncogene c-Myc translation via dissociating PSF/PTB dimer in cervical cancer, Cancer Med. 9 (2020) 1855–1866, https://doi.org/10.1002/cam4.2860.

[78] L.C. Cobbold, K.A. Spriggs, S.J. Haines, H.C. Dobbyn, C. Hayes, C.H. de Moor, K.S. Lilley, M. Bushell, A.E. Willis, Identification of internal ribosome entry segment (IRES)- *trans* -acting factors for the myc family of IRESs, Mol. Cell Biol. 28 (2008) 40–49, https://doi.org/10.1128/MCB.01298-07.

[79] C. Gong, Z. Li, K. Ramanujan, I. Clay, Y. Zhang, S. Lemire-Brachat, D.J. Glass, A long non-coding RNA, LncMyoD, regulates skeletal muscle differentiation by blocking IMP2-mediated mRNA translation, Dev. Cell 34 (2015) 181–191, https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.05.009.

[80] D. Li, X. Liu, J. Zhou, J. Hu, D. Zhang, J. Liu, Y. Qiao, Q. Zhan, Long noncoding RNA HULC modulates the phosphorylation of YB-1 through serving as a scaffold of extracellular signal–regulated kinase and YB-1 to enhance hepatocarcinogenesis, Hepatology 65 (2017) 1612–1627, https://doi.org/10.1002/hep.29010.

[81] Y. Zhuang, T. Li, X. Hu, Y. Xie, X. Pei, C. Wang, Y. Li, J. Liu, Z. Tian, X. Zhang, L. Peng, B. Meng, H. Wu, W. Yuan, Z. Pan, Y. Lu, MetBil as a novel molecular regulator in ischemia-induced cardiac fibrosis via METTL3 -mediated m6A modification, Faseb. J. 37 (2023), https://doi.org/10.1096/fj.202201734R.

[82] J. Tian, H. Cheng, N. Wang, C. Wang, SLERT, as a novel biomarker, orchestrates endometrial cancer metastasis via regulation of BDNF/TRKB signaling, World J. Surg. Oncol. 21 (2023) 27, https://doi.org/10.1186/s12957-022-02821-w.

[83] A.-C. Godet, E. Roussel, F. David, F. Hantelys, F. Morfoisse, J. Alves, F. Pujol, I. Ader, E. Bertrand, O. Burlet-Schiltz, C. Froment, A.K. Henras, P. Vitali, E. Lacazette, F. Tatin, B. Garmy-Susini, A.-C. Prats, Long non-coding RNA Neat1 and paraspeckle components are translational regulators in hypoxia, Elife 11 (2022) e69162, https://doi.org/10.7554/eLife.69162.

[84] M. Stoneley, S.A. Chappell, C.L. Jopling, M. Dickens, M. MacFarlane, A.E. Willis, c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis, Mol. Cell Biol. 20 (2000) 1162–1169, https://doi.org/10.1128/MCB.20.4.1162-1169.2000.

[85] N. Ainaoui, F. Hantelys, E. Renaud-Gabardos, M. Bunel, F. Lopez, F. Pujol, R. Planes, E. Bahraoui, C. Pichereaux, O. Burlet-Schiltz, A. Parini, B. Garmy-Susini, A.-C. Prats, Promoter-dependent translation controlled by p54nrb and hnRNPM during myoblast differentiation, PLoS One 10 (2015) e0136466, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136466.

[86] F. Hantelys, A.-C. Godet, F. David, F. Tatin, E. Renaud-Gabardos, F. Pujol, L.H. Diallo, I. Ader, L. Ligat, A.K. Henras, Y. Sato, A. Parini, E. Lacazette, B. Garmy-Susini, A.-C. Prats, Vasohibin1, a new mouse cardiomyocyte IRES trans-acting factor that regulates translation in early hypoxia, Elife 8 (2019) e50094, https://doi.org/10.7554/eLife.50094.

[87] S. Cinque, M. Aprile, V. Costa, E. Leucci, Long noncoding RNA in human cancers: to be or not to be, that is the question, in: Epigenetic Cancer Therapy, Elsevier, 2023, pp. 109–127, https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91367-6.00014-3.

NOUVELLE

Rôle de l'ARN non codant NEAT1 dans le contrôle de la traduction des ARN messagers par le noyau cellulaire

Émilie Roussel, Barbara Garmy-Susini, Anne-Catherine Prats

Équipe LYMPHACTOR, UMR 1297-I2MC, Inserm, université de Toulouse, UT3, Toulouse, France.
anne-catherine.prats@inserm.fr

> Comment la traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines peut-elle être contrôlée par le noyau cellulaire, alors même qu'elle a lieu dans le cytoplasme ? Un article récemment publié révèle le rôle critique d'un long ARN non codant : NEAT1 (*nuclear-enriched abundant transcript 1*) [1]. L'histoire commence avec le stress cellulaire. Lorsqu'une cellule est soumise à un stress (hypoxie, infection virale, ou encore stress génotoxique lié à un traitement anti-cancéreux), la traduction des ARNm est fortement ralentie afin de diminuer la dépense énergétique de la cellule et de favoriser sa survie [2]. Un stress hypoxique par manque de dioxygène (O_2) survient dans les maladies cardio-vasculaires dues à une occlusion artérielle, tout particulièrement dans l'insuffisance cardiaque

ischémique aiguë (infarctus du myocarde) ou chronique. Un tel stress survient également au cours du développement des tumeurs solides cancéreuses, dont le centre n'est pas irrigué par des vaisseaux sanguins. En dépit du blocage traductionnel lié au stress, certains ARNm continuent d'être traduits, parfois même plus activement. Dans la plupart des cas, ces ARNm codent des protéines impliquées dans la réponse au stress, par exemple des facteurs de croissance angiogéniques, dont la sécrétion par la cellule en hypoxie stimule la formation de néovaisseaux qui lui apporteront du dioxygène [3, 4]. Cette activation traductionnelle permet donc de reperfuser les tissus lors de maladies cardiovasculaires ischémiques, ou d'irriguer efficacement les tumeurs, ce qui favorise leur croissance. Dans le cas d'une tumeur cancéreuse, l'hypoxie active également la traduction d'ARNm codant des facteurs lymphangiogéniques, et la formation de néovaisseaux sanguins et lymphatiques augmente la dissémination métastatique [3, 5].

En cas de stress, la cellule met donc en œuvre des mécanismes alternatifs de traduction de certains ARNm pour surmonter l'inhibition traductionnelle globale. L'un de ces mécanismes implique, au lieu du recrutement habituel du ribosome sur la coiffe présente à l'extrémité 5' des ARNm, son recrutement interne, ce qui requiert la présence d'un élément structural particulier dans l'ARNm : le site d'entrée interne des ribosomes (*internal ribosome entry site*, IRES) [2]. Nous avons identifié des IRES dans les ARNm codant les principaux facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques appartenant aux familles des FGF (*fibroblast growth factors*) et des VEGF (*vascular endothelial growth factors*) : leur présence permet d'activer la traduction de ces ARNm en réponse à l'hypoxie [3, 4]. L'IRES est présent le plus souvent dans la région 5' non traduite de l'ARNm. Il permet le recrutement du ribosome indépendamment de la coiffe, avec la contribution de facteurs cellulaires, les ITAF (*IRES trans-acting factors*), qui peuvent être des protéines ou des ARN non codants [4]. Étonnamment, de nombreux ITAF sont des protéines majoritairement nucléaires. Plusieurs protéines de la famille des hnRNP (*heterogenous nuclear ribonucleoproteins*) sont impliquées dans le contrôle positif ou négatif de la traduction des ARNm IRES-dépendante. Nous avions précédemment montré que deux ITAF identifiés lors de l'activation de l'IRES de l'ARNm codant le facteur angiogénique FGF1, les protéines hnRNPM et P54^{nrb}/NONO, sont également capables de se lier au promoteur du gène *FGF1*, et que la présence nucléaire de ces deux ITAF permet leur recrutement plus efficace sur l'ARNm et une activation importante de la traduction IRES-dépendante [6]. Les résultats de ce travail de recherche et d'autres travaux ont conduit à suggérer que l'activation de la traduction IRES-dépendante des ARNm cellulaires nécessite dans certains cas un évènement nucléaire [7].

Nous avons recherché quel pouvait en être le mécanisme. Une piste nous a été fournie par le fait que les deux ITAF que nous avions précédemment identifiés, hnRNPM et P54^{nrb}, interagissent au sein d'un corpuscule nucléaire qui se forme en réponse au stress, le *paraspeckle*, dont P54^{nrb} est un composant essentiel. Ce *paraspeckle*, dont on connaissait le rôle régulateur de l'expression génique par la rétention d'ARN messagers édités[1] et de facteurs de transcription, contient au moins sept ITAF différents [8, 9]. Son principal composant est un long ARN non codant, NEAT1, qui en forme le squelette, et dont la synthèse est induite par l'hypoxie : il existe deux isoformes, NEAT1_1 et NEAT1_2, longues respectivement de 3,7 kb et 22,7 kb chez l'homme [8]. La présence des ITAF dans le *paraspeckle* nous a donc amenés à formuler l'hypothèse de son implication dans la traduction des ARNm IRES-dépendante. À l'appui de cette hypothèse, nous avions observé, dans plusieurs types de cellules, une corrélation entre l'activation des IRES et la synthèse de NEAT1 au début de l'hypoxie [1]. Dans des cardiomyocytes de souris HL-1 (des cellules immortalisées mais ayant conservé leur phénotype de cellules cardiaques contractiles) cultivés en hypoxie, nous avons donc réalisé une déplétion expérimentale de l'ARN NEAT1, ainsi que de trois composants protéiques majeurs du *paraspeckle*, p54^{nrb}, PSPC1 (*paraspeckle component 1*) et SFPQ (*splicing factor proline- and glutamine-rich*), et nous avons testé, dans chaque cas, l'activité traductionnelle IRES-dépendante des ARNm codant les principaux facteurs de croissance (lymph)angiogéniques FGF1, FGF2, VEGFA, VEGFC et VEGFD, ainsi que deux protéines impliquées dans la cardioprotection, IGF1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*) et c-MYC. L'activité d'un IRES d'origine virale, provenant du picornavirus EMCV (*encephalomyocarditis virus*) a également été testée. Nous avons ainsi montré que la déplétion de P54^{nrb} ou celle de PSPC1 diminue l'activité traductionnelle des ARNm de FGF1, FGF2 et VEGFA, alors que seule la déplétion de PSPC1 diminue celle de l'ARNm de VEGFC, et que celle des ARNm de VEGFD, IGF1R et c-MYC est insensible à la déplétion de l'une ou l'autre de ces deux protéines dans ce modèle cellulaire. Quant à la déplétion de SFPQ, elle n'affecte l'activité traductionnelle d'aucun de ces ARNm. En revanche, la traduction de tous ces ARNm est fortement inactivée par la déplétion de NEAT1. Nous sommes donc arrivés à la conclusion que les protéines P54^{nrb} et PSPC1 sont des ITAF qui ne régulent qu'un sous-groupe d'IRES, alors que NEAT1 est un ITAF activateur de l'ensemble des IRES d'ARNm cellulaires étudiés (mais pas de celui du picornavirus EMCV). Afin de déterminer si ce rôle régulateur de NEAT1 s'étend à d'autres ARNm cellulaires, nous avons étudié

[1] L'édition d'un ARNm désigne divers mécanismes permettant l'ajout, la suppression ou la conversion de nucléotides. Elle peut entraîner des changements d'acides aminés, la création de codons d'initiation ou de terminaison de la traduction, la création de nouveaux cadres de lecture. Elle peut aussi influer sur la maturation ou l'épissage de l'ARNm.

l'effet de sa déplétion sur le recrutement dans les polysomes (donc sur la traduction) de 96 ARNm contenant un IRES ou codant une protéine impliquée dans l'angiogenèse. Nos résultats ont révélé le rôle activateur de NEAT1, principalement NEAT1_2, sur la traduction de la plupart de ces ARNm dans les cellules soumises à l'hypoxie [1].

Comment NEAT1 exerce-t-il sa fonction d'ITAF ? Notre hypothèse est que le *paraspeckle* dont NEAT1 constitue le squelette joue le rôle d'une plateforme de recrutement des ARNm possédant des IRES, et qu'il est le site de formation de l'IRESome[2]. Nous avons montré, par des expériences de smiFISH (*single molecule inexpensive fluorescent in situ hybridization*), qu'un ARNm possédant un IRES est en effet colocalisé avec NEAT1 dans le *paraspeckle* lors de l'hypoxie [1] (*Figure 1*). NEAT1 est-il ensuite exporté dans le cytoplasme avec l'IRESome pour activer directement la traduction IRES-dépendante ? Cela reste à prouver, mais cette hypothèse s'appuie sur un faisceau d'arguments : la présence de NEAT1 dans le cytoplasme a déjà été décrite, et nous avons nous-mêmes détecté sa présence dans les polysomes lors de l'hypoxie [3].

Cette étude aura permis de comprendre comment le mécanisme de la traduction IRES-dépendante des ARNm cellulaires possédant un IRES est déclenché dans le noyau, *via* un recrutement de ces ARNm dans le *paraspeckle*. Seul l'IRES du virus EMCV s'est montré insensible à la déplétion expérimentale de NEAT1, ce qui confirme un modèle proposé précédemment, selon lequel l'IRESome des ARNm viraux se formerait dans le cytoplasme, alors que celui des ARNm cellulaires se formerait dans le noyau [7].

Ainsi, un ARN non codant de longueur exceptionnelle, NEAT1, régule l'expression génique par plusieurs mécanismes. En plus de sa fonction cytoplasmique déjà connue d'éponge à micro-ARN [8],

[2] L'IRESome désigne le complexe ribonucléoprotéique qui permet la traduction IRES-dépendante des ARNm.

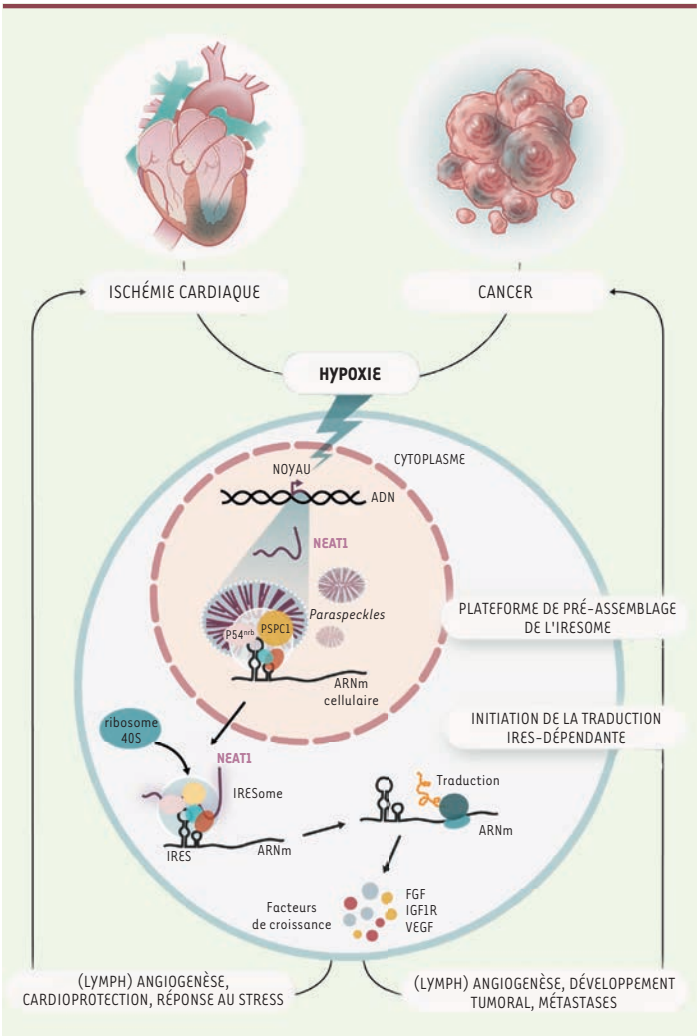


Figure 1*. *L'ARN non codant Neat1 et le paraspeckle activent la traduction de certains ARNm en réponse à l'hypoxie. Les cellules du myocarde, en cas d'ischémie cardiaque, ou les cellules tumorales en cas de cancer, sont soumises à un stress hypoxique. L'ARN non codant NEAT1 est alors transcrit, et contribue à la formation d'une sous-structure nucléaire, le *paraspeckle,* dans lequel il est associé à différentes protéines, parmi lesquelles plusieurs ITAF (*IRES trans-acting factors*), dont p54^{nrb} et PSPC1 (*paraspeckle component 1*). Les ARNm contenant un IRES sont recrutés dans ce corpuscule nucléaire, qui devient une plateforme de pré-assemblage de l'IRESsome, un processus impliquant NEAT1 ainsi que les protéines p54^{nrb} et PSPC1. Le complexe ribonucléoprotéique ainsi formé est alors exporté dans le cytoplasme, où il est recruté par les polysomes et traduit en protéine (traduction IRES-dépendante) : facteur de croissance angiogénique ou lymphangiogénique, facteur cardioprotecteur, ou protéine du stress. Cette réponse cellulaire au stress induit notamment la formation de néovaisseaux, qui a un effet bénéfique dans le cas de l'ischémie cardiaque, alors qu'elle favorise le développement tumoral et les métastases dans le cas du cancer.

cette nouvelle fonction nucléo-cytoplasmique d'activateur de la traduction en fait un élément essentiel du contrôle traductionnel en réponse au stress. D'un point de vue physiopathologique, NEAT1 est surexprimé dans de nombreux cancers, et il est impliqué dans la résistance des cellules tumorales à certains traitements anticancéreux [8]. Par ailleurs, grâce à son rôle anti-apoptotique, il favorise la survie des cardiomyocytes lors de l'ischémie cardiaque. La capacité de NEAT1 à stimuler la traduction des ARNm des facteurs (lymph)angiogéniques lors de l'hypoxie en fait un promoteur de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse, ce qui favorise la revascularisation bénéfique dans les maladies cardio-vasculaires ischémiques, mais également une vascularisation indésirable dans le cancer, qui stimule alors le développement tumoral et la dissémination métastatique. ◊

Non-coding RNA NEAT1, a key of translational regulation by cell nucleus.

REMERCIEMENTS

Nous remercions A.C. Godet (www.threoninedesign.fr) pour la réalisation de la figure. L'équipe « LYMPHACTOR » dirigée par B. Garmy-Susini et A.-C. Prats est labellisée par la Fondation pour la recherche médicale. E. Roussel bénéficie d'un financement par la Ligue nationale contre le cancer.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteures déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Godet A-C, Roussel E, David F, *et al.* Long non-coding RNA Neat1 and paraspeckle components are translational regulators in hypoxia. *eLife* 2022 ; 11 : e69162.
2. Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005 ; 6 : 318-27.
3. Hantelys F, Godet A-C, David F, *et al.* Vasohibin1, a new mouse cardiomyocyte IRES trans-acting factor that regulates translation in early hypoxia. *eLife* 2019 ; 8 : e50094.
4. Godet A-C, David F, Hantelys F, *et al.* IRES trans-acting factors, key actors of the stress response. *IJMS* 2019 ; 20 : 924.
5. Morfoisse F, Kuchnio A, Frainay C, *et al.* Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1α-independent translation-mediated mechanism. *Cell Reports* 2014 ; 6 : 155-67.
6. Ainaoui N, Hantelys F, Renaud-Gabardos E, *et al.* Promoter-dependent translation controlled by p54nrb and hnRNPM during myoblast differentiation. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0136466.
7. Semler BL, Waterman ML. IRES-mediated pathways to polysomes: nuclear versus cytoplasmic routes. *Trends Microbiol* 2008 ; 16 : 1-5.
8. Smith NE, Spencer-Merris P, Fox AH, *et al.* The long and the short of it: NEAT1 and cancer cell metabolism. *Cancers* 2022 ; 14 : 4388.
9. Naganuma T, Nakagawa S, Tanigawa A, *et al.* Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles: LncRNA processing for nuclear body architecture. *EMBO J* 2012 ; 31 : 4020-34.

Bibliographie

A N, Bl E. 2010. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* **115**. doi:10.1182/blood-2009-10-178129

Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. 1998. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:548–553. doi:10.1073/pnas.95.2.548

Adriaens C. *et al* 2016. p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity. *Nat Med* **22**:861–868. doi:10.1038/nm.4135

Ahmed ASI *et al* 2018. Long noncoding RNA NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1) is critical for phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**:E8660–E8667. doi:10.1073/pnas.1803725115

Ainaoui N, Hantelys F, Renaud-Gabardos E, Bunel M, Lopez F, Pujol F, Planes R, Bahraoui E, Pichereaux C, Burlet-Schiltz O, Parini A, Garmy-Susini B, Prats A-C. 2015. Promoter-Dependent Translation Controlled by p54nrb and hnRNPM during Myoblast Differentiation. *PLoS One* **10**:e0136466. doi:10.1371/journal.pone.0136466

Aitken CE.et al. 2016. Eukaryotic translation initiation factor 3 plays distinct roles at the mRNA entry and exit channels of the ribosomal preinitiation complex. *Elife* **5**:e20934. doi:10.7554/eLife.20934

Alexander A, Cai S-L, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH, Inoki K, Guan K-L, Shen J, Person MD, Kusewitt D, Mills GB, Kastan MB, Walker CL. 2010. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:4153–4158. doi:10.1073/pnas.0913860107

Al-Hadid Q, Roy K, Chanfreau G, Clarke SG. 2016. Methylation of yeast ribosomal protein Rpl3 promotes translational elongation fidelity. *RNA* **22**:489–498. doi:10.1261/rna.054569.115

Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. 2005. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* **438**:946–953. doi:10.1038/nature04480

Alkalaeva EZ, Pisarev AV, Frolova LY, Kisselev LL, Pestova TV. 2006. In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* **125**:1125–1136. doi:10.1016/j.cell.2006.04.035

Alliouachene S, Tuttle RL, Boumard S, Lapointe T, Berissi S, Germain S, Jaubert F, Tosh D, Birnbaum MJ, Pende M. 2008. Constitutively active Akt1 expression in mouse pancreas requires S6 kinase 1 for insulinoma formation. *J Clin Invest* **118**:3629–3638. doi:10.1172/JCI35237

An H, Tan JT, Shelkovnikova TA. 2019. Stress granules regulate stress-induced paraspeckle assembly. *J Cell Biol* **218**:4127–4140. doi:10.1083/jcb.201904098

An H, Williams NG, Shelkovnikova TA. 2018. NEAT1 and paraspeckles in neurodegenerative diseases: A missing lnc found? *Noncoding RNA Res* **3**:243–252. doi:10.1016/j.ncrna.2018.11.003

Anantharaman A, Jadaliha M, Tripathi V, Nakagawa S, Hirose T, Jantsch MF, Prasanth SG, Prasanth KV. 2016. Paraspeckles modulate the intranuclear distribution of paraspeckle-associated Ctn RNA. *Sci Rep* **6**:34043. doi:10.1038/srep34043

Anderson EC, Hunt SL, Jackson RJ. 2007. Internal initiation of translation from the human rhinovirus-2 internal ribosome entry site requires the binding of Unr to two distinct sites on the 5' untranslated region. *J Gen Virol* **88**:3043–3052. doi:10.1099/vir.0.82463-0

Andreev DE *et al.* 2007. Differential factor requirement to assemble translation initiation complexes at the alternative start codons of foot-and-mouth disease virus RNA. *RNA* **13**:1366–1374. doi:10.1261/rna.469707

Arabi A, Wu S, Ridderstråle K, Bierhoff H, Shiue C, Fatyol K, Fahlén S, Hydbring P, Söderberg O, Grummt I, Larsson L-G, Wright APH. 2005. c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* **7**:303–310. doi:10.1038/ncb1225

Arcondéguy T, Lacazette E, Millevoi S, Prats H, Touriol C. 2013. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for

intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res* **41**:7997–8010. doi:10.1093/nar/gkt539

Arnaud E, Touriol C, Boutonnet C, Gensac MC, Vagner S, Prats H, Prats AC. 1999. A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Mol Cell Biol* **19**:505–514. doi:10.1128/MCB.19.1.505

Arsham AM, Howell JJ, Simon MC. 2003. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem* **278**:29655–29660. doi:10.1074/jbc.M212770200

Aspelund A, Robciuc MR, Karaman S, Makinen T, Alitalo K. 2016. Lymphatic System in Cardiovascular Medicine. *Circ Res* **118**:515–530. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306544

Aspesi A, Ellis SR. 2019. Rare ribosomopathies: insights into mechanisms of cancer. *Nat Rev Cancer* **19**:228–238. doi:10.1038/s41568-019-0105-0

Audigier S, Guiramand J, Prado-Lourenco L, Conte C, Gonzalez-Herrera IG, Cohen-Solal C, Récasens M, Prats A-C. 2008. Potent activation of FGF-2 IRES-dependent mechanism of translation during brain development. *RNA* **14**:1852–1864. doi:10.1261/rna.790608

Avni D, Biberman Y, Meyuhas O. 1997. The 5' terminal oligopyrimidine tract confers translational control on TOP mRNAs in a cell type- and sequence context-dependent manner. *Nucleic Acids Res* **25**:995–1001.
Aylett CHS, Boehringer D, Erzberger JP, Schaefer T, Ban N. 2015. Structure of a yeast 40S-eIF1-eIF1A-eIF3-eIF3j initiation complex. *Nat Struct Mol Biol* **22**:269–271. doi:10.1038/nsmb.2963

Azzi S, Hebda JK, Gavard J. 2013. Vascular permeability and drug delivery in cancers. *Front Oncol* **3**:211. doi:10.3389/fonc.2013.00211
Bailey JM, Tapprich WE. 2007. Structure of the 5' nontranslated region of the coxsackievirus b3 genome: Chemical modification and comparative sequence analysis. *J Virol* **81**:650–668. doi:10.1128/JVI.01327-06

Baird SD, Lewis SM, Turcotte M, Holcik M. 2007. A search for structurally similar cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res* **35**:4664–4677. doi:10.1093/nar/gkm483

Baird SD, Turcotte M, Korneluk RG, Holcik M. 2006. Searching for IRES. *RNA* **12**:1755–1785. doi:10.1261/rna.157806
Balvay L, Lopez Lastra M, Sargueil B, Darlix J-L, Ohlmann T. 2007. Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**:128–140. doi:10.1038/nrmicro1599

Ban N, Beckmann R, Cate JHD, Dinman JD, Dragon F, Ellis SR, Lafontaine DLJ, Lindahl L, Liljas A, Lipton JM, McAlear MA, Moore PB, Noller HF, Ortega J, Panse VG, Ramakrishnan V, Spahn CMT, Steitz TA, Tchorzewski M, Tollervey D, Warren AJ, Williamson JR, Wilson D, Yonath A, Yusupov M. 2014. A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol* **24**:165–169. doi:10.1016/j.sbi.2014.01.002

Barra J, Gaidosh GS, Blumenthal E, Beckedorff F, Tayari MM, Kirstein N, Karakach TK, Jensen TH, Impens F, Gevaert K, Leucci E, Shiekhattar R, Marine J-C. 2020. Integrator restrains paraspeckles assembly by promoting isoform switching of the lncRNA NEAT1. *Sci Adv* **6**:eaaz9072. doi:10.1126/sciadv.aaz9072

Bartek J, Lukas J. 2007. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* **19**:238–245. doi:10.1016/j.ceb.2007.02.009
Baßler J, Hurt E. 2019. Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu Rev Biochem* **88**:281–306. doi:10.1146/annurev-biochem-013118-110817

Basu A, Das P, Chaudhuri S, Bevilacqua E, Andrews J, Barik S, Hatzoglou M, Komar AA, Mazumder B. 2011a. Requirement of rRNA Methylation for 80S Ribosome Assembly on a Cohort of Cellular Internal Ribosome Entry Sites ▿ . *Mol Cell Biol* **31**:4482–4499. doi:10.1128/MCB.05804-11

Basu A, Das P, Chaudhuri S, Bevilacqua E, Andrews J, Barik S, Hatzoglou M, Komar AA, Mazumder B. 2011b. Requirement of rRNA methylation for 80S ribosome assembly on a cohort of cellular internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol* **31**:4482–4499. doi:10.1128/MCB.05804-11

Behrmann E, Loerke J, Budkevich TV, Yamamoto K, Schmidt A, Penczek PA, Vos MR, Bürger J, Mielke T, Scheerer P, Spahn CMT. 2015. Structural snapshots of actively translating human ribosomes. *Cell* **161**:845–857. doi:10.1016/j.cell.2015.03.052

Belin S, Beghin A, Solano-Gonzàlez E, Bezin L, Brunet-Manquat S, Textoris J, Prats A-C, Mertani HC, Dumontet C, Diaz J-J. 2009. Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. *PLoS One* **4**:e7147. doi:10.1371/journal.pone.0007147

Bellodi C, Kopmar N, Ruggero D. 2010a. Deregulation of oncogene-induced senescence and p53 translational control in X-linked dyskeratosis congenita. *EMBO J* **29**:1865–1876. doi:10.1038/emboj.2010.83

Bellodi C, Krasnykh O, Haynes N, Theodoropoulou M, Peng G, Montanaro L, Ruggero D. 2010b. Loss of function of the tumor suppressor DKC1 perturbs p27 translation control and contributes to pituitary tumorigenesis. *Cancer Res* **70**:6026–6035. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4730

Bergeron D, Paraqindes H, Fafard-Couture É, Deschamps-Francoeur G, Faucher-Giguère L, Bouchard-Bourelle P, Abou Elela S, Catez F, Marcel V, Scott MS. 2023. snoDB 2.0: an enhanced interactive database, specializing in human snoRNAs. *Nucleic Acids Res* **51**:D291–D296. doi:10.1093/nar/gkac835

Berlioz C, Darlix JL. 1995. An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polyprotein precursors. *J Virol* **69**:2214–2222. doi:10.1128/JVI.69.4.2214-2222.1995

Birkedal U, Christensen-Dalsgaard M, Krogh N, Sabarinathan R, Gorodkin J, Nielsen H. 2015. Profiling of ribose methylations in RNA by high-throughput sequencing. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**:451–455. doi:10.1002/anie.201408362

Blanco R, Gerhardt H. 2013. VEGF and Notch in Tip and Stalk Cell Selection. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**:a006569. doi:10.1101/cshperspect.a006569

Boccaletto P, Machnicka MA, Purta E, Piatkowski P, Baginski B, Wirecki TK, de Crécy-Lagard V, Ross R, Limbach PA, Kotter A, Helm M, Bujnicki JM. 2018. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res* **46**:D303–D307. doi:10.1093/nar/gkx1030

Boccaletto P, Stefaniak F, Ray A, Cappannini A, Mukherjee S, Purta E, Kurkowska M, Shirvanizadeh N, Destefanis E, Groza P, Avşar G, Romitelli A, Pir P, Dassi E, Conticello SG, Aguilo F, Bujnicki JM. 2022. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2021 update. *Nucleic Acids Res* **50**:D231–D235. doi:10.1093/nar/gkab1083

Bohlen J, Roiuk M, Teleman AA. 2021. Phosphorylation of ribosomal protein S6 differentially affects mRNA translation based on ORF length. *Nucleic Acids Res* **49**:13062–13074. doi:10.1093/nar/gkab1157

Bohnsack MT, Martin R, Granneman S, Ruprecht M, Schleiff E, Tollervey D. 2009. Prp43 Bound at Different Sites on the Pre-rRNA Performs Distinct Functions in Ribosome Synthesis. *Mol Cell* **36**:583–592. doi:10.1016/j.molcel.2009.09.039

Bonnal S, Pileur F, Orsini C, Parker F, Pujol F, Prats A-C, Vagner S. 2005. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *J Biol Chem* **280**:4144–4153. doi:10.1074/jbc.M411492200

Bonneau AM, Sonenberg N. 1987. Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J Biol Chem* **262**:11134–11139.

Bonnet-Magnaval F, Philippe C, Van Den Berghe L, Prats H, Touriol C, Lacazette E. 2016. Hypoxia and ER stress promote Staufen1 expression through an alternative translation mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **479**:365–371. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.082

Boon K, Caron HN, van Asperen R, Valentijn L, Hermus MC, van Sluis P, Roobeek I, Weis I, Voûte PA, Schwab M, Versteeg R. 2001. N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO J* **20**:1383–1393. doi:10.1093/emboj/20.6.1383

Boria I.*et al* 2010. The ribosomal basis of Diamond-Blackfan Anemia: mutation and database update. *Hum Mutat* **31**:1269–1279. doi:10.1002/humu.21383

Bornes S, Prado-Lourenco L, Bastide A, Zanibellato C, Iacovoni JS, Lacazette E, Prats A-C, Touriol C, Prats H. 2007. Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress. *Circ Res* **100**:305–308. doi:10.1161/01.RES.0000258873.08041.c9

Bortoluzzi S, d'Alessi F, Romualdi C, Danieli GA. 2001. Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues. *Bioinformatics* **17**:1152–1157. doi:10.1093/bioinformatics/17.12.1152

Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne KJ, Richard DJ. 2016. Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Mol Biol* **17**:19. doi:10.1186/s12867-016-0073-9

Braunstein S, Karpisheva K, Pola C, Goldberg J, Hochman T, Yee H, Cangiarella J, Arju R, Formenti SC, Schneider RJ. 2007. A hypoxia-

controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol Cell* **28**:501–512. doi:10.1016/j.molcel.2007.10.019

Brown DD, Gurdon JB. 1964. ABSENCE OF RIBOSOMAL RNA SYNTHESIS IN THE ANUCLEOLATE MUTANT OF XENOPUS LAEVIS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**:139–146.

Budanov AV, Karin M. 2008. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* **134**:451–460. doi:10.1016/j.cell.2008.06.028

Bugler B, Amalric F, Prats H. 1991. Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biol* **11**:573–577. doi:10.1128/mcb.11.1.573-577.1991

Burke MF, McLaurin DM, Logan MK, Hebert MD. 2019. Alteration of 28S rRNA 2'-O-methylation by etoposide correlates with decreased SMN phosphorylation and reduced Drosha levels. *Biol Open* **8**:bio041848. doi:10.1242/bio.041848
Bustelo XR, Dosil M. 2018. Ribosome biogenesis and cancer: basic and translational challenges. *Curr Opin Genet Dev* **48**:22–29. doi:10.1016/j.gde.2017.10.003

Butler AA, Johnston DR, Kaur S, Lubin FD. 2019. Long noncoding RNA NEAT1 mediates neuronal histone methylation and age-related memory impairment. *Sci Signal* **12**:eaaw9277. doi:10.1126/scisignal.aaw9277
Cairns CA, White RJ. 1998. p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription. *EMBO J* **17**:3112–3123. doi:10.1093/emboj/17.11.3112

Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**:92–96. doi:10.1038/415092a

Cammas A, Pileur F, Bonnal S, Lewis SM, Lévêque N, Holcik M, Vagner S. 2007. Cytoplasmic relocalization of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 controls translation initiation of specific mRNAs. *Mol Biol Cell* **18**:5048–5059. doi:10.1091/mbc.e07-06-0603

Cantara WA, Crain PF, Rozenski J, McCloskey JA, Harris KA, Zhang X, Vendeix FAP, Fabris D, Agris PF. 2011. The RNA Modification Database, RNAMDB: 2011 update. *Nucleic Acids Res* **39**:D195-201. doi:10.1093/nar/gkq1028

Carlile TM, Rojas-Duran MF, Zinshteyn B, Shin H, Bartoli KM, Gilbert WV. 2014. Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature* **515**:143–146. doi:10.1038/nature13802

Cavanaugh AH, Evans A, Rothblum LI. 2008. Mammalian Rrn3 Is Required for the Formation of a Transcription Competent Preinitiation Complex Containing RNA Polymerase I. *Gene Expression* **14**:131.

Chabronova A, van den Akker GGH, Housmans B a. C, Caron MMJ, Cremers A, Surtel D a. M, Wichapong K, Peffers MMJ, van Rhijn LW, Marchand V, Motorin Y, Welting TJM. 2023. Ribosomal RNA-based epitranscriptomic regulation of chondrocyte translation and proteome in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **31**:374–385. doi:10.1016/j.joca.2022.12.010

Chaillou T, Zhang X, McCarthy JJ. 2016. Expression of Muscle-Specific Ribosomal Protein L3-Like Impairs Myotube Growth. *J Cell Physiol* **231**:1894–1902. doi:10.1002/jcp.25294

Chappell SA, LeQuesne JP, Paulin FE, deSchoolmeester ML, Stoneley M, Soutar RL, Ralston SH, Helfrich MH, Willis AE. 2000. A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene* **19**:4437–4440. doi:10.1038/sj.onc.1203791

Chaudhuri S, Vyas K, Kapasi P, Komar AA, Dinman JD, Barik S, Mazumder B. 2007. Human ribosomal protein L13a is dispensable for canonical ribosome function but indispensable for efficient rRNA methylation. *RNA* **13**:2224–2237. doi:10.1261/rna.694007

Chen CY, Sarnow P. 1995. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science* **268**:415–417. doi:10.1126/science.7536344

Chen E, Sharma MR, Shi X, Agrawal RK, Joseph S. 2014. Fragile X Mental Retardation Protein Regulates Translation by Binding Directly to the Ribosome. *Mol Cell* **54**:407–417. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.023

Chen J, Kastan MB. 2010. 5'-3'-UTR interactions regulate p53 mRNA translation and provide a target for modulating p53 induction after DNA damage. *Genes Dev* **24**:2146–2156. doi:10.1101/gad.1968910

Chen L-L, Carmichael GG. 2009. Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA. *Mol Cell* **35**:467–478. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.027

Chen T, Wang H, Yang P, He Z-Y. 2017. Prognostic role of long noncoding RNA NEAT1 in various carcinomas: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* **10**:993–1000. doi:10.2147/OTT.S128588

Chen Y, Belmont AS. 2019. Genome organization around nuclear speckles. *Curr Opin Genet Dev* **55**:91–99. doi:10.1016/j.gde.2019.06.008

Cheng Z, Saito K, Pisarev AV, Wada M, Pisareva VP, Pestova TV, Gajda M, Round A, Kong C, Lim M, Nakamura Y, Svergun DI, Ito K, Song H. 2009. Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes Dev* **23**:1106–1118. doi:10.1101/gad.1770109

Cheung Y-N, Maag D, Mitchell SF, Fekete CA, Algire MA, Takacs JE, Shirokikh N, Pestova T, Lorsch JR, Hinnebusch AG. 2007. Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo. *Genes Dev* **21**:1217–1230. doi:10.1101/gad.1528307

Chotani MA, Chiu IM. 1997. Differential regulation of human fibroblast growth factor 1 transcripts provides a distinct mechanism of cell-specific growth factor expression. *Cell Growth Differ* **8**:999–1013.

Choudhry H, Albukhari A, Morotti M, Haider S, Moralli D, Smythies J, Schödel J, Green CM, Camps C, Buffa F, Ratcliffe P, Ragoussis J, Harris AL, Mole DR. 2015. Tumor hypoxia induces nuclear paraspeckle formation through HIF-2α dependent transcriptional activation of NEAT1 leading to cancer cell survival. *Oncogene* **34**:4482–4490. doi:10.1038/onc.2014.378

Ciccia A, Elledge SJ. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**:179–204. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.019

Ciganda M, Williams N. 2011. Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**:523–533. doi:10.1002/wrna.74

Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, Chess A, Lawrence JB. 2009. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell* **33**:717–726. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.026

Coldwell MJ, Mitchell SA, Stoneley M, MacFarlane M, Willis AE. 2000. Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry. *Oncogene* **19**:899–905. doi:10.1038/sj.onc.1203407

Conte C, Ainaoui N, Delluc-Clavières A, Khoury MP, Azar R, Pujol F, Martineau Y, Pyronnet S, Prats A-C. 2009. Fibroblast growth factor 1 induced during myogenesis by a transcription–translation coupling mechanism. *Nucleic Acids Res* **37**:5267–5278. doi:10.1093/nar/gkp550

Conte C, Riant E, Toutain C, Pujol F, Arnal J-F, Lenfant F, Prats A-C. 2008a. FGF2 translationally induced by hypoxia is involved in negative and positive feedback loops with HIF-1alpha. *PLoS One* **3**:e3078. doi:10.1371/journal.pone.0003078

Créancier L, Mercier P, Prats AC, Morello D. 2001. c-myc Internal ribosome entry site activity is developmentally controlled and subjected to a strong translational repression in adult transgenic mice. *Mol Cell Biol* **21**:1833–1840. doi:10.1128/MCB.21.5.1833-1840.2001

Créancier L, Morello D, Mercier P, Prats AC. 2000. Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity ex vivo and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation. *J Cell Biol* **150**:275–281. doi:10.1083/jcb.150.1.275

Crick FH. 1958. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* **12**:138–163.

Cueni LN, Detmar M. 2006. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol* **126**:2167–2177. doi:10.1038/sj.jid.5700464

Das S, Maitra U. 2001. Functional significance and mechanism of eIF5-promoted GTP hydrolysis in eukaryotic translation initiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **70**:207–231. doi:10.1016/s0079-6603(01)70018-9

de Vries S, Naarmann-de Vries IS, Urlaub H, Lue H, Bernhagen J, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A. 2013. Identification of DEAD-box RNA helicase 6 (DDX6) as a cellular modulator of vascular endothelial growth factor expression under hypoxia. *J Biol Chem* **288**:5815–5827. doi:10.1074/jbc.M112.420711

De Zoysa MD, Yu Y-T. 2017. Posttranscriptional RNA Pseudouridylation. *Enzymes* **41**:151–167. doi:10.1016/bs.enz.2017.02.001
Decatur Wayne A, Fournier MJ. 2002. rRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences* **27**:344–351. doi:10.1016/S0968-0004(02)02109-6

Decatur Wayne A., Fournier MJ. 2002. rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci* **27**:344–351.

doi:10.1016/s0968-0004(02)02109-6

Decatur WA, Schnare MN. 2008. Different Mechanisms for Pseudouridine Formation in Yeast 5S and 5.8S rRNAs. *Mol Cell Biol* **28**:3089–3100. doi:10.1128/MCB.01574-07

Demir R, Yaba A, Huppertz B. 2010. Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta Histochem* **112**:203–214. doi:10.1016/j.acthis.2009.04.004

Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. 2014. Transcriptional Regulation by Hypoxia Inducible Factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **49**:1–15. doi:10.3109/10409238.2013.838205

Dever TE, Dinman JD, Green R. 2018. Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**:a032649. doi:10.1101/cshperspect.a032649

Dever TE, Feng L, Wek RC, Cigan AM, Donahue TF, Hinnebusch AG. 1992. Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* **68**:585–596. doi:10.1016/0092-8674(92)90193-g

Dever TE, Green R. 2012. The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**:a013706. doi:10.1101/cshperspect.a013706

Diaz-Toledano R, Lozano G, Martinez-Salas E. 2017. In-cell SHAPE uncovers dynamic interactions between the untranslated regions of the foot-and-mouth disease virus RNA. *Nucleic Acids Res* **45**:1416–1432. doi:10.1093/nar/gkw795

Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kubyshkin V, Starosta AL, Wilson DN, Budisa N, Rodnina MV. 2015. Entropic Contribution of Elongation Factor P to Proline Positioning at the Catalytic Center of the Ribosome. *J Am Chem Soc* **137**:12997–13006. doi:10.1021/jacs.5b07427

Dokal I. 2011. Dyskeratosis congenita. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2011**:480–486. doi:10.1182/asheducation-2011.1.480

Dong P, Xiong Y, Yue J, Hanley SJB, Kobayashi N, Todo Y, Watari H. 2018. Long Non-coding RNA NEAT1: A Novel Target for Diagnosis and Therapy in Human Tumors. *Front Genet* **9**:471. doi:10.3389/fgene.2018.00471

Dresios J, Chappell SA, Zhou W, Mauro VP. 2006. An mRNA-rRNA base-pairing mechanism for translation initiation in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol* **13**:30–34. doi:10.1038/nsmb1031

D'Souza MN, Gowda NKC, Tiwari V, Babu RO, Anand P, Dastidar SG, Singh R, Selvaraja B, Pal R, Ramesh A, Chattarji S, Chandran S, Gulyani A, Palakodeti D, Muddashetty RS. 2018. FMRP Interacts with C/D Box snoRNA in the Nucleus and Regulates Ribosomal RNA Methylation. *iScience* **9**:399–411. doi:10.1016/j.isci.2018.11.007

Du X, Wang J, Zhu H, Rinaldo L, Lamar K-M, Palmenberg AC, Hansel C, Gomez CM. 2013. A second cistron in the CACNA1A gene encodes a transcription factor that mediates cerebellar development and SCA6. *Cell* **154**:118–133. doi:10.1016/j.cell.2013.05.059

Early hypomethylation of 2'-O-ribose moieties in hepatocyte cytoplasmic ribosomal RNA underlies the protein synthetic defect produced by CCl4. 1987. . *J Cell Biol* **105**:705–711.

Eelen G, Treps L, Li X, Carmeliet P. 2020. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circ Res* **127**:310–329. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.316851

Erales J, Marchand V, Panthu B, Gillot S, Belin S, Ghayad SE, Garcia M, Laforêts F, Marcel V, Baudin-Baillieu A, Bertin P, Couté Y, Adrait A, Meyer M, Therizols G, Yusupov M, Namy O, Ohlmann T, Motorin Y, Catez F, Diaz J-J. 2017. Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**:12934–12939. doi:10.1073/pnas.1707674114

Ermolenko DN, Noller HF. 2011. mRNA translocation occurs during the second step of ribosomal intersubunit rotation. *Nat Struct Mol Biol* **18**:457–462. doi:10.1038/nsmb.2011

Esguerra J, Warringer J, Blomberg A. 2008. Functional importance of individual rRNA 2'-O-ribose methylations revealed by high-resolution phenotyping. *RNA* **14**:649–656. doi:10.1261/rna.845808

Falaleeva M, Pages A, Matuszek Z, Hidmi S, Agranat-Tamir L, Korotkov K, Nevo Y, Eyras E, Sperling R, Stamm S. 2016. Dual function of C/D box small nucleolar RNAs in rRNA modification and alternative pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:E1625-1634. doi:10.1073/pnas.1519292113

Fernández IS, Bai X-C, Hussain T, Kelley AC, Lorsch JR, Ramakrishnan V, Scheres SHW. 2013. Molecular architecture of a eukaryotic translational initiation complex. *Science* **342**:1240585. doi:10.1126/science.1240585

Fernández IS, Bai X-C, Murshudov G, Scheres SHW, Ramakrishnan V. 2014. Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome. *Cell* **157**:823–831. doi:10.1016/j.cell.2014.04.015

Ferrara N, Adamis AP. 2016. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* **15**:385–403. doi:10.1038/nrd.2015.17

Florkiewicz RZ, Sommer A. 1989. Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:3978–3981. doi:10.1073/pnas.86.11.3978

Fong K, Li Y, Wang W, Ma W, Li K, Qi RZ, Liu D, Songyang Z, Chen J. 2013. Whole-genome screening identifies proteins localized to distinct nuclear bodies. *J Cell Biol* **203**:149–164. doi:10.1083/jcb.201303145

Fox AH, Lam YW, Leung AKL, Lyon CE, Andersen J, Mann M, Lamond AI. 2002. Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr Biol* **12**:13–25. doi:10.1016/s0960-9822(01)00632-7

Fox AH, Nakagawa S, Hirose T, Bond CS. 2018. Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation. *Trends Biochem Sci* **43**:124–135. doi:10.1016/j.tibs.2017.12.001

Fox JM, Rashford RL, Lindahl L. 2019. Co-Assembly of 40S and 60S Ribosomal Proteins in Early Steps of Eukaryotic Ribosome Assembly. *Int J Mol Sci* **20**:2806. doi:10.3390/ijms20112806

Friedrich JK, Panov KI, Cabart P, Russell J, Zomerdijk JCBM. 2005. TBP-TAF complex SL1 directs RNA polymerase I pre-initiation complex formation and stabilizes upstream binding factor at the rDNA promoter. *J Biol Chem* **280**:29551–29558. doi:10.1074/jbc.M501595200

Fujii K, Shi Z, Zhulyn O, Denans N, Barna M. 2017. Pervasive translational regulation of the cell signalling circuitry underlies mammalian development. *Nat Commun* **8**:14443. doi:10.1038/ncomms14443

Fujimura K, Katahira J, Kano F, Yoneda Y, Murata M. 2009. Selective localization of PCBP2 to cytoplasmic processing bodies. *Biochim Biophys Acta* **1793**:878–887. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.02.002

Gabut M, Bourdelais F, Durand S. 2020. Ribosome and Translational Control in Stem Cells. *Cells* **9**:497. doi:10.3390/cells9020497
Galan A, Lozano G, Piñeiro D, Martinez-Salas E. 2017. G3BP1 interacts directly with the FMDV IRES and negatively regulates translation. *FEBS J* **284**:3202–3217. doi:10.1111/febs.14184

Ganot P, Bortolin ML, Kiss T. 1997. Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* **89**:799–809. doi:10.1016/s0092-8674(00)80263-9

Gao G, Dhar S, Bedford MT. 2017. PRMT5 regulates IRES-dependent translation via methylation of hnRNP A1. *Nucleic Acids Res* **45**:4359–4369. doi:10.1093/nar/gkw1367

García-Nuñez S, Gismondi MI, König G, Berinstein A, Taboga O, Rieder E, Martínez-Salas E, Carrillo E. 2014. Enhanced IRES activity by the 3'UTR element determines the virulence of FMDV isolates. *Virology* **448**:303–313. doi:10.1016/j.virol.2013.10.027

Garmy-Susini B, Pizzinat N, Villeneuve N, Bril A, Brakenhielm E, Parini A. 2017. [Cardiac lymphatic system]. *Med Sci (Paris)* **33**:765–770. doi:10.1051/medsci/20173308022

Gay DM, Lund AH, Jansson MD. 2022. Translational control through ribosome heterogeneity and functional specialization. *Trends Biochem Sci* **47**:66–81. doi:10.1016/j.tibs.2021.07.001

Geissler R, Golbik RP, Behrens S-E. 2012. The DEAD-box helicase DDX3 supports the assembly of functional 80S ribosomes. *Nucleic Acids Res* **40**:4998–5011. doi:10.1093/nar/gks070

Genuth NR, Barna M. 2018a. Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms. *Nat Rev Genet* **19**:431–452. doi:10.1038/s41576-018-0008-z

Genuth NR, Barna M. 2018b. The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life. *Mol Cell* **71**:364–374. doi:10.1016/j.molcel.2018.07.018

Ghulam MM, Catala M, Abou Elela S. 2020. Differential expression of duplicated ribosomal protein genes modifies ribosome

composition in response to stress. *Nucleic Acids Res* **48**:1954–1968. doi:10.1093/nar/gkz1183

Gingras AC, Svitkin Y, Belsham GJ, Pause A, Sonenberg N. 1996. Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:5578–5583. doi:10.1073/pnas.93.11.5578

Godet A-C, David F, Hantelys F, Tatin F, Lacazette E, Garmy-Susini B, Prats A-C. 2019. IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response. *Int J Mol Sci* **20**:924. doi:10.3390/ijms20040924

Godet A-C, Roussel E, Laugero N, Morfoisse F, Lacazette E, Garmy-Susini B, Prats A-C. 2023. Translational control by long non-coding RNAs. *Biochimie* S0300-9084(23)00206–7. doi:10.1016/j.biochi.2023.08.015

Goichberg P. 2016. Therapeutic lymphangiogenesis after myocardial infarction: vascular endothelial growth factor-C paves the way. *J Thorac Dis* **8**:1904–1907. doi:10.21037/jtd.2016.07.34

Gomes E, Shorter J. 2019. The molecular language of membraneless organelles. *J Biol Chem* **294**:7115–7127. doi:10.1074/jbc.TM118.001192

Gomez-Roman N, Grandori C, Eisenman RN, White RJ. 2003. Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* **421**:290–294. doi:10.1038/nature01327

Gonzalez-Herrera IG, Prado-Lourenco L, Pileur F, Conte C, Morin A, Cabon F, Prats H, Vagner S, Bayard F, Audigier S, Prats A-C. 2006. Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. *FASEB J* **20**:476–478. doi:10.1096/fj.04-3314fje

Gradi A, Svitkin YV, Imataka H, Sonenberg N. 1998. Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:11089–11094.

Gressner AM, Wool IG. 1974. The phosphorylation of liver ribosomal proteins in vivo. Evidence that only a single small subunit protein (S6) is phosphorylated. *J Biol Chem* **249**:6917–6925.

Gromadski KB, Schümmer T, Strømgaard A, Knudsen CR, Kinzy TG, Rodnina MV. 2007. Kinetics of the Interactions between Yeast Elongation Factors 1A and 1Bα, Guanine Nucleotides, and Aminoacyl-tRNA. *J Biol Chem* **282**:35629–35637. doi:10.1074/jbc.M707245200

Gross JD, Moerke NJ, von der Haar T, Lugovskoy AA, Sachs AB, McCarthy JEG, Wagner G. 2003. Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* **115**:739–750. doi:10.1016/s0092-8674(03)00975-9

Grover R, Ray PS, Das S. 2008. Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated translation of p53 isoforms. *Cell Cycle* **7**:2189–2198. doi:10.4161/cc.7.14.6271

Grummt I. 1999. Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**:109–154. doi:10.1016/s0079-6603(08)60506-1

Gu C, Begley TJ, Dedon PC. 2014. tRNA modifications regulate translation during cellular stress. *FEBS Lett* **588**:4287–4296. doi:10.1016/j.febslet.2014.09.038

Gu L, Zhu N, Zhang H, Durden DL, Feng Y, Zhou M. 2009. Regulation of XIAP translation and induction by MDM2 following irradiation. *Cancer Cell* **15**:363–375. doi:10.1016/j.ccr.2009.03.002

Guimaraes JC, Zavolan M. 2016. Patterns of ribosomal protein expression specify normal and malignant human cells. *Genome Biol* **17**:236. doi:10.1186/s13059-016-1104-z

Guru SC, Agarwal SK, Manickam P, Olufemi S-E, Crabtree JS, Weisemann JM, Kester MB, Kim YS, Wang Y, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Spiegel AM, Boguski MS, Roe BA, Collins FS, Marx SJ, Burns L, Chandrasekharappa SC. 1997. A Transcript Map for the 2.8-Mb Region Containing the Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Locus. *Genome Res* **7**:725–735.

Haase M, Fitze G. 2016. HSP90AB1: helping the good and the bad. *Gene* **575**:171–186. doi:10.1016/j.gene.2015.08.063

Häfner SJ, Jansson MD, Altinel K, Kraushar ML, Andersen KL, Abay-Nørgaard ZC, Fontenas M, Sørensen DM, Gay DM, Arendrup FS, Tehler D, Krogh N, Nielsen H, Kirkeby A, Lund AH. 2022. Ribosomal RNA 2'-O-methylation dynamics impact cell fate decisions. doi:10.1101/2022.09.24.509301

Halaby M-J, Harris BRE, Miskimins WK, Cleary MP, Yang D-Q. 2015a. Deregulation of Internal Ribosome Entry Site-Mediated p53

Translation in Cancer Cells with Defective p53 Response to DNA Damage. *Mol Cell Biol* **35**:4006–4017. doi:10.1128/MCB.00365-15

Halaby M-J, Li Y, Harris BR, Jiang S, Miskimins WK, Cleary MP, Yang D-Q. 2015c. Translational Control Protein 80 Stimulates IRES-Mediated Translation of p53 mRNA in Response to DNA Damage. *Biomed Res Int* **2015**:708158. doi:10.1155/2015/708158

Halaby M-J, Yang D-Q. 2007. p53 translational control: a new facet of p53 regulation and its implication for tumorigenesis and cancer therapeutics. *Gene* **395**:1–7. doi:10.1016/j.gene.2007.01.029

Halim VA, García-Santisteban I, Warmerdam DO, van den Broek B, Heck AJR, Mohammed S, Medema RH. 2018. Doxorubicin-induced DNA Damage Causes Extensive Ubiquitination of Ribosomal Proteins Associated with a Decrease in Protein Translation*. *Mol Cell Proteomics* **17**:2297–2308. doi:10.1074/mcp.RA118.000652

Han B, Zhang J-T. 2002. Regulation of gene expression by internal ribosome entry sites or cryptic promoters: the eIF4G story. *Mol Cell Biol* **22**:7372–7384. doi:10.1128/MCB.22.21.7372-7384.2002

Han S, Sun S, Li P, Liu Q, Zhang Z, Dong H, Sun M, Wu W, Wang X, Guo H. 2020. Ribosomal Protein L13 Promotes IRES-Driven Translation of Foot-and-Mouth Disease Virus in a Helicase DDX3-Dependent Manner. *J Virol* **94**:e01679-19. doi:10.1128/JVI.01679-19

Hantelys F, Godet A-C, David F, Tatin F, Renaud-Gabardos E, Pujol F, Diallo LH, Ader I, Ligat L, Henras AK, Sato Y, Parini A, Lacazette E, Garmy-Susini B, Prats A-C. 2019. Vasohibin1, a new mouse cardiomyocyte IRES trans-acting factor that regulates translation in early hypoxia. *Elife* **8**:e50094. doi:10.7554/eLife.50094

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. 2000a. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* **6**:1099–1108. doi:10.1016/s1097-2765(00)00108-8

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. 2000b. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* **5**:897–904. doi:10.1016/s1097-2765(00)80330-5

Harris TE, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Rhoads RE, Lawrence JC. 2006. mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. *EMBO J* **25**:1659–1668. doi:10.1038/sj.emboj.7601047

Harvey RF, Smith TS, Mulroney T, Queiroz RML, Pizzinga M, Dezi V, Villenueva E, Ramakrishna M, Lilley KS, Willis AE. 2018. Trans-acting translational regulatory RNA binding proteins. *WIREs RNA* **9**:e1465. doi:10.1002/wrna.1465

Hashem Y, des Georges A, Dhote V, Langlois R, Liao HY, Grassucci RA, Pestova TV, Hellen CUT, Frank J. 2013. Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit. *Nature* **503**:539–543. doi:10.1038/nature12658

Hatano M, Umemura M, Kimura N, Yamazaki T, Takeda H, Nakano H, Takahashi S, Takahashi Y. 2013. The 5'-untranslated region regulates ATF5 mRNA stability via nonsense-mediated mRNA decay in response to environmental stress. *FEBS J* **280**:4693–4707. doi:10.1111/febs.12440

Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **10**:3787–3799. doi:10.1091/mbc.10.11.3787

Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauck SM, Wiemann S, Mason PJ, Poustka A, Dokal I. 1998. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet* **19**:32–38. doi:10.1038/ng0598-32

Hennecke M, Kwissa M, Metzger K, Oumard A, Kröger A, Schirmbeck R, Reimann J, Hauser H. 2001. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Res* **29**:3327–3334.

Hennig S, Kong G, Mannen T, Sadowska A, Kobelke S, Blythe A, Knott GJ, Iyer KS, Ho D, Newcombe EA, Hosoki K, Goshima N, Kawaguchi T, Hatters D, Trinkle-Mulcahy L, Hirose T, Bond CS, Fox AH. 2015. Prion-like domains in RNA binding proteins are essential for building subnuclear paraspeckles. *J Cell Biol* **210**:529–539. doi:10.1083/jcb.201504117

Henras AK, Plisson-Chastang C, Humbert O, Romeo Y, Henry Y. 2017. Synthesis, Function, and Heterogeneity of snoRNA-Guided Posttranscriptional Nucleoside Modifications in Eukaryotic Ribosomal RNAs. *Enzymes* **41**:169–213. doi:10.1016/bs.enz.2017.03.007

Henras AK, Plisson-Chastang C, O'Donohue M-F, Chakraborty A, Gleizes P-E. 2015. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **6**:225–242. doi:10.1002/wrna.1269

Hernandez-Verdun D, Louvet É. 2004. Le nucléole: structure, fonctions et maladies associées. *ms* **20**:37–44.

Hershey JWB, Sonenberg N, Mathews MB. 2012. Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol*

4:a011528. doi:10.1101/cshperspect.a011528

Herter EK, Stauch M, Gallant M, Wolf E, Raabe T, Gallant P. 2015. snoRNAs are a novel class of biologically relevant Myc targets. *BMC Biol* **13**:25. doi:10.1186/s12915-015-0132-6

Hertz MI, Landry DM, Willis AE, Luo G, Thompson SR. 2013. Ribosomal protein S25 dependency reveals a common mechanism for diverse internal ribosome entry sites and ribosome shunting. *Mol Cell Biol* **33**:1016–1026. doi:10.1128/MCB.00879-12

Hetz C. 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**:89–102. doi:10.1038/nrm3270

Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. 2020. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**:421–438. doi:10.1038/s41580-020-0250-z

Heusch G. 2016. Myocardial Ischemia: Lack of Coronary Blood Flow or Myocardial Oxygen Supply/Demand Imbalance? *Circ Res* **119**:194–196. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308925

Hinnebusch AG. 2005. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* **59**:407–450. doi:10.1146/annurev.micro.59.031805.133833

Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, Yokoi T, Nakagawa S, Bénard M, Fox AH, Pierron G. 2014. NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Mol Biol Cell* **25**:169–183. doi:10.1091/mbc.E13-09-0558

Holcik M, Lefebvre C, Yeh C, Chow T, Korneluk RG. 1999. A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nat Cell Biol* **1**:190–192. doi:10.1038/11109

Holcik M, Sonenberg N. 2005b. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:318–327. doi:10.1038/nrm1618

Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. 2005. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* **123**:569–580. doi:10.1016/j.cell.2005.10.024

Honda M, Brown EA, Lemon SM. 1996. Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* **2**:955–968.

Hong S, Freeberg MA, Han T, Kamath A, Yao Y, Fukuda T, Suzuki T, Kim JK, Inoki K. 2017. LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs. *Elife* **6**:e25237. doi:10.7554/eLife.25237

Horos R, Ijspeert H, Pospisilova D, Sendtner R, Andrieu-Soler C, Taskesen E, Nieradka A, Cmejla R, Sendtner M, Touw IP, von Lindern M. 2012. Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood* **119**:262–272. doi:10.1182/blood-2011-06-358200

Huang J, Zhou N, Watabe K, Lu Z, Wu F, Xu M, Mo Y-Y. 2014. Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1). *Cell Death Dis* **5**:e1008–e1008. doi:10.1038/cddis.2013.541

Huang JT, Schneider RJ. 1991. Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein. *Cell* **65**:271–280. doi:10.1016/0092-8674(91)90161-q

Huez I, Créancier L, Audigier S, Gensac MC, Prats AC, Prats H. 1998. Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Cell Biol* **18**:6178–6190. doi:10.1128/MCB.18.11.6178

Hupalowska A, Jedrusik A, Zhu M, Bedford MT, Glover DM, Zernicka-Goetz M. 2018. CARM1 and Paraspeckles Regulate Pre-implantation Mouse Embryo Development. *Cell* **175**:1902-1916.e13. doi:10.1016/j.cell.2018.11.027

Hutchinson JN, Ensminger AW, Clemson CM, Lynch CR, Lawrence JB, Chess A. 2007. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics* **8**:39. doi:10.1186/1471-2164-8-39

Iadevaia V, Liu R, Proud CG. 2014. mTORC1 signaling controls multiple steps in ribosome biogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **36**:113–120. doi:10.1016/j.semcdb.2014.08.004

Imami K, Milek M, Bogdanow B, Yasuda T, Kastelic N, Zauber H, Ishihama Y, Landthaler M, Selbach M. 2018. Phosphorylation of the Ribosomal Protein RPL12/uL11 Affects Translation during Mitosis. *Mol Cell* **72**:84-98.e9. doi:10.1016/j.molcel.2018.08.019

Imamura K, Imamachi N, Akizuki G, Kumakura M, Kawaguchi A, Nagata K, Kato A, Kawaguchi Y, Sato H, Yoneda M, Kai C, Yada T, Suzuki Y, Yamada T, Ozawa T, Kaneki K, Inoue T, Kobayashi M, Kodama T, Wada Y, Sekimizu K, Akimitsu N. 2014. Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli. *Mol Cell* **53**:393–406. doi:10.1016/j.molcel.2014.01.009

Imamura K, Takaya A, Ishida Y, Fukuoka Y, Taya T, Nakaki R, Kakeda M, Imamachi N, Sato A, Yamada T, Onoguchi-Mizutani R, Akizuki G, Tanu T, Tao K, Miyao S, Suzuki Y, Nagahama M, Yamamoto T, Jensen TH, Akimitsu N. 2018. Diminished nuclear RNA decay upon Salmonella infection upregulates antibacterial noncoding RNAs. *EMBO J* **37**:e97723. doi:10.15252/embj.201797723

Incarnato D, Anselmi F, Morandi E, Neri F, Maldotti M, Rapelli S, Parlato C, Basile G, Oliviero S. 2017. High-throughput single-base resolution mapping of RNA 2′-O-methylated residues. *Nucleic Acids Res* **45**:1433–1441. doi:10.1093/nar/gkw810

Inoki K, Zhu T, Guan K-L. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**:577–590. doi:10.1016/s0092-8674(03)00929-2

Ivanov P, Kedersha N, Anderson P. 2019. Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **11**:a032813. doi:10.1101/cshperspect.a032813

Izadpanah A, Willingham K, Chandrasekar B, Alt EU, Izadpanah R. 2023. Unfolded protein response and angiogenesis in malignancies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1878**:188839. doi:10.1016/j.bbcan.2022.188839

Jaafar M, Paraqindes H, Gabut M, Diaz J-J, Marcel V, Durand S. 2021. 2'O-Ribose Methylation of Ribosomal RNAs: Natural Diversity in Living Organisms, Biological Processes, and Diseases. *Cells* **10**:1948. doi:10.3390/cells10081948

Jackman JE, Alfonzo JD. 2013. Transfer RNA modifications: nature's combinatorial chemistry playground. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**:35–48. doi:10.1002/wrna.1144

Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:113–127. doi:10.1038/nrm2838

Jacob F, Monod J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**:318–356. doi:10.1016/s0022-2836(61)80072-7

Jan E, Sarnow P. 2002. Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J Mol Biol* **324**:889–902. doi:10.1016/s0022-2836(02)01099-9

Jang SK, Kräusslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. 1988. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* **62**:2636–2643. doi:10.1128/JVI.62.8.2636-2643.1988

Jang SK, Wimmer E. 1990. Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes Dev* **4**:1560–1572. doi:10.1101/gad.4.9.1560

Jansson MD, Häfner SJ, Altinel K, Tehler D, Krogh N, Jakobsen E, Andersen JV, Andersen KL, Schoof EM, Ménard P, Nielsen H, Lund AH. 2021. Regulation of translation by site-specific ribosomal RNA methylation. *Nat Struct Mol Biol* **28**:889–899. doi:10.1038/s41594-021-00669-4

Jeltsch M, Jha SK, Tvorogov D, Anisimov A, Leppänen V-M, Holopainen T, Kivelä R, Ortega S, Kärpanen T, Alitalo K. 2014. CCBE1 enhances lymphangiogenesis via A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-3-mediated vascular endothelial growth factor-C activation. *Circulation* **129**:1962–1971. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002779

Jennings MD, Pavitt GD. 2010. eIF5 has GDI activity necessary for translational control by eIF2 phosphorylation. *Nature* **465**:378–381. doi:10.1038/nature09003

Ji B, Harris BRE, Liu Y, Deng Y, Gradilone SA, Cleary MP, Liu J, Yang D-Q. 2017. Targeting IRES-Mediated p53 Synthesis for Cancer Diagnosis and Therapeutics. *Int J Mol Sci* **18**:93. doi:10.3390/ijms18010093

Jouffe C, Cretenet G, Symul L, Martin E, Atger F, Naef F, Gachon F. 2013. The Circadian Clock Coordinates Ribosome Biogenesis. *PLoS Biol* **11**:e1001455. doi:10.1371/journal.pbio.1001455

Jousse C, Oyadomari S, Novoa I, Lu P, Zhang Y, Harding HP, Ron D. 2003. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* **163**:767–775. doi:10.1083/jcb.200308075

Js S, Dm S, Bi L. 2013. Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiological reviews* **93**. doi:10.1152/physrev.00006.2013

Jurkin J, Henkel T, Nielsen AF, Minnich M, Popow J, Kaufmann T, Heindl K, Hoffmann T, Busslinger M, Martinez J. 2014. The mammalian tRNA ligase complex mediates splicing of XBP1 mRNA and controls antibody secretion in plasma cells. *EMBO J* **33**:2922–2936. doi:10.15252/embj.201490332

Kabat D. 1970. Phosphorylation of ribosomal proteins in rabbit reticulocytes. Characterization and regulatory aspects. *Biochemistry* **9**:4160–4175. doi:10.1021/bi00823a019

Kafasla P, Morgner N, Pöyry TAA, Curry S, Robinson CV, Jackson RJ. 2009. Polypyrimidine tract binding protein stabilizes the encephalomyocarditis virus IRES structure via binding multiple sites in a unique orientation. *Mol Cell* **34**:556–568. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.015

Kafasla P, Morgner N, Robinson CV, Jackson RJ. 2010. Polypyrimidine tract-binding protein stimulates the poliovirus IRES by modulating eIF4G binding. *EMBO J* **29**:3710–3722. doi:10.1038/emboj.2010.231

Kaminski A, Pöyry TAA, Skene PJ, Jackson RJ. 2010. Mechanism of initiation site selection promoted by the human rhinovirus 2 internal ribosome entry site. *J Virol* **84**:6578–6589. doi:10.1128/JVI.00123-10

Kampen KR, Sulima SO, Vereecke S, De Keersmaecker K. 2020. Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Res* **48**:1013–1028. doi:10.1093/nar/gkz637

Kapp LD, Lorsch JR. 2004. GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *J Mol Biol* **335**:923–936. doi:10.1016/j.jmb.2003.11.025

Karaman S, Leppänen V-M, Alitalo K. 2018. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Development* **145**:dev151019. doi:10.1242/dev.151019

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. 2004. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* **5**:74–80. doi:10.1038/ni1013

Karpanen T, Alitalo K. 2001. Lymphatic vessels as targets of tumor therapy? *J Exp Med* **194**:F37-42. doi:10.1084/jem.194.6.f37

Katz MJ, Acevedo JM, Loenarz C, Galagovsky D, Liu-Yi P, Pérez-Pepe M, Thalhammer A, Sekirnik R, Ge W, Melani M, Thomas MG, Simonetta S, Boccaccio GL, Schofield CJ, Cockman ME, Ratcliffe PJ, Wappner P. 2014. Sudestada1, a Drosophila ribosomal prolyl-hydroxylase required for mRNA translation, cell homeostasis, and organ growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:4025–4030. doi:10.1073/pnas.1314485111

Kaufman RJ, Scheuner D, Schröder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM. 2002. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:411–421. doi:10.1038/nrm829

Kenneweg F, Bang C, Xiao K, Boulanger CM, Loyer X, Mazlan S, Schroen B, Hermans-Beijnsberger S, Foinquinos A, Hirt MN, Eschenhagen T, Funcke S, Stojanovic S, Genschel C, Schimmel K, Just A, Pfanne A, Scherf K, Dehmel S, Raemon-Buettner SM, Fiedler J, Thum T. 2019. Long Noncoding RNA-Enriched Vesicles Secreted by Hypoxic Cardiomyocytes Drive Cardiac Fibrosis. *Mol Ther Nucleic Acids* **18**:363–374. doi:10.1016/j.omtn.2019.09.003

Kerr CH, Jan E. 2016. Commandeering the Ribosome: Lessons Learned from Dicistroviruses about Translation. *J Virol* **90**:5538–5540. doi:10.1128/JVI.00737-15

Khoshnevis S, Dreggors-Walker RE, Marchand V, Motorin Y, Ghalei H. 2022. Ribosomal RNA 2′-O-methylations regulate translation by impacting ribosome dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**:e2117334119. doi:10.1073/pnas.2117334119

Khosravi F, Ahmadvand N, Bellusci S, Sauer H. 2021. The Multifunctional Contribution of FGF Signaling to Cardiac Development, Homeostasis, Disease and Repair. *Front Cell Dev Biol* **9**:672935. doi:10.3389/fcell.2021.672935

Kim D-Y, Kim W, Lee K-H, Kim S-H, Lee H-R, Kim H-J, Jung Y, Choi J-H, Kim K-T. 2013. hnRNP Q regulates translation of p53 in normal and stress conditions. *Cell Death Differ* **20**:226–234. doi:10.1038/cdd.2012.109

Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan K-L. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* **10**:935–945. doi:10.1038/ncb1753

Kim JH, Park SM, Park JH, Keum SJ, Jang SK. 2011. eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *EMBO J* **30**:2454–2464. doi:10.1038/emboj.2011.146

King HA, Cobbold LC, Willis AE. 2010. The role of IRES trans-acting factors in regulating translation initiation. *Biochem Soc Trans* **38**:1581–1586. doi:10.1042/BST0381581

Klec C, Prinz F, Pichler M. 2019. Involvement of the long noncoding RNA NEAT1 in carcinogenesis. *Mol Oncol* **13**:46–60. doi:10.1002/1878-0261.12404

Klinge S, Woolford JL. 2019. Ribosome assembly coming into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**:116–131. doi:10.1038/s41580-018-0078-y

Knott GJ, Bond CS, Fox AH. 2016. The DBHS proteins SFPQ, NONO and PSPC1: a multipurpose molecular scaffold. *Nucleic Acids Res* **44**:3989–4004. doi:10.1093/nar/gkw271

Kolupaeva VG, Hellen CU, Shatsky IN. 1996. Structural analysis of the interaction of the pyrimidine tract-binding protein with the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and foot-and-mouth disease virus RNAs. *RNA* **2**:1199–1212.

Kolupaeva VG, Pestova TV, Hellen CU, Shatsky IN. 1998. Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *J Biol Chem* **273**:18599–18604. doi:10.1074/jbc.273.29.18599

Kondrashov N, Pusic A, Stumpf CR, Shimizu K, Hsieh AC, Ishijima J, Shiroishi T, Barna M. 2011. Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* **145**:383–397. doi:10.1016/j.cell.2011.03.028

Korc M, Friesel RE. 2009. The Role of Fibroblast Growth Factors in Tumor Growth. *Curr Cancer Drug Targets* **9**:639–651.
Kos M, Tollervey D. 2010. Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Mol Cell* **37**:809–820. doi:10.1016/j.molcel.2010.02.024

Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, Koromilas A, Wouters BG. 2002. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *Mol Cell Biol* **22**:7405–7416. doi:10.1128/MCB.22.21.7405-7416.2002

Kozak M. 1989. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* **108**:229–241. doi:10.1083/jcb.108.2.229

Krogh N, Asmar F, Côme C, Munch-Petersen HF, Grønbæk K, Nielsen H. 2020. Profiling of ribose methylations in ribosomal RNA from diffuse large B-cell lymphoma patients for evaluation of ribosomes as drug targets. *NAR Cancer* **2**:zcaa035. doi:10.1093/narcan/zcaa035

Krogh N, Jansson MD, Häfner SJ, Tehler D, Birkedal U, Christensen-Dalsgaard M, Lund AH, Nielsen H. 2016. Profiling of 2'-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity. *Nucleic Acids Res* **44**:7884–7895. doi:10.1093/nar/gkw482

Kuhle B, Ficner R. 2014. eIF5B employs a novel domain release mechanism to catalyze ribosomal subunit joining. *EMBO J* **33**:1177–1191. doi:10.1002/embj.201387344

Kumar P, Hellen CUT, Pestova TV. 2016. Toward the mechanism of eIF4F-mediated ribosomal attachment to mammalian capped mRNAs. *Genes Dev* **30**:1573–1588. doi:10.1101/gad.282418.116

Kunchala P, Kuravi S, Jensen R, McGuirk J, Balusu R. 2018. When the good go bad: Mutant NPM1 in acute myeloid leukemia. *Blood Rev* **32**:167–183. doi:10.1016/j.blre.2017.11.001

Kwabi-Addo B, Ozen M, Ittmann M. 2004. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* **11**:709–724. doi:10.1677/erc.1.00535

Kwan T, Thompson SR. 2019. Noncanonical Translation Initiation in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **11**:a032672. doi:10.1101/cshperspect.a032672

Lafontaine DLJ. 2015. Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nat Struct Mol Biol* **22**:11–19. doi:10.1038/nsmb.2939

Lafontaine DLJ, Riback JA, Bascetin R, Brangwynne CP. 2021. The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**:165–182. doi:10.1038/s41580-020-0272-6

LaFontaine E, Miller CM, Permaul N, Martin ET, Fuchs G. 2020. Ribosomal protein RACK1 enhances translation of poliovirus and other viral IRESs. *Virology* **545**:53–62. doi:10.1016/j.virol.2020.03.004

Lamaa A, Creff J, Benuzzi E, Pujol F, Draia-Nicolau T, Nougué M, Verdu L, Morfoisse F, Lacazette E, Valet P, Chaput B, Gross F, Gayon R, Bouillé P, Malloizel-Delaunay J, Bura-Rivière A, Prats AC, Garmy-Susini B. 2023. Apelin-VEGF-C mRNA delivery as therapeutic for the treatment of secondary lymphedema. doi:10.1101/2023.01.05.522869

Lampe S, Kunze M, Scholz A, Brauß TF, Winslow S, Simm S, Keller M, Heidler J, Wittig I, Brüne B, Schmid T. 2018. Identification of the TXNIP IRES and characterization of the impact of regulatory IRES trans-acting factors. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* **1861**:147–157. doi:10.1016/j.bbagrm.2018.01.010

Lamphear BJ, Kirchweger R, Skern T, Rhoads RE. 1995. Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem* **270**:21975–21983. doi:10.1074/jbc.270.37.21975

Landry DM, Hertz MI, Thompson SR. 2009. RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs. *Genes Dev* **23**:2753–2764. doi:10.1101/gad.1832209

Lang KJD, Kappel A, Goodall GJ. 2002. Hypoxia-inducible Factor-1α mRNA Contains an Internal Ribosome Entry Site That Allows Efficient Translation during Normoxia and Hypoxia. *Mol Biol Cell* **13**:1792–1801. doi:10.1091/mbc.02-02-0017

Lapeyre B, Purushothaman SK. 2004. Spb1p-directed formation of Gm2922 in the ribosome catalytic center occurs at a late processing stage. *Mol Cell* **16**:663–669. doi:10.1016/j.molcel.2004.10.022

Lee K-M, Chen C-J, Shih S-R. 2017. Regulation Mechanisms of Viral IRES-Driven Translation. *Trends Microbiol* **25**:546–561. doi:10.1016/j.tim.2017.01.010

Lee Y-Y, Cevallos RC, Jan E. 2009. An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2alpha phosphorylation. *J Biol Chem* **284**:6661–6673. doi:10.1074/jbc.M806735200

Lellahi SM, Rosenlund IA, Hedberg A, Kiær LT, Mikkola I, Knutsen E, Perander M. 2018. The long noncoding RNA NEAT1 and nuclear paraspeckles are up-regulated by the transcription factor HSF1 in the heat shock response. *J Biol Chem* **293**:18965–18976. doi:10.1074/jbc.RA118.004473

Leppek K, Das R, Barna M. 2018. Functional 5′ UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**:158–174. doi:10.1038/nrm.2017.103

Levy S, Avni D, Hariharan N, Perry RP, Meyuhas O. 1991. Oligopyrimidine tract at the 5′ end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:3319–3323.

Lewis SM, Veyrier A, Hosszu Ungureanu N, Bonnal S, Vagner S, Holcik M. 2007. Subcellular relocalization of a trans-acting factor regulates XIAP IRES-dependent translation. *Mol Biol Cell* **18**:1302–1311. doi:10.1091/mbc.e06-06-0515

Li J, Chen H, Li X, Wang L, Gao A, Zhang P, Lin W, Gao W, Yang D, Guo X, Liu J, Dang Q, Sun Y. 2017. Co-expression of podoplanin and fibroblast growth factor 1 predicts poor prognosis in patients with lung squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* **16**:1643–1652. doi:10.3892/mmr.2017.6830

Li R, Harvey AR, Hodgetts SI, Fox AH. 2017. Functional dissection of NEAT1 using genome editing reveals substantial localization of the NEAT1_1 isoform outside paraspeckles. *RNA* **23**:872–881. doi:10.1261/rna.059477.116

Li S, Kong L, Yu X. 2013. The expanding roles of endoplasmic reticulum stress in virus replication and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* **41**:150–164. doi:10.3109/1040841X.2013.813899

Li X, Zhu P, Ma S, Song J, Bai J, Sun F, Yi C. 2015. Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome. *Nat Chem Biol* **11**:592–597. doi:10.1038/nchembio.1836

Lin J-C, Hsu M, Tarn W-Y. 2007. Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:2235–2240. doi:10.1073/pnas.0611015104

Lin J-Y, Li M-L, Shih S-R. 2009. Far upstream element binding protein 2 interacts with enterovirus 71 internal ribosomal entry site and negatively regulates viral translation. *Nucleic Acids Res* **37**:47–59. doi:10.1093/nar/gkn901

Liu T-Y, Huang HH, Wheeler D, Xu Y, Wells JA, Song YS, Wiita AP. 2017. Time-Resolved Proteomics Extends Ribosome Profiling-Based

Measurements of Protein Synthesis Dynamics. *Cell Syst* **4**:636-644.e9. doi:10.1016/j.cels.2017.05.001

Liu Y, Beyer A, Aebersold R. 2016. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* **165**:535–550. doi:10.1016/j.cell.2016.03.014

Liu Y, Lu Z. 2018. Long non-coding RNA NEAT1 mediates the toxic of Parkinson's disease induced by MPTP/MPP+ via regulation of gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **45**:841–848. doi:10.1111/1440-1681.12932

Liwak U, Thakor N, Jordan LE, Roy R, Lewis SM, Pardo OE, Seckl M, Holcik M. 2012. Tumor suppressor PDCD4 represses internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic proteins and is regulated by S6 kinase 2. *Mol Cell Biol* **32**:1818–1829. doi:10.1128/MCB.06317-11

Loenarz C, Sekirnik R, Thalhammer A, Ge W, Spivakovsky E, Mackeen MM, McDonough MA, Cockman ME, Kessler BM, Ratcliffe PJ, Wolf A, Schofield CJ. 2014. Hydroxylation of the eukaryotic ribosomal decoding center affects translational accuracy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:4019–4024. doi:10.1073/pnas.1311750111

Lopes AM, Miguel RN, Sargent CA, Ellis PJ, Amorim A, Affara NA. 2010. The human RPS4 paralogue on Yq11.223 encodes a structurally conserved ribosomal protein and is preferentially expressed during spermatogenesis. *BMC Mol Biol* **11**:33. doi:10.1186/1471-2199-11-33

López de Quinto S, Lafuente E, Martínez-Salas E. 2001. IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA* **7**:1213–1226.

López de Quinto S, Martínez-Salas E. 2000. Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA* **6**:1380–1392. doi:10.1017/s1355838200000753

Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. 2015. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* **523**:337–341. doi:10.1038/nature14432

Lozano G, Francisco-Velilla R, Martinez-Salas E. 2018. Ribosome-dependent conformational flexibility changes and RNA dynamics of IRES domains revealed by differential SHAPE. *Sci Rep* **8**:5545. doi:10.1038/s41598-018-23845-x

Lozano G, Martínez-Salas E. 2015. Structural insights into viral IRES-dependent translation mechanisms. *Curr Opin Virol* **12**:113–120. doi:10.1016/j.coviro.2015.04.008

Lu HH, Wimmer E. 1996. Poliovirus chimeras replicating under the translational control of genetic elements of hepatitis C virus reveal unusual properties of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:1412–1417. doi:10.1073/pnas.93.4.1412

Lu PD, Harding HP, Ron D. 2004. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* **167**:27–33. doi:10.1083/jcb.200408003

Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. 2020. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci* **77**:1745–1770. doi:10.1007/s00018-019-03351-7

Luo Y, Na Z, Slavoff SA. 2018. P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry* **57**:2424–2431. doi:10.1021/acs.biochem.7b01162

Luz N, Beck E. 1991. Interaction of a cellular 57-kilodalton protein with the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **65**:6486–6494. doi:10.1128/JVI.65.12.6486-6494.1991

Ma H, Han P, Ye W, Chen H, Zheng X, Cheng L, Zhang L, Yu L, Wu X, Xu Z, Lei Y, Zhang F. 2017. The Long Noncoding RNA NEAT1 Exerts Antihantaviral Effects by Acting as Positive Feedback for RIG-I Signaling. *J Virol* **91**:e02250-16. doi:10.1128/JVI.02250-16

Ma T, Li H, Liu H, Peng Y, Lin T, Deng Z, Jia N, Chen Z, Wang P. 2022. Neat1 promotes acute kidney injury to chronic kidney disease by facilitating tubular epithelial cells apoptosis via sequestering miR-129-5p. *Mol Ther* **30**:3313–3332. doi:10.1016/j.ymthe.2022.05.019

Macejak DG, Sarnow P. 1991. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* **353**:90–94. doi:10.1038/353090a0

Maden BE. 1980. Methylation map of Xenopus laevis ribosomal RNA. *Nature* **288**:293–296. doi:10.1038/288293a0

Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N. 1995. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the

translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* **15**:4990–4997. doi:10.1128/MCB.15.9.4990

Madiai F, Hackshaw KV, Chiu IM. 1999. Characterization of the entire transcription unit of the mouse fibroblast growth factor 1 (FGF-1) gene. Tissue-specific expression of the FGF-1.A mRNA. *J Biol Chem* **274**:11937–11944. doi:10.1074/jbc.274.17.11937

Mailliot J, Martin F. 2018. Viral internal ribosomal entry sites: four classes for one goal. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **9**. doi:10.1002/wrna.1458

Majumdar R, Bandyopadhyay A, Maitra U. 2003. Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. *J Biol Chem* **278**:6580–6587. doi:10.1074/jbc.M210357200

Majzoub K, Hafirassou ML, Meignin C, Goto A, Marzi S, Fedorova A, Verdier Y, Vinh J, Hoffmann JA, Martin F, Baumert TF, Schuster C, Imler J-L. 2014. RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell* **159**:1086–1095. doi:10.1016/j.cell.2014.10.041

Mäkinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. 2001. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* **7**:199–205. doi:10.1038/84651

Malik Ghulam M, Catala M, Reulet G, Scott MS, Abou Elela S. 2022. Duplicated ribosomal protein paralogs promote alternative translation and drug resistance. *Nat Commun* **13**:4938. doi:10.1038/s41467-022-32717-y

Mao YS, Sunwoo H, Zhang B, Spector DL. 2011. Direct Visualization of the Co-transcriptional Assembly of a Nuclear Body by Noncoding RNAs. *Nat Cell Biol* **13**:95–101. doi:10.1038/ncb2140

Marcel V, Ghayad SE, Belin S, Therizols G, Morel A-P, Solano-Gonzàlez E, Vendrell JA, Hacot S, Mertani HC, Albaret MA, Bourdon J-C, Jordan L, Thompson A, Tafer Y, Cong R, Bouvet P, Saurin J-C, Catez F, Prats A-C, Puisieux A, Diaz J-J. 2013. p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell* **24**:318–330. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.013

Marcel V, Kielbassa J, Marchand V, Natchiar KS, Paraqindes H, Nguyen Van Long F, Ayadi L, Bourguignon-Igel V, Lo Monaco P, Monchiet D, Scott V, Tonon L, Bray SE, Diot A, Jordan LB, Thompson AM, Bourdon J-C, Dubois T, André F, Catez F, Puisieux A, Motorin Y, Klaholz BP, Viari A, Diaz J-J. 2020a. Ribosomal RNA 2'O-methylation as a novel layer of inter-tumour heterogeneity in breast cancer. *NAR Cancer* **2**:zcaa036. doi:10.1093/narcan/zcaa036

Marcel V, Kielbassa J, Marchand V, Natchiar KS, Paraqindes H, Nguyen Van Long F, Ayadi L, Bourguignon-Igel V, Lo Monaco P, Monchiet D, Scott V, Tonon L, Bray SE, Diot A, Jordan LB, Thompson AM, Bourdon J-C, Dubois T, André F, Catez F, Puisieux A, Motorin Y, Klaholz BP, Viari A, Diaz J-J. 2020b. Ribosomal RNA 2'O-methylation as a novel layer of inter-tumour heterogeneity in breast cancer. *NAR Cancer* **2**:zcaa036. doi:10.1093/narcan/zcaa036

Marchand V, Blanloeil-Oillo F, Helm M, Motorin Y. 2016. Illumina-based RiboMethSeq approach for mapping of 2'-O-Me residues in RNA. *Nucleic Acids Res* **44**:e135. doi:10.1093/nar/gkw547

Martineau Y, Le Bec C, Monbrun L, Allo V, Chiu I-M, Danos O, Moine H, Prats H, Prats A-C. 2004. Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. *Mol Cell Biol* **24**:7622–7635. doi:10.1128/MCB.24.17.7622-7635.2004

Martínez-Salas E, Regalado MP, Domingo E. 1996. Identification of an essential region for internal initiation of translation in the aphthovirus internal ribosome entry site and implications for viral evolution. *J Virol* **70**:992–998. doi:10.1128/JVI.70.2.992-998.1996
Marygold SJ, Roote J, Reuter G, Lambertsson A, Ashburner M, Millburn GH, Harrison PM, Yu Z, Kenmochi N, Kaufman TC, Leevers SJ, Cook KR. 2007. The ribosomal protein genes and Minute loci of Drosophila melanogaster. *Genome Biol* **8**:R216. doi:10.1186/gb-2007-8-10-r216

Matsui T, Hogetsu K, Usukura J, Sato T, Kumasaka T, Akao Y, Tanaka N. 2006. Structural insight of human DEAD-box protein rck/p54 into its substrate recognition with conformational changes. *Genes to Cells* **11**:439–452. doi:10.1111/j.1365-2443.2006.00951.x

Matsuki Y, Matsuo Y, Nakano Y, Iwasaki S, Yoko H, Udagawa T, Li S, Saeki Y, Yoshihisa T, Tanaka K, Ingolia NT, Inada T. 2020. Ribosomal protein S7 ubiquitination during ER stress in yeast is associated with selective mRNA translation and stress outcome. *Sci Rep* **10**:19669. doi:10.1038/s41598-020-76239-3

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**:1160–1166. doi:10.1126/science.1140321

McCluggage F, Fox AH. 2021. Paraspeckle nuclear condensates: Global sensors of cell stress? *Bioessays* **43**:e2000245. doi:10.1002/bies.202000245

McMahon M, Contreras A, Ruggero D. 2015. Small RNAs with big implications: new insights into H/ACA snoRNA function and their role in human disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **6**:173–189. doi:10.1002/wrna.1266

Meerovitch K, Pelletier J, Sonenberg N. 1989. A cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of poliovirus RNA: implications for internal translation initiation. *Genes Dev* **3**:1026–1034. doi:10.1101/gad.3.7.1026

Mello SS, Sinow C, Raj N, Mazur PK, Bieging-Rolett K, Broz DK, Imam JFC, Vogel H, Wood LD, Sage J, Hirose T, Nakagawa S, Rinn J, Attardi LD. 2017. Neat1 is a p53-inducible lincRNA essential for transformation suppression. *Genes Dev* **31**:1095–1108. doi:10.1101/gad.284661.116

Meng Z, Jackson NL, Choi H, King PH, Emanuel PD, Blume SW. 2008. Alterations in RNA-binding activities of IRES-regulatory proteins as a mechanism for physiological variability and pathological dysregulation of IGF-IR translational control in human breast tumor cells. *J Cell Physiol* **217**:172–183. doi:10.1002/jcp.21486

Merrick WC. 2015. eIF4F: a retrospective. *J Biol Chem* **290**:24091–24099. doi:10.1074/jbc.R115.675280

Merrick WC, Pavitt GD. 2018. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**:a033092. doi:10.1101/cshperspect.a033092

Metge BJ, Kammerud SC, Pruitt HC, Shevde LA, Samant RS. 2021. Hypoxia re-programs 2'-O-Me modifications on ribosomal RNA. *iScience* **24**:102010. doi:10.1016/j.isci.2020.102010

Metge BJ, Kammerud SC, Pruitt HC, Shevde LA, Samant RS. 2020. Hypoxia re-programs 2'-O-Me modifications on ribosomal RNA. *iScience* **24**:102010. doi:10.1016/j.isci.2020.102010

Meyer KD, Patil DP, Zhou J, Zinoviev A, Skabkin MA, Elemento O, Pestova TV, Qian S-B, Jaffrey SR. 2015. 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* **163**:999–1010. doi:10.1016/j.cell.2015.10.012

Meyuhas O. 2015. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research. *Int Rev Cell Mol Biol* **320**:41–73. doi:10.1016/bs.ircmb.2015.07.006

Meyuhas O. 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem* **267**:6321–6330. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01719.x

Miller G, Panov KI, Friedrich JK, Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI, Zomerdijk JC. 2001. hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *EMBO J* **20**:1373–1382. doi:10.1093/emboj/20.6.1373

Mirabello L,. et al 2017. Novel and known ribosomal causes of Diamond-Blackfan anaemia identified through comprehensive genomic characterisation. *J Med Genet* **54**:417–425. doi:10.1136/jmedgenet-2016-104346

Mitchell SA, Spriggs KA, Coldwell MJ, Jackson RJ, Willis AE. 2003. The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Mol Cell* **11**:757–771. doi:10.1016/s1097-2765(03)00093-5

Moazed D, Noller HF. 1989. Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* **342**:142–148. doi:10.1038/342142a0

Modic M, Grosch M, Rot G, Schirge S, Lepko T, Yamazaki T, Lee FCY, Rusha E, Shaposhnikov D, Palo M, Merl-Pham J, Cacchiarelli D, Rogelj B, Hauck SM, von Mering C, Meissner A, Lickert H, Hirose T, Ule J, Drukker M. 2019. Cross-Regulation between TDP-43 and Paraspeckles Promotes Pluripotency-Differentiation Transition. *Mol Cell* **74**:951-965.e13. doi:10.1016/j.molcel.2019.03.041

Monaco PL, Marcel V, Diaz J-J, Catez F. 2018. 2'-O-Methylation of Ribosomal RNA: Towards an Epitranscriptomic Control of Translation? *Biomolecules* **8**:106. doi:10.3390/biom8040106

Montanaro L, Calienni M, Bertoni S, Rocchi L, Sansone P, Storci G, Santini D, Ceccarelli C, Taffurelli M, Carnicelli D, Brigotti M, Bonafè M, Treré D, Derenzini M. 2010. Novel dyskerin-mediated mechanism of p53 inactivation through defective mRNA translation. *Cancer Res* **70**:4767–4777. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4024

Montanaro L, Calienni M, Ceccarelli C, Santini D, Taffurelli M, Pileri S, Treré D, Derenzini M. 2008. Relationship between dyskerin expression and telomerase activity in human breast cancer. *Cell Oncol* **30**:483–490. doi:10.3233/clo-2008-0436

Montavon T, Soshnikova N. 2014. Hox gene regulation and timing in embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **34**:76–84. doi:10.1016/j.semcdb.2014.06.005

Morfoisse F. *et al.* 2014a. Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1α-independent translation-mediated mechanism. *Cell Rep* **6**:155–167. doi:10.1016/j.celrep.2013.12.011

Morfoisse F, Renaud E, Hantelys F, Prats A-C, Garmy-Susini B. 2015. Role of hypoxia and vascular endothelial growth factors in lymphangiogenesis. *Mol Cell Oncol* **2**:e1024821. doi:10.1080/23723556.2015.1024821

Morfoisse F. *et al*. 2018. Lymphatic Vasculature Requires Estrogen Receptor-α Signaling to Protect From Lymphedema. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **38**:1346–1357. doi:10.1161/ATVBAHA.118.310997

Morfoisse F, Tatin F, Hantelys F, Adoue A, Helfer A-C, Cassant-Sourdy S, Pujol F, Gomez-Brouchet A, Ligat L, Lopez F, Pyronnet S, Courty J, Guillermet-Guibert J, Marzi S, Schneider RJ, Prats A-C, Garmy-Susini BH. 2016. Nucleolin Promotes Heat Shock-Associated Translation of VEGF-D to Promote Tumor Lymphangiogenesis. *Cancer Res* **76**:4394–4405. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3140

Motorin Y, Helm M. 2011. RNA nucleotide methylation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**:611–631. doi:10.1002/wrna.79

Motorin Y, Marchand V. 2018. Detection and Analysis of RNA Ribose 2'-O-Methylations: Challenges and Solutions. *Genes (Basel)* **9**:642. doi:10.3390/genes9120642

Motorin Y, Quinternet M, Rhalloussi W, Marchand V. n.d. Constitutive and variable 2'-O-methylation (Nm) in human ribosomal RNA. *RNA Biol* **18**:88–97. doi:10.1080/15476286.2021.1974750

Muhs M, Hilal T, Mielke T, Skabkin MA, Sanbonmatsu KY, Pestova TV, Spahn CMT. 2015. Cryo-EM of ribosomal 80S complexes with termination factors reveal the translocated cricket paralysis virus IRES. *Mol Cell* **57**:422–432. doi:10.1016/j.molcel.2014.12.016

Mullineux S-T, Lafontaine DLJ. 2012. Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? *Biochimie* **94**:1521–1532. doi:10.1016/j.biochi.2012.02.001

Mumprecht V, Detmar M. 2009. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *J Cell Mol Med* **13**:1405–1416. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00834.x

Murphy E, Steenbergen C. 2008. Mechanisms Underlying Acute Protection from Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiol Rev* **88**:581–609. doi:10.1152/physrev.00024.2007

Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. 2015. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)* **3**:83–92. doi:10.2147/HP.S93413

Myers RL, Payson RA, Chotani MA, Deaven LL, Chiu IM. 1993. Gene structure and differential expression of acidic fibroblast growth factor mRNA: identification and distribution of four different transcripts. *Oncogene* **8**:341–349.

Myers RL, Ray SK, Eldridge R, Chotani MA, Chiu IM. 1995. Functional characterization of the brain-specific FGF-1 promoter, FGF-1.B. *J Biol Chem* **270**:8257–8266. doi:10.1074/jbc.270.14.8257

Nachmani D.*et al.* 2019. Germline NPM1 mutations lead to altered rRNA 2'-O-methylation and cause dyskeratosis congenita. *Nat Genet* **51**:1518–1529. doi:10.1038/s41588-019-0502-z

Naganuma T, Nakagawa S, Tanigawa A, Sasaki YF, Goshima N, Hirose T. 2012. Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *EMBO J* **31**:4020–4034. doi:10.1038/emboj.2012.251

Nakagawa S, Naganuma T, Shioi G, Hirose T. 2011. Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J Cell Biol* **193**:31–39. doi:10.1083/jcb.201011110

Nakagawa S, Shimada M, Yanaka K, Mito M, Arai T, Takahashi E, Fujita Y, Fujimori T, Standaert L, Marine J-C, Hirose T. 2014. The lncRNA Neat1 is required for corpus luteum formation and the establishment of pregnancy in a subpopulation of mice. *Development* **141**:4618–4627. doi:10.1242/dev.110544

Nakayama K, Kataoka N. 2019. Regulation of Gene Expression under Hypoxic Conditions. *Int J Mol Sci* **20**:3278. doi:10.3390/ijms20133278

Nanbru C, Lafon I, Audigier S, Gensac MC, Vagner S, Huez G, Prats AC. 1997. Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J Biol Chem* **272**:32061–32066. doi:10.1074/jbc.272.51.32061

Natchiar SK, Myasnikov AG, Kratzat H, Hazemann I, Klaholz BP. 2017. Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure. *Nature* **551**:472–477. doi:10.1038/nature24482

Newton K, Petfalski E, Tollervey D, Cáceres JF. 2003. Fibrillarin is essential for early development and required for accumulation of an intron-encoded small nucleolar RNA in the mouse. *Mol Cell Biol* **23**:8519–8527. doi:10.1128/MCB.23.23.8519-8527.2003

Norrmén C, Tammela T, Petrova TV, Alitalo K. 2011. Biological basis of therapeutic lymphangiogenesis. *Circulation* **123**:1335–1351. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.704098

Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. 2001. Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-Mediated Dephosphorylation of eIF2α. *J Cell Biol* **153**:1011–1022.

Nugent MA, Iozzo RV. 2000. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* **32**:115–120. doi:10.1016/s1357-2725(99)00123-5
Oakes SA, Papa FR. 2015. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annu Rev Pathol* **10**:173–194. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104649

Oh SK, Scott MP, Sarnow P. 1992. Homeotic gene Antennapedia mRNA contains 5'-noncoding sequences that confer translational initiation by internal ribosome binding. *Genes Dev* **6**:1643–1653. doi:10.1101/gad.6.9.1643

Olsen DS, Savner EM, Mathew A, Zhang F, Krishnamoorthy T, Phan L, Hinnebusch AG. 2003. Domains of eIF1A that mediate binding to eIF2, eIF3 and eIF5B and promote ternary complex recruitment in vivo. *EMBO J* **22**:193–204. doi:10.1093/emboj/cdg030

Otsuki Y, Magari S, Sugimoto O. 1986. Lymphatic capillaries in rabbit ovaries during ovulation: an ultrastructural study. *Lymphology* **19**:55–64.

Paraqindes H. *et al.* 2023. IDHwt and IDHmut adult-type diffuse gliomas display distinct alterations in ribosome biogenesis and 2'O-methylation of ribosomal RNA. *Neuro Oncol* noad140. doi:10.1093/neuonc/noad140

Parks MM, Kurylo CM, Batchelder JE, Theresa Vincent C, Blanchard SC. 2019. Implications of sequence variation on the evolution of rRNA. *Chromosome Res* **27**:89–93. doi:10.1007/s10577-018-09602-w

Parks MM, Kurylo CM, Dass RA, Bojmar L, Lyden D, Vincent CT, Blanchard SC. 2018. Variant ribosomal RNA alleles are conserved and exhibit tissue-specific expression. *Sci Adv* **4**:eaao0665. doi:10.1126/sciadv.aao0665

Pauli C, Liu Y, Rohde C, Cui C, Fijalkowska D, Gerloff D, Walter C, Krijgsveld J, Dugas M, Edemir B, Pabst C, Müller LP, Zhou F, Müller-Tidow C. 2020. Site-specific methylation of 18S ribosomal RNA by SNORD42A is required for acute myeloid leukemia cell proliferation. *Blood* **135**:2059–2070. doi:10.1182/blood.2019004121

Pavitt GD, Ramaiah KV, Kimball SR, Hinnebusch AG. 1998. eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange. *Genes Dev* **12**:514–526. doi:10.1101/gad.12.4.514

Pelletier J, Sonenberg N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**:320–325. doi:10.1038/334320a0

Peña C, Hurt E, Panse VG. 2017. Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nat Struct Mol Biol* **24**:689–699. doi:10.1038/nsmb.3454

Penzo M, Montanaro L. 2018. Turning Uridines around: Role of rRNA Pseudouridylation in Ribosome Biogenesis and Ribosomal Function. *Biomolecules* **8**:38. doi:10.3390/biom8020038

Penzo M, Rocchi L, Brugiere S, Carnicelli D, Onofrillo C, Couté Y, Brigotti M, Montanaro L. 2015. Human ribosomes from cells with reduced dyskerin levels are intrinsically altered in translation. *FASEB J* **29**:3472–3482. doi:10.1096/fj.15-270991

Philippe C, Dubrac A, Quelen C, Desquesnes A, Van Den Berghe L, Ségura C, Filleron T, Pyronnet S, Prats H, Brousset P, Touriol C. 2016. PERK mediates the IRES-dependent translational activation of mRNAs encoding angiogenic growth factors after ischemic stress. *Sci Signal* **9**:ra44. doi:10.1126/scisignal.aaf2753

Pickering BM, Mitchell SA, Spriggs KA, Stoneley M, Willis AE. 2004. Bag-1 internal ribosome entry segment activity is promoted by structural changes mediated by poly(rC) binding protein 1 and recruitment of polypyrimidine tract binding protein 1. *Mol Cell Biol* **24**:5595–5605. doi:10.1128/MCB.24.12.5595-5605.2004

Piñeiro D, Fernández N, Ramajo J, Martínez-Salas E. 2013. Gemin5 promotes IRES interaction and translation control through its C-

terminal region. *Nucleic Acids Res* **41**:1017–1028. doi:10.1093/nar/gks1212

Pisareva VP, Pisarev AV, Komar AA, Hellen CUT, Pestova TV. 2008. Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell* **135**:1237–1250. doi:10.1016/j.cell.2008.10.037

Polikanov YS, Melnikov SV, Söll D, Steitz TA. 2015. Structural insights into the role of rRNA modifications in protein synthesis and ribosome assembly. *Nat Struct Mol Biol* **22**:342–344. doi:10.1038/nsmb.2992

Popp MW, Maquat LE. 2015. Attenuation of nonsense-mediated mRNA decay facilitates the response to chemotherapeutics. *Nat Commun* **6**:6632. doi:10.1038/ncomms7632

Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146**:873–887. doi:10.1016/j.cell.2011.08.039

Prasanth KV, Prasanth SG, Xuan Z, Hearn S, Freier SM, Bennett CF, Zhang MQ, Spector DL. 2005. Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* **123**:249–263. doi:10.1016/j.cell.2005.08.033

Prats A-C, David F, Diallo LH, Roussel E, Tatin F, Garmy-Susini B, Lacazette E. 2020. Circular RNA, the Key for Translation. *Int J Mol Sci* **21**:8591. doi:10.3390/ijms21228591

Prats A-C, Prats H. 2002. Translational control of gene expression: role of IRESs and consequences for cell transformation and angiogenesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**:367–413. doi:10.1016/s0079-6603(02)72075-8

Prats H, Kaghad M, Prats AC, Klagsbrun M, Lélias JM, Liauzun P, Chalon P, Tauber JP, Amalric F, Smith JA. 1989. High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:1836–1840. doi:10.1073/pnas.86.6.1836

Protter DSW, Parker R. 2016. Principles and Properties of Stress granules. *Trends Cell Biol* **26**:668–679. doi:10.1016/j.tcb.2016.05.004
Pyronnet S, Pradayrol L, Sonenberg N. 2000. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* **5**:607–616. doi:10.1016/s1097-2765(00)80240-3

Qin X, Jiang B, Zhang Y. 2016. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle* **15**:781–786. doi:10.1080/15384101.2016.1151581

Quinodoz SA. *et al.* 2018. Higher-Order Inter-chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus. *Cell* **174**:744-757.e24. doi:10.1016/j.cell.2018.05.024

Quiskamp N, Poeter M, Raabe CA, Hohenester UM, König S, Gerke V, Rescher U. 2014. The tumor suppressor annexin A10 is a novel component of nuclear paraspeckles. *Cell Mol Life Sci* **71**:311–329. doi:10.1007/s00018-013-1375-4

Ramrath DJF, Lancaster L, Sprink T, Mielke T, Loerke J, Noller HF, Spahn CMT. 2013. Visualization of two transfer RNAs trapped in transit during elongation factor G-mediated translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:20964–20969. doi:10.1073/pnas.1320387110

Rapino F. *et al.* 2018. Codon-specific translation reprogramming promotes resistance to targeted therapy. *Nature* **558**:605–609. doi:10.1038/s41586-018-0243-7

Ray PS, Grover R, Das S. 2006. Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Rep* **7**:404–410. doi:10.1038/sj.embor.7400623

Renaud-Gabardos E, Tatin F, Hantelys F, Lebas B, Calise D, Kunduzova O, Masri B, Pujol F, Sicard P, Valet P, Roncalli J, Chaufour X, Garmy-Susini B, Parini A, Prats A-C. 2018. Therapeutic Benefit and Gene Network Regulation by Combined Gene Transfer of Apelin, FGF2, and SERCA2a into Ischemic Heart. *Mol Ther* **26**:902–916. doi:10.1016/j.ymthe.2017.11.007

Reynolds JE, Kaminski A, Carroll AR, Clarke BE, Rowlands DJ, Jackson RJ. 1996. Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *RNA* **2**:867–878.

Riley A, Jordan LE, Holcik M. 2010. Distinct 5' UTRs regulate XIAP expression under normal growth conditions and during cellular stress. *Nucleic Acids Res* **38**:4665–4674. doi:10.1093/nar/gkq241

Rocchi L, Pacilli A, Sethi R, Penzo M, Schneider RJ, Treré D, Brigotti M, Montanaro L. 2013. Dyskerin depletion increases VEGF mRNA internal ribosome entry site-mediated translation. *Nucleic Acids Res* **41**:8308–8318. doi:10.1093/nar/gkt587

Romanelli MG, Diani E, Lievens PM-J. 2013. New Insights into Functional Roles of the Polypyrimidine Tract-Binding Protein. *Int J Mol*

Sci **14**:22906–22932. doi:10.3390/ijms141122906

Ronca R, Giacomini A, Rusnati M, Presta M. 2015. The potential of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor signaling as a therapeutic target in tumor angiogenesis. *Expert Opin Ther Targets* **19**:1361–1377. doi:10.1517/14728222.2015.1062475

Rotenberg MO, Moritz M, Woolford JL. 1988. Depletion of Saccharomyces cerevisiae ribosomal protein L16 causes a decrease in 60S ribosomal subunits and formation of half-mer polyribosomes. *Genes Dev* **2**:160–172. doi:10.1101/gad.2.2.160

Rowlands AG, Montine KS, Henshaw EC, Panniers R. 1988. Physiological stresses inhibit guanine-nucleotide-exchange factor in Ehrlich cells. *Eur J Biochem* **175**:93–99. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14170.x

Ruggero D. 2013. Translational control in cancer etiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**:a012336. doi:10.1101/cshperspect.a012336

Russell J, Zomerdijk JCBM. 2005. RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci* **30**:87–96. doi:10.1016/j.tibs.2004.12.008

Saha S, Murthy S, Rangarajan PN. 2006. Identification and characterization of a virus-inducible non-coding RNA in mouse brain. *J Gen Virol* **87**:1991–1995. doi:10.1099/vir.0.81768-0

Saito K, Kondo E, Matsushita M. 2011. MicroRNA 130 family regulates the hypoxia response signal through the P-body protein DDX6. *Nucleic Acids Res* **39**:6086–6099. doi:10.1093/nar/gkr194

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**:39–85. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723

Sasaki YTF, Ideue T, Sano M, Mituyama T, Hirose T. 2009. MENepsilon/beta noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:2525–2530. doi:10.1073/pnas.0807899106

Saxton RA, Sabatini DM. 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**:960–976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004

Scheuner D, Kaufman RJ. 2008. The Unfolded Protein Response: A Pathway That Links Insulin Demand with β-Cell Failure and Diabetes. *Endocr Rev* **29**:317–333. doi:10.1210/er.2007-0039

Schimmang T, Tollervey D, Kern H, Frank R, Hurt EC. 1989. A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *EMBO J* **8**:4015–4024. doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb08584.x

Schwab SR, Shugart JA, Horng T, Malarkannan S, Shastri N. 2004. Unanticipated antigens: translation initiation at CUG with leucine. *PLoS Biol* **2**:e366. doi:10.1371/journal.pbio.0020366

Schwartz S, Bernstein DA, Mumbach MR, Jovanovic M, Herbst RH, León-Ricardo BX, Engreitz JM, Guttman M, Satija R, Lander ES, Fink G, Regev A. 2014. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell* **159**:148–162. doi:10.1016/j.cell.2014.08.028

Schwarz DS, Blower MD. 2016. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* **73**:79–94. doi:10.1007/s00018-015-2052-6

Semenza GL. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**:721–732. doi:10.1038/nrc1187
Semler BL, Waterman ML. 2008. IRES-mediated pathways to polysomes: nuclear versus cytoplasmic routes. *Trends Microbiol* **16**:1–5. doi:10.1016/j.tim.2007.11.001

Sendoel A, Dunn JG, Rodriguez EH, Naik S, Gomez NC, Hurwitz B, Levorse J, Dill BD, Schramek D, Molina H, Weissman JS, Fuchs E. 2017. Translation from unconventional 5′ start sites drives tumour initiation. *Nature* **541**:494–499. doi:10.1038/nature21036

Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, Hershey JWB, Blenis J, Pende M, Sonenberg N. 2006. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J* **25**:2781–2791. doi:10.1038/sj.emboj.7601166

Sharathchandra A, Katoch A, Das S. 2014. IRES mediated translational regulation of p53 isoforms. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **5**:131–139. doi:10.1002/wrna.1202

Sharathchandra A, Lal R, Khan D, Das S. 2012. Annexin A2 and PSF proteins interact with p53 IRES and regulate translation of p53 mRNA. *RNA Biol* **9**:1429–1439. doi:10.4161/rna.22707

Sharma S, Lafontaine DLJ. 2015. "View From A Bridge": A New Perspective on Eukaryotic rRNA Base Modification. *Trends Biochem Sci* **40**:560–575. doi:10.1016/j.tibs.2015.07.008

Sharma S, Marchand V, Motorin Y, Lafontaine DLJ. 2017. Identification of sites of 2'-O-methylation vulnerability in human ribosomal RNAs by systematic mapping. *Sci Rep* **7**:11490. doi:10.1038/s41598-017-09734-9

Shen W, Liang X-H, Sun H, De Hoyos CL, Crooke ST. 2017. Depletion of NEAT1 lncRNA attenuates nucleolar stress by releasing sequestered P54nrb and PSF to facilitate c-Myc translation. *PLoS One* **12**:e0173494. doi:10.1371/journal.pone.0173494

Shi Y, Yang Y, Hoang B, Bardeleben C, Holmes B, Gera J, Lichtenstein A. 2016. Therapeutic potential of targeting IRES-dependent c-myc translation in multiple myeloma cells during ER stress. *Oncogene* **35**:1015–1024. doi:10.1038/onc.2015.156

Shi Z, Fujii K, Kovary KM, Genuth NR, Röst HL, Teruel MN, Barna M. 2017. Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol Cell* **67**:71-83.e7. doi:10.1016/j.molcel.2017.05.021

Shin JW. *et al.* 2006. Prox1 Promotes Lineage-specific Expression of Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor-3 in Lymphatic Endothelium: A Role for FGF Signaling in Lymphangiogenesis. *Mol Biol Cell* **17**:576–584. doi:10.1091/mbc.E05-04-0368

Shin VY, Chen J, Cheuk IW-Y, Siu M-T, Ho C-W, Wang X, Jin H, Kwong A. 2019. Long non-coding RNA NEAT1 confers oncogenic role in triple-negative breast cancer through modulating chemoresistance and cancer stemness. *Cell Death Dis* **10**:270. doi:10.1038/s41419-019-1513-5

Shiroki K, Ohsawa C, Sugi N, Wakiyama M, Miura K, Watanabe M, Suzuki Y, Sugano S. 2002. Internal ribosome entry site-mediated translation of Smad5 in vivo: requirement for a nuclear event. *Nucleic Acids Res* **30**:2851–2861. doi:10.1093/nar/gkf408

Shoulders MD, Ryno LM, Genereux JC, Moresco JJ, Tu PG, Wu C, Yates JR, Su AI, Kelly JW, Wiseman RL. 2013. Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ER proteostasis environments. *Cell Rep* **3**:1279–1292. doi:10.1016/j.celrep.2013.03.024

Simchovitz A, Hanan M, Niederhoffer N, Madrer N, Yayon N, Bennett ER, Greenberg DS, Kadener S, Soreq H. 2019. NEAT1 is overexpressed in Parkinson's disease substantia nigra and confers drug-inducible neuroprotection from oxidative stress. *FASEB J* **33**:11223–11234. doi:10.1096/fj.201900830R

Simonetti. *et al.* 2016. eIF3 Peripheral Subunits Rearrangement after mRNA Binding and Start-Codon Recognition. *Mol Cell* **63**:206–217. doi:10.1016/j.molcel.2016.05.033

Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. 2016. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**:611–625. doi:10.1038/nrm.2016.87

Simsek D, Barna M. 2017. An emerging role for the ribosome as a nexus for post-translational modifications. *Curr Opin Cell Biol* **45**:92–101. doi:10.1016/j.ceb.2017.02.010

Simsek D, Tiu GC, Flynn RA, Byeon GW, Leppek K, Xu AF, Chang HY, Barna M. 2017. The Mammalian Ribo-interactome Reveals Ribosome Functional Diversity and Heterogeneity. *Cell* **169**:1051-1065.e18. doi:10.1016/j.cell.2017.05.022

Singleton RS. *et al.*. 2014. OGFOD1 catalyzes prolyl hydroxylation of RPS23 and is involved in translation control and stress granule formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:4031–4036. doi:10.1073/pnas.1314482111

Sinturel F, Gerber A, Mauvoisin D, Wang J, Gatfield D, Stubblefield JJ, Green CB, Gachon F, Schibler U. 2017. Diurnal Oscillations in Liver Mass and Cell Size Accompany Ribosome Assembly Cycles. *Cell* **169**:651-663.e14. doi:10.1016/j.cell.2017.04.015

Slavov N, Semrau S, Airoldi E, Budnik B, van Oudenaarden A. 2015. Differential Stoichiometry among Core Ribosomal Proteins. *Cell Rep* **13**:865–873. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.056

Sloan KE, Leisegang MS, Doebele C, Ramírez AS, Simm S, Safferthal C, Kretschmer J, Schorge T, Markoutsa S, Haag S, Karas M, Ebersberger I, Schleiff E, Watkins NJ, Bohnsack MT. 2015. The association of late-acting snoRNPs with human pre-ribosomal complexes requires the RNA helicase DDX21. *Nucleic Acids Res* **43**:553–564. doi:10.1093/nar/gku1291

Sloan KE, Warda AS, Sharma S, Entian K-D, Lafontaine DLJ, Bohnsack MT. 2016. Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biol* **14**:1138–1152. doi:10.1080/15476286.2016.1259781

Song H, Mugnier P, Das AK, Webb HM, Evans DR, Tuite MF, Hemmings BA, Barford D. 2000. The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* **100**:311–321. doi:10.1016/s0092-8674(00)80667-4

Sood R, Porter AC, Olsen DA, Cavener DR, Wek RC. 2000. A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha. *Genetics* **154**:787–801. doi:10.1093/genetics/154.2.787

Souquere S, Beauclair G, Harper F, Fox A, Pierron G. 2010. Highly ordered spatial organization of the structural long noncoding NEAT1 RNAs within paraspeckle nuclear bodies. *Mol Biol Cell* **21**:4020–4027. doi:10.1091/mbc.E10-08-0690

Spriggs KA, Bushell M, Mitchell SA, Willis AE. 2005. Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell Death Differ* **12**:585–591. doi:10.1038/sj.cdd.4401642

Spriggs KA, Bushell M, Willis AE. 2010. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell* **40**:228–237. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.028

Stacker SA, Williams RA, Achen MG. 2004. Lymphangiogenic growth factors as markers of tumor metastasis. *APMIS* **112**:539–549. doi:10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0812.x

Staněk D, Fox AH. 2017. Nuclear bodies: news insights into structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **46**:94–101. doi:10.1016/j.ceb.2017.05.001

Starck SR, Shastri N. 2016. Nowhere to hide: unconventional translation yields cryptic peptides for immune surveillance. *Immunol Rev* **272**:8–16. doi:10.1111/imr.12434

Starck SR, Tsai JC, Chen K, Shodiya M, Wang L, Yahiro K, Martins-Green M, Shastri N, Walter P. 2016. Translation from the 5' untranslated region shapes the integrated stress response. *Science* **351**:aad3867. doi:10.1126/science.aad3867

Stegmann TJ. 1999. New approaches to coronary heart disease: induction of neovascularisation by growth factors. *BioDrugs* **11**:301–308. doi:10.2165/00063030-199911050-00002

Stoneley M., Chappell SA, Jopling CL, Dickens M, MacFarlane M, Willis AE. 2000. c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Mol Cell Biol* **20**:1162–1169. doi:10.1128/MCB.20.4.1162-1169.2000

Stoneley Mark, Subkhankulova T, Le Quesne JPC, Coldwell MJ, Jopling CL, Belsham GJ, Willis AE. 2000. Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acids Res* **28**:687–694.

Stoneley M, Willis AE. 2004. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* **23**:3200–3207. doi:10.1038/sj.onc.1207551

Su H, Xu T, Ganapathy S, Shadfan M, Long M, Huang TH-M, Thompson I, Yuan Z-M. 2014. Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer. *Oncogene* **33**:1348–1358. doi:10.1038/onc.2013.89

Subkhankulova T, Mitchell SA, Willis AE. 2001. Internal ribosome entry segment-mediated initiation of c-Myc protein synthesis following genotoxic stress. *Biochem J* **359**:183–192. doi:10.1042/0264-6021:3590183

Sugihara Y, Honda H, Iida T, Morinaga T, Hino S, Okajima T, Matsuda T, Nadano D. 2010. Proteomic analysis of rodent ribosomes revealed heterogeneity including ribosomal proteins L10-like, L22-like 1, and L39-like. *J Proteome Res* **9**:1351–1366. doi:10.1021/pr9008964

Sunwoo H, Dinger ME, Wilusz JE, Amaral PP, Mattick JS, Spector DL. 2009. MEN ε/β nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res* **19**:347–359. doi:10.1101/gr.087775.108

Swift MR, Weinstein BM. 2009. Arterial-venous specification during development. *Circ Res* **104**:576–588. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.188805

Tafforeau L. 2015. Qu'en est-il de la biogenèse des ribosomes chez l'homme ? *Med Sci (Paris)* **31**:622–628. doi:10.1051/medsci/20153106015

Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB. 2005a. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal

protein L26 and nucleolin. *Cell* **123**:49–63. doi:10.1016/j.cell.2005.07.034

Tammela T, Alitalo K. 2010. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* **140**:460–476. doi:10.1016/j.cell.2010.01.045

Taoka M, Nobe Y, Yamaki Y, Sato K, Ishikawa H, Izumikawa K, Yamauchi Y, Hirota K, Nakayama H, Takahashi N, Isobe T. 2018. Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic Acids Res* **46**:9289–9298. doi:10.1093/nar/gky811

Taoka M, Nobe Y, Yamaki Y, Yamauchi Y, Ishikawa H, Takahashi N, Nakayama H, Isobe T. 2016. The complete chemical structure of Saccharomyces cerevisiae rRNA: partial pseudouridylation of U2345 in 25S rRNA by snoRNA snR9. *Nucleic Acids Res* **44**:8951–8961. doi:10.1093/nar/gkw564

Tatin F, Renaud-Gabardos E, Godet A-C, Hantelys F, Pujol F, Morfoisse F, Calise D, Viars F, Valet P, Masri B, Prats A-C, Garmy-Susini B. 2017. Apelin modulates pathological remodeling of lymphatic endothelium after myocardial infarction. *JCI Insight* **2**:e93887, 93887. doi:10.1172/jci.insight.93887

Tewalt EF, Cohen JN, Rouhani SJ, Engelhard VH. 2012. Lymphatic endothelial cells - key players in regulation of tolerance and immunity. *Front Immunol* **3**:305. doi:10.3389/fimmu.2012.00305

Thakor N, Smith MD, Roberts L, Faye MD, Patel H, Wieden H-J, Cate JHD, Holcik M. 2017. Cellular mRNA recruits the ribosome via eIF3-PABP bridge to initiate internal translation. *RNA Biol* **14**:553–567. doi:10.1080/15476286.2015.1137419

Therizols G, Bash-Imam Z, Panthu B, Machon C, Vincent A, Ripoll J, Nait-Slimane S, Chalabi-Dchar M, Gaucherot A, Garcia M, Laforêts F, Marcel V, Boubaker-Vitre J, Monet M-A, Bouclier C, Vanbelle C, Souahlia G, Berthel E, Albaret MA, Mertani HC, Prudhomme M, Bertrand M, David A, Saurin J-C, Bouvet P, Rivals E, Ohlmann T, Guitton J, Dalla Venezia N, Pannequin J, Catez F, Diaz J-J. 2022. Alteration of ribosome function upon 5-fluorouracil treatment favors cancer cell drug-tolerance. *Nat Commun* **13**:173. doi:10.1038/s41467-021-27847-8

Thomas MG, Tosar LJM, Desbats MA, Leishman CC, Boccaccio GL. 2009. Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J Cell Sci* **122**:563–573. doi:10.1242/jcs.038208

Thompson S. 2012. So You Want to Know if Your Message Has an IRES? *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**:697–705. doi:10.1002/wrna.1129
Thomson E, Ferreira-Cerca S, Hurt E. 2013. Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *J Cell Sci* **126**:4815–4821. doi:10.1242/jcs.111948

Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. 2012. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **485**:109–113. doi:10.1038/nature11083

Thorrez L, Van Deun K, Tranchevent L-C, Van Lommel L, Engelen K, Marchal K, Moreau Y, Van Mechelen I, Schuit F. 2008. Using Ribosomal Protein Genes as Reference: A Tale of Caution. *PLoS One* **3**:e1854. doi:10.1371/journal.pone.0001854

Todorovski V, Fox AH, Choi YS. 2020. Matrix stiffness-sensitive long noncoding RNA NEAT1 seeded paraspeckles in cancer cells. *Mol Biol Cell* **31**:1654–1662. doi:10.1091/mbc.E20-02-0097

Touriol C, Morillon A, Gensac MC, Prats H, Prats AC. 1999. Expression of human fibroblast growth factor 2 mRNA is post-transcriptionally controlled by a unique destabilizing element present in the 3'-untranslated region between alternative polyadenylation sites. *J Biol Chem* **274**:21402–21408. doi:10.1074/jbc.274.30.21402

Touriol C, Roussigne M, Gensac MC, Prats H, Prats AC. 2000. Alternative translation initiation of human fibroblast growth factor 2 mRNA controlled by its 3'-untranslated region involves a Poly(A) switch and a translational enhancer. *J Biol Chem* **275**:19361–19367. doi:10.1074/jbc.M908431199

Toyoda H, Franco D, Fujita K, Paul AV, Wimmer E. 2007. Replication of poliovirus requires binding of the poly(rC) binding protein to the cloverleaf as well as to the adjacent C-rich spacer sequence between the cloverleaf and the internal ribosomal entry site. *J Virol* **81**:10017–10028. doi:10.1128/JVI.00516-07

Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* **66**:1476–1483. doi:10.1128/JVI.66.3.1476-1483.1992

Uechi T, Tanaka T, Kenmochi N. 2001. A complete map of the human ribosomal protein genes: assignment of 80 genes to the cytogenetic map and implications for human disorders. *Genomics* **72**:223–230. doi:10.1006/geno.2000.6470

Unbehaun A, Borukhov SI, Hellen CUT, Pestova TV. 2004. Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev* **18**:3078–3093. doi:10.1101/gad.1255704

Ungureanu NH, Cloutier M, Lewis SM, de Silva N, Blais JD, Bell JC, Holcik M. 2006. Internal ribosome entry site-mediated translation of Apaf-1, but not XIAP, is regulated during UV-induced cell death. *J Biol Chem* **281**:15155–15163. doi:10.1074/jbc.M511319200

Vaahtomeri K, Karaman S, Mäkinen T, Alitalo K. 2017. Lymphangiogenesis guidance by paracrine and pericellular factors. *Genes Dev* **31**:1615–1634. doi:10.1101/gad.303776.117

Vagner S, Gensac MC, Maret A, Bayard F, Amalric F, Prats H, Prats AC. 1995. Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol Cell Biol* **15**:35–44. doi:10.1128/MCB.15.1.35

Van Eden ME, Byrd MP, Sherrill KW, Lloyd RE. 2004. Demonstrating internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNAs using stringent RNA test procedures. *RNA* **10**:720–730. doi:10.1261/rna.5225204

van Nues RW, Granneman S, Kudla G, Sloan KE, Chicken M, Tollervey D, Watkins NJ. 2011. Box C/D snoRNP catalysed methylation is aided by additional pre-rRNA base-pairing. *EMBO J* **30**:2420–2430. doi:10.1038/emboj.2011.148

van Riggelen J, Yetil A, Felsher DW. 2010. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer* **10**:301–309. doi:10.1038/nrc2819

Vattem KM, Wek RC. 2004. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:11269–11274. doi:10.1073/pnas.0400541101

Vergé V, Vonlanthen M, Masson J-M, Trachsel H, Altmann M. 2004. Localization of a promoter in the putative internal ribosome entry site of the Saccharomyces cerevisiae TIF4631 gene. *RNA* **10**:277–286. doi:10.1261/rna.5910104

Villa N, Do A, Hershey JWB, Fraser CS. 2013. Human eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) protein binds to eIF3c, -d, and -e to promote mRNA recruitment to the ribosome. *J Biol Chem* **288**:32932–32940. doi:10.1074/jbc.M113.517011

Visa N, Puvion-Dutilleul F, Bachellerie JP, Puvion E. 1993. Intranuclear distribution of U1 and U2 snRNAs visualized by high resolution in situ hybridization: revelation of a novel compartment containing U1 but not U2 snRNA in HeLa cells. *Eur J Cell Biol* **60**:308–321.

Wang C, Le SY, Ali N, Siddiqui A. 1995. An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5’ noncoding region. *RNA* **1**:526–537.

Wang Q, Yang H-S. 2018. The role of Pdcd4 in tumor suppression and protein translation. *Biol Cell* 10.1111/boc.201800014. doi:10.1111/boc.201800014

Wang S, Binder P, Fang Q, Wang Z, Xiao W, Liu W, Wang X. 2018. Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets. *Br J Pharmacol* **175**:1293–1304. doi:10.1111/bph.13888

Wang S, Kaufman RJ. 2012. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* **197**:857–867. doi:10.1083/jcb.201110131

Wang Y, Hu S-B, Wang M-R, Yao R-W, Wu D, Yang L, Chen L-L. 2018. Genome-wide screening of NEAT1 regulators reveals cross-regulation between paraspeckles and mitochondria. *Nat Cell Biol* **20**:1145–1158. doi:10.1038/s41556-018-0204-2

Wang Z, Li K, Huang W. 2020. Long non-coding RNA NEAT1-centric gene regulation. *Cell Mol Life Sci* **77**:3769–3779. doi:10.1007/s00018-020-03503-0

Warner JR, Vilardell J, Sohn JH. 2001. Economics of ribosome biosynthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **66**:567–574. doi:10.1101/sqb.2001.66.567

Watkins NJ, Bohnsack MT. 2012. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**:397–414. doi:10.1002/wrna.117

Weber HJ. 1972. Stoichiometric measurements of 30S and 50S ribosomal proteins from Escherichia coli. *Mol Gen Genet* **119**:233–248. doi:10.1007/BF00333861

Wedeken L, Singh P, Klempnauer K-H. 2011. Tumor suppressor protein Pdcd4 inhibits translation of p53 mRNA. *J Biol Chem*

286:42855–42862. doi:10.1074/jbc.M111.269456

Wehner KA, Schütz S, Sarnow P. 2010. OGFOD1, a novel modulator of eukaryotic translation initiation factor 2alpha phosphorylation and the cellular response to stress. *Mol Cell Biol* **30**:2006–2016. doi:10.1128/MCB.01350-09

Weingarten-Gabbay S, Elias-Kirma S, Nir R, Gritsenko AA, Stern-Ginossar N, Yakhini Z, Weinberger A, Segal E. 2016. Comparative genetics. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* **351**:aad4939. doi:10.1126/science.aad4939

Weingarten-Gabbay S, Khan D, Liberman N, Yoffe Y, Bialik S, Das S, Oren M, Kimchi A. 2014. The translation initiation factor DAP5 promotes IRES-driven translation of p53 mRNA. *Oncogene* **33**:611–618. doi:10.1038/onc.2012.626

Wek RC. 2018. Role of eIF2α Kinases in Translational Control and Adaptation to Cellular Stress. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**:a032870. doi:10.1101/cshperspect.a032870

West JA, Mito M, Kurosaka S, Takumi T, Tanegashima C, Chujo T, Yanaka K, Kingston RE, Hirose T, Bond C, Fox A, Nakagawa S. 2016. Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization. *J Cell Biol* **214**:817–830. doi:10.1083/jcb.201601071

Wilson JE, Pestova TV, Hellen CU, Sarnow P. 2000. Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* **102**:511–520. doi:10.1016/s0092-8674(00)00055-6

Wilusz JE, JnBaptiste CK, Lu LY, Kuhn C-D, Joshua-Tor L, Sharp PA. 2012. A triple helix stabilizes the 3′ ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails. *Genes Dev* **26**:2392–2407. doi:10.1101/gad.204438.112

Wirzenius M, Tammela T, Uutela M, He Y, Odorisio T, Zambruno G, Nagy JA, Dvorak HF, Ylä-Herttuala S, Shibuya M, Alitalo K. 2007. Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting. *J Exp Med* **204**:1431–1440. doi:10.1084/jem.20062642

Witte MH, Witte CL. 1987. Lymphatics and blood vessels, lymphangiogenesis and hemangiogenesis: from cell biology to clinical medicine. *Lymphology* **20**:257–266.

Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, Song B, Yau GD-Y, Kaufman RJ. 2007. ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell* **13**:351–364. doi:10.1016/j.devcel.2007.07.005

Xie Y, Su N, Yang J, Tan Q, Huang S, Jin M, Ni Z, Zhang B, Zhang D, Luo F, Chen H, Sun X, Feng JQ, Qi H, Chen L. 2020. FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* **5**:181. doi:10.1038/s41392-020-00222-7

Xue S, Barna M. 2012. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**:355–369. doi:10.1038/nrm3359

Xue S, Tian S, Fujii K, Kladwang W, Das R, Barna M. 2015. RNA regulons in Hox 5′ UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature* **517**:33–38. doi:10.1038/nature14010

Yamamoto K, Goyama S, Asada S, Fujino T, Yonezawa T, Sato N, Takeda R, Tsuchiya A, Fukuyama T, Tanaka Y, Yokoyama A, Toya H, Kon A, Nannya Y, Onoguchi-Mizutani R, Nakagawa S, Hirose T, Ogawa S, Akimitsu N, Kitamura T. 2021. A histone modifier, ASXL1, interacts with NONO and is involved in paraspeckle formation in hematopoietic cells. *Cell Rep* **36**:109576. doi:10.1016/j.celrep.2021.109576

Yamashita R, Suzuki Y, Takeuchi N, Wakaguri H, Ueda T, Sugano S, Nakai K. 2008. Comprehensive detection of human terminal oligo-pyrimidine (TOP) genes and analysis of their characteristics. *Nucleic Acids Res* **36**:3707–3715. doi:10.1093/nar/gkn248

Yamazaki T, Hirose T. 2015. The building process of the functional paraspeckle with long non-coding RNAs. *Front Biosci (Elite Ed)* **7**:1–41. doi:10.2741/715

Yan H, Wang Z, Sun Y, Hu L, Bu P. 2021. Cytoplasmic NEAT1 Suppresses AML Stem Cell Self-Renewal and Leukemogenesis through Inactivation of Wnt Signaling. *Adv Sci (Weinh)* **8**:e2100914. doi:10.1002/advs.202100914

Yang C, Li Z, Li Y, Xu R, Wang Y, Tian Y, Chen W. 2016. Long non-coding RNA NEAT1 overexpression is associated with poor prognosis in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* **8**:2672–2680. doi:10.18632/oncotarget.13737

Yang C, Maiguel DA, Carrier F. 2002. Identification of nucleolin and nucleophosmin as genotoxic stress-responsive RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **30**:2251–2260. doi:10.1093/nar/30.10.2251

Yang D-Q, Halaby M-J, Zhang Y. 2006. The identification of an internal ribosomal entry site in the 5'-untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. *Oncogene* **25**:4613–4619. doi:10.1038/sj.onc.1209483

Yang M, Lu Y, Piao W, Jin H. 2022. The Translational Regulation in mTOR Pathway. *Biomolecules* **12**:802. doi:10.3390/biom12060802

Yang W, Hinnebusch AG. 1996. Identification of a regulatory subcomplex in the guanine nucleotide exchange factor eIF2B that mediates inhibition by phosphorylated eIF2. *Mol Cell Biol* **16**:6603–6616. doi:10.1128/MCB.16.11.6603

Yang Y, Wang C, Zhao K, Zhang G, Wang D, Mei Y. 2018a. TRMP, a p53-inducible long noncoding RNA, regulates G1/S cell cycle progression by modulating IRES-dependent p27 translation. *Cell Death Dis* **9**:886. doi:10.1038/s41419-018-0884-3

Yang Y, Wang C, Zhao K, Zhang G, Wang D, Mei Y. 2018b. TRMP, a p53-inducible long noncoding RNA, regulates G1/S cell cycle progression by modulating IRES-dependent p27 translation. *Cell Death Dis* **9**:886. doi:10.1038/s41419-018-0884-3

Yang Y, Wang Z. 2019. IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome. *J Mol Cell Biol* **11**:911–919. doi:10.1093/jmcb/mjz091

Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, Zollo O, Xu W, Rego E, Ruggero D. 2006. Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science* **312**:902–906. doi:10.1126/science.1123835

Young SK, Willy JA, Wu C, Sachs MS, Wek RC. 2015. Ribosome Reinitiation Directs Gene-specific Translation and Regulates the Integrated Stress Response. *J Biol Chem* **290**:28257–28271. doi:10.1074/jbc.M115.693184

Zaccara S, Ries RJ, Jaffrey SR. 2019. Reading, writing and erasing mRNA methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**:608–624. doi:10.1038/s41580-019-0168-5

Zamora A, Alves M, Chollet C, Therville N, Fougeray T, Tatin F, Franchet C, Gomez-Brouchet A, Vaysse C, Martinez LO, Najib S, Guillermet-Guibert J, Lacazette E, Prats A-C, Garmy-Susini B. 2019. Paclitaxel induces lymphatic endothelial cells autophagy to promote metastasis. *Cell Death Dis* **10**:956. doi:10.1038/s41419-019-2181-1

Zeng Y, Opeskin K, Horvath LG, Sutherland RL, Williams ED. 2005. Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *Prostate* **65**:222–230. doi:10.1002/pros.20288

Zhai W, Comai L. 2000. Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol* **20**:5930–5938. doi:10.1128/MCB.20.16.5930-5938.2000

Zhang P, Cao L, Zhou R, Yang X, Wu M. 2019. The lncRNA Neat1 promotes activation of inflammasomes in macrophages. *Nat Commun* **10**:1495. doi:10.1038/s41467-019-09482-6

Zhang Q, Chen C-Y, Yedavalli VSRK, Jeang K-T. 2013. NEAT1 Long Noncoding RNA and Paraspeckle Bodies Modulate HIV-1 Posttranscriptional Expression. *mBio* **4**:e00596-12. doi:10.1128/mBio.00596-12

Zhang Z, Carmichael GG. 2001. The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell* **106**:465–475. doi:10.1016/s0092-8674(01)00466-4

Zheng W, Aspelund A, Alitalo K. 2014. Lymphangiogenic factors, mechanisms, and applications. *J Clin Invest* **124**:878–887. doi:10.1172/JCI71603

Zhou J, Liu CY, Back SH, Clark RL, Peisach D, Xu Z, Kaufman RJ. 2006. The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:14343–14348. doi:10.1073/pnas.0606480103

Zhu Y, Pirnie SP, Carmichael GG. 2017. High-throughput and site-specific identification of 2'-O-methylation sites using ribose oxidation sequencing (RibOxi-seq). *RNA* **23**:1303–1314. doi:10.1261/rna.061549.117

Ziaeian B, Fonarow GC. 2016. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol* **13**:368–378. doi:10.1038/nrcardio.2016.25

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté Égalité Fraternité

Université de Toulouse

Titre : Etude des mécanismes moléculaires du contrôle de la traduction en réponse au stress dans des cellules cardiaques et endothéliales lymphatiques

Mots clés : Facteurs de croissance, ARN non codant, ribosome, IRES, ITAF, traduction

Résumé : L'angiogenèse et la lymphangiogenèse jouent un rôle majeur dans le développement et l'aggravation de nombreuses pathologies. Elles sont induites en réponse à l'hypoxie tumorale et favorisent la dissémination métastatique. Les traitements anticancéreux peuvent quant à eux engendrer une dysfonction lymphatique. Ces deux processus sont au contraire bénéfiques dans l'ischémie du myocarde où ils contribuent à restaurer l'apport sanguin et à diminuer l'inflammation. La formation de nouveaux vaisseaux est gouvernée par l'action de facteurs de croissance des familles VEGFC (Vascular Endothelial Growth Factors) et FGF (Fibroblast Growth Factor). L'expression de ces facteurs de croissance est régulée au niveau traductionnel en réponse à différents stress par des structures de leur ARNm, les IRES (Internal Ribosome Entry Sites) qui leur permettent de continuer à être traduits malgré le blocage exercé sur la traduction dépendante de la coiffe. L'activité des IRES est contrôlée par des facteurs appelés ITAF (IRES trans-acting factors).Dans le premier volet de ces travaux, nous avons étudié le rôle des paraspeckles et du long ARN non codant Neat1 dans la régulation de la traduction IRES-dépendante en réponse au stress hypoxique dans des cardiomyocytes murins HL1. Les paraspeckles sont des corps nucléaires qui se forment en réponse au stress hypoxique. Ces corps se compose de nombreuses protéines qui s'articulent autour du long ARN Neat1 qui en forme le squelette. Plusieurs protéines qui le composent ont été identifiées comme ITAF, suggérant un rôle du paraspeckle dans la traduction IRES-dépendante. Par des expériences de déplétion, nous avons identifié Neat1 comme un régulateur clé de l'activité des IRES des ARNm des facteurs de croissance angiogéniques et lymphangiogéniques alors que deux protéines du paraspeckle, p54nrb et PSPC1, régulent des sous-groupes d'IRES. L'interactome de P54nrb étudié par spectrométire de masse a permis d'identifier deux autres ITAF : La protéine ribosomique RPS2 et la nucléoline. Nous avons montré par hybridation in situ que Neat1 et l'ARNm portant l'IRES du FGF1 interagissent en condition d'hypoxie suggérant un recrutement des ARNm portant un IRES par le paraspeckle. Ces nouveaux résultats nous ont amenés à l'hypothèse que les paraspeckles sont une plateforme d'assemblage de l'IREsome. Ce complexe ribonucléoprotéique se formerait dans le noyau et serait ensuite exporté dans le cytoplasme pour permettre la traduction IRES-dépendante. Dans le second volet de mes travaux, je me suis focalisée sur l'identification de ribosomes spécialisés responsables de la traduction IRES-dépendante lors du stress. Le modèle choisi est la cellule endothéliale lymphatique, située au cœur des processus de lymphangiogenèse physiologique et pathologique. Nous avons montré que les IRES des ARNm du VEGFC et FGF1 sont activés en réponse au stress du réticulum endoplasmique, et au stress génotoxique provoqué par un agent de chimiothérapie anticancéreuse, la doxorubicine. Nous avons analysé la composition des polysomes de cellules endothéliales soumises à ces stress en spectrométrie de masse, et montré que cette composition varie différentiellement pour ces deux stress. La protéine RPL13A est plus abondante dans les polysomes lors du stress du RE, alors que la RPL26 augmente dans les polysomes de cellules traitées doxorubicine. D'autre part nous avons réalisé des expériences de RiboMethSeq qui ont permis d'identifier plusieurs sites de méthylation des ARN ribosomiques issus des polysomes, qui sont eux aussi impactés différentiellement par les deux stress. L'impact de RPL13A et RPL26 ainsi que des méthylations de l'ARNr sur la traduction IRES-dépendante est actuellement en cours d'étude.

Title: Study of the molecular mechanisms of translational control in response to stress in cardiac and lymphatic endothelial cells

Key words: Growth factors, non coding RNA, ribosome, IRES, ITAF, translation

Abstract: Angiogenesis and lymphangiogenesis play a major role in the development and aggravation of several pathologies. They are induced in response to tumor hypoxia and promote metastatic dissemination. Lymphatic dysfunction can result from cancer treatments. However, both processes are beneficial in myocardial ischemia, where they help to restore blood flux and reduce inflammation. New vessel formation is governed by the action of growth factors of the vascular endothelial growth factors (VEGF) and FGF (Fibroblast Growth Factor) families. Expression of these growth factors is regulated at the translational level in response to various stresses by mRNA structures, internal ribosome entry sites (IRESs), which enable them to continue to be translated despite the blockade of cap-dependent translation. IRES activity is controlled by IRES trans-acting factors (ITAFs). In the first part of this work, we investigated the role of paraspeckles and of the long non-coding RNA Neat1 in the regulation of IRES-dependent translation in HL-1 murine cardiomyocytes submitted to hypoxic stress. Paraspeckles are nuclear bodies formed in response to hypoxia. These bodies are composed of several proteins that are articulated around the long Neat1 RNA that forms their skeleton. Several paraspeckle proteins have been identified as ITAFs, suggesting a role for paraspeckle in IRES-dependent translation. Using depletion experiments, we have identified Neat1 as a key regulator of the IRES activity of angiogenic and lymphangiogenic growth factor mRNAs, while two paraspeckle proteins, p54nrb and PSPC1, regulate IRES subgroups. The P54nrb interactome studied by mass spectrometry has led us to identification of two other ITAFs: the ribosomal protein RPS2 and nucleolin. We have showed by in situ hybridization that Neat1 and the mRNA carrying the FGF1 IRES interact under hypoxic conditions, suggesting the recruitment of IRES-containing mRNAs into paraspeckle. These new results led us to hypothesize that paraspeckles are a platform for IREsome assembly. This ribonucleoprotein complex would be formed in the nucleus and then exported to the cytoplasm to enable IRES-dependent translation. In the second part of my work, I focused on the identification of specialized ribosomes responsible for IRES-dependent translation during stress. The chosen model has been the lymphatic endothelial cell, as the core of physiological and pathological lymphangiogenesis processes. We have shown that the IRESs of VEGFC and FGF1 mRNAs are activated in response to endoplasmic reticulum stress, and to genotoxic stress induced by an anticancer chemotherapy agent, doxorubicin. We analyzed the composition of polysomes from endothelial cells subjected to these stresses by mass spectrometry, and have shown that ribosome composition varies differentially for these two stresses. RPL13A protein is more abundant in polysomes under ER stress, while RPL26 increases in polysomes from doxorubicin-treated cells. RiboMethSeq experiments have allowed us to identify several methylation sites in polysome-derived ribosomal RNAs, which are also differentially impacted by the two stresses. The impact of RPL13A and RPL26 as well as of rRNA methylations on IRES-dependent translation is currently under investigation.